

Profil hlapljivih spojeva cvjetnog meda

Trupina, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:426810>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA CVJETNOG MEDA

DIPLOMSKI RAD

MATEJA TRUPINA

Matični broj: 96

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA CVJETNOG MEDA

DIPLOMSKI RAD

MATEJA TRUPINA

Matični broj: 96

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TEHNOLOGY
GRADUATE STUDY
CHEMISTRY: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF FLOWER HONEY

DIPLOMA THESIS

MATEJA TRUPINA

Parent number: 96

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemije, Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić
Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović, Edita Jelinčić, ing.

PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA CVJETNOG MEDA

Mateja Trupina, 96

Sažetak:

Pripadnici životinjskog carstva malih dimenzija, iznimno važni za ljudski život na Zemlji, su pčele. Medonosne pčele u Bosni i Hercegovini i Republici Hrvatskoj su *Apis mellifica*, *Apis cerana* i *Apis mellifera*. Pčelinji proizvodi su med, pčelinji otrov, polen, matična mliječ, vosak. Senzorska svojstva meda čine boja, okus i miris. Hlapljivi spojevi su nositelji mirisa prehrambenih proizvoda, pa tako i meda. Kako je miris jedna od komponenti arome, hlapljivi spojevi se često nazivaju i „spojevima arome“.

U ovom radu hlapljivi spojeva meda iz vlastitog obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva OPG-a Trupina (Bosna i Hercegovina) izolirani su ultrazvučnom ekstrakcijom (USE), ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE) i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni ekstrakti su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom. Glavni sastojci u ultrazvučnim ekstraktima su ravnolančani ugljikovodici dokosan ($C_{22}H_{46}$) i trikosan ($C_{23}H_{48}$). Monoterpenski eter (Z)-anetol je glavni spoj u vršnim parama meda iz 2019. god., a glavni sastojci vršnih para meda iz 2018. god. su benzaldehid i *cis*-linalol oksid. Ekstrakcijom tekuće-tekuće izoliran je mali broj spojeva, a i uspješnost identifikacije nije zadovoljavajuća te metoda nije prikladna za izolaciju hlapljivih spojeva iz meda.

Ključne riječi: livadni med, hlapljivi spojevi, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcije tekuće-tekuće, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 50 stranicu, 36 slika, 3 tablice, 31 literaturnu referencu

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|--------------------------------------|---------------|
| 1. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović | predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. Marina Zekić | član |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić | član - mentor |

Datum obrane: 30.10.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate Study of Chemistry, Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XIX.

Mentor: Ani Radonić, PhD, associate professor

Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor, Edita Jelinčić, ing.

VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF FLOWER HONEY

Mateja Trupina, 96

Abstract:

Important members of animal kingdom living on the Earth which contribute to the better quality of human life are bees. Honey bees in Bosnia and Herzegovina and Republic of Croatia are *Apis mellifera*, *Apis cerana* and *Apis mellifica*. Product of bee keeping are venom, pollen, royal jelly, wax and honey. The honey sensory properties are color, taste and aroma. The volatile compounds are the main aroma compounds of foods and honey, too. The methods used for the extraction of volatile compounds of meadow honey originating from family apiary Trupina (Bosnia and Herzegovina) are ultrasonic extraction (USE), liquid-liquid extraction (LLE) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The main compounds in USE extracts are straight chain hydrocarbons docosane (C₂₂H₄₆) and tricosane (C₂₃H₄₈). Monoterpene ether (*Z*)-anethol is the major constituent of honey headspace, sample from 2019. The main constituents of honey headspace, sample from 2018., are benzaldehyde and *cis*-linalool oxide. Small number of compounds is isolated by liquid-liquid extraction and extraction efficiency wasn't satisfactory, too. So, liquid-liquid extraction is not appropriate method for the isolation of honey volatiles.

Keywords: meadow honey, volatiles, ultrasonic extraction, liquid-liquid extraction, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 50 pages, 36 figures, 3 tables, 31 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Zvonimir Marijanović - PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Marina Zekić - PhD, assistant prof. | member |
| 3. Ani Radonić - PhD, associate prof. | supervisor |

Defence date: 30.10.2019.

Printed and electronic (pdf format) version of the thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od 08. mjeseca do 10. mjeseca 2019. godine.

Zahvaljujem se svojoj porodici, roditeljima, sestrama, bakama i djedovima i mome dečku Josipu što su mi bili podrška tijekom studiranja.

Zahvaljujem se dr.sc.prof. Ani Radonić na ukazanoj prilici i za mentorstvo, što je podržavala moje ideje i omogućila da ovaj rad mogu temeljiti na nečemu što je proizvod obiteljskog posla.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću i ing. Editi Jelinčić laborantici na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela.

Također se zahvaljujem članovima Povjerenstva na korisnim savjetima i sugestijama pri pisanju rada

Mateja

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva livadnog meda (proizvodnja 2018. i 2019.) ultrazvučnom ekstrakcijom, ekstrakcijom tekuće-tekuće i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi.
2. Identifikacija izoliranih spojeva plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom.
3. Usporedba dobivenih rezultata radi izbora optimalne metode za izolaciju hlapljivih spojeva iz meda.

SAŽETAK

Pripadnici životinjskog carstva malih dimenzija, iznimno važni za ljudski život na Zemlji, su pčele. Medonosne pčele u Bosni i Hercegovini i Republici Hrvatskoj su *Apis mellifica*, *Apis cerana* i *Apis mellifera*. Pčelinji proizvodi su med, pčelinji otrov, polen, matična mliječ, vosak. Senzorska svojstva meda čine boja, okus i miris. Hlapljivi spojevi su nositelji mirisa prehrambenih proizvoda, pa tako i meda. Kako je miris jedna od komponenti arome, hlapljivi spojevi se često nazivaju i „spojevima arome“.

U ovom radu hlapljivi spojeva meda iz vlastitog obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva OPG-a Trupina (Bosna i Hercegovina) izolirani su ultrazvučnom ekstrakcijom (USE), ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE) i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Dobiveni ekstrakti su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom. Glavni sastojci u ultrazvučnim ekstraktima su ravnolančani ugljikovodici dokosan ($C_{22}H_{46}$) i trikosan ($C_{23}H_{48}$). Monoterpenski eter (Z)-anetol je glavni spoj u vršnim parama meda iz 2019. god., a glavni sastojci vršnih para meda iz 2018. god. su benzaldehid i *cis*-linalol oksid. Ekstrakcijom tekuće-tekuće izoliran je mali broj spojeva, a i uspješnost identifikacije nije zadovoljavajuća te metoda nije prikladna za izolaciju hlapljivih spojeva iz meda.

Ključne riječi: livadni med, hlapljivi spojevi, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcije tekuće-tekuće, HS-SPME, GC-MS

SUMMARY

Important members of animal kingdom living on the Earth which contribute to the better quality of human life are bees. Honey bees in Bosnia and Herzegovina and Republic of Croatia are *Apis mellifera*, *Apis cerana* and *Apis mellifica*. Product of bee keeping are venom, pollen, royal jelly, wax and honey. The honey sensory properties are color, taste and aroma. The volatile compounds are the main aroma compounds of foods and honey, too. The methods used for the extraction of volatile compounds of meadow honey originating from family apiary Trupina (Bosnia and Herzegovina) are ultrasonic extraction (USE), liquid-liquid extraction (LLE) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Analysis of all samples was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The main compounds in USE extracts are straight chain hydrocarbons docosane (C₂₂H₄₆) and tricosane (C₂₃H₄₈). Monoterpene ether (*Z*)-anethol is the major constituent of honey headspace, sample from 2019. The main constituents of honey headspace, sample from 2018., are benzaldehyde and *cis*-linalool oxide. Small number of compounds is isolated by liquid-liquid extraction and extraction efficiency wasn't satisfactory, too. So, liquid-liquid extraction is not appropriate method for the isolation of honey volatiles.

Key words: meadow honey, volatiles, ultrasonic extraction, liquid-liquid extraction, HS-SPME, GC-MS.

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. PČELE, MED I PČELARSTVO KROZ POVIJEST	2
1.2. PČELE	3
1.3. PČELARSKA PRAKSA.....	5
1.4. PROIZVODI RADA PČELINJE ZAJEDNICE	7
1.5. FIZIKALNO - KEMIJSKA SVOJSTVA MEDA	12
1.5.1. Fizikalna svojstva meda	12
1.5.2. Kemijski sastav meda	13
1.6. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA.....	15
1.7. HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU	16
1.7.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva.....	16
1.7.1.1. Ekstrakcijske tehnike	17
1.7.1.2. Destilacijske tehnike	20
1.7.1.3. Tehnike izolacije vršnih para.....	20
1.7.1.4. Sorpcijske tehnike.....	22
1.7.2. Analiza hlapljivih spojeva	23
1.7.2.1. Plinska kromatografija i spektrometrija masa	24
2. EKSPERIMENTALNI DIO	27
2.1. OBITELJSKO POLJOPRIVREDNO GOSPODARSTVO TRUPINA.....	27
2.2. KEMIJSKE I APARATURA	29
2.3. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA	30
2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija (USE).....	31
2.3.2. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće	33

2.3.3. Mikroekstrakcija vršnih para (HS-SMPE)	35
2.4. GC - MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA.....	35
3. REZULTATI.....	37
4. RASPRAVA	41
4.1. PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIVADNOG MEDA IZOLIRANIH ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM.....	41
4.2. PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIVADNOG MEDA IZOLIRANIH EKSTRAKCIJOM TEKUĆE-TEKUĆE.....	43
4.3. PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIVADNOG MEDA IZOLIRANIH MIKROEKSTRAKCIJOM VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI.....	44
5. ZAKLJUČAK	46
6. LITERATURA.....	48

UVOD

Pčele su pripadnici životinjskog carstva vrlo malih dimenzija, a iznimno važne za ljudski rod i život na Zemlji. Znanstvenici i dandanas istražuju zanimljiv način života i komunikacije među pčelama međusobno te s ostatkom živog svijeta. Pčele su jedne od važnijih prenosioca peluda (polinatora) te su iznimno važne u poljoprivredi. Medonosne pčele u Bosni i Hercegovini i Republici Hrvatskoj su *Apis mellifica*, *Apis cerena* i *Apis mellifera*. Pčelinji proizvodi, med, pčelinji otrov, polen, matična mliječ i vosak posjeduju mnoga biološka svojstva, kao što su antimikrobna i antioksidacijska svojstva.

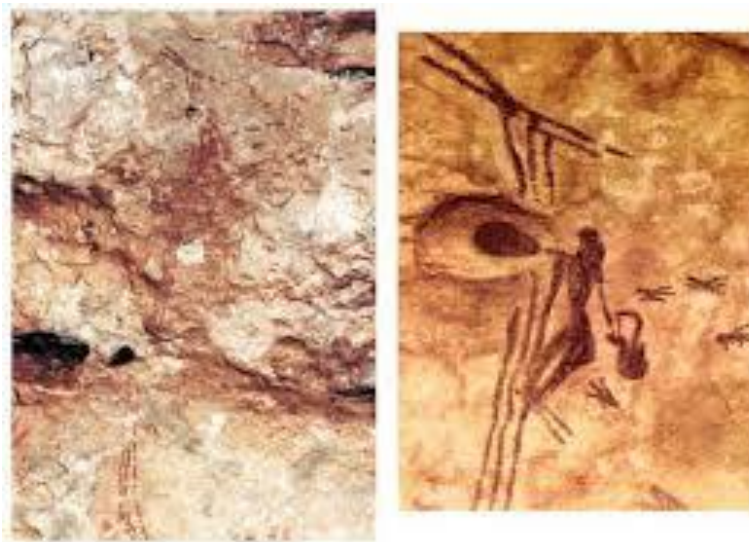
Med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. Med može biti monofloran i polifloran, a vrste meda su **nektarni** (bagremov, lipov, kaduljin, metvičin, livadni..) i **medljikovac**. Kemijski sastav meda čini više od 70 spojeva, od čega 99% čine ugljikohidrati i voda. Ostatak od 1% čine spojevi zaslužni za organoleptička i ljekovita svojstva meda. Fizikalna svojstva meda su kristalizacija, higroskopnost, viskoznost, kristalizacija, električna vodljivost, optička svojstva. Na osnovu vrijednosti određenih fizikalnih svojstava može se otkriti patvorenje meda kao i vrsta meda. Senzorska svojstva meda su boja, okus i miris. Na svojstva meda utječu mnogi čimbenici poput botaničkog podrijetla meda i geografskog položaja ispaše pčela (temperatura, vlažnost i vrste tla).

Hlapljivi spojevi su nositelji mirisa prehrambenih proizvoda, pa tako i meda. Kako je miris jedna od komponenti arome, hlapljivi spojevi se često nazivaju i „spojevima arome“. Metode koje se primjenjuju za izolaciju hlapljivih spojeva su destilacija i ekstrakcija, a u novije vrijeme i sorpcijske tehnike te tehnike tzv. vršnih para (od engl. *headspace*). Za izolaciju spojeva arome danas se najčešće koriste ultrazvučna ekstrakcija, mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi i ekstrakcija tekuće-tekuće.

1. OPĆI DIO

1.1. PČELE, MED I PČELARSTVO KROZ POVIJEST

Do današnjeg dana povjesničari nisu uspjeli točno definirati “susret” pčela i čovjeka. “Današnji” čovjek je naučio živjeti s pčelama, biti im prijatelj i neprijatelj, no u početku je to svakako bio izazov za obje strane. Znanstvenici su zaključili da je pradjedovina pčela Indija. Najstariji podatak o suživotu čovjeka i pčela datira od oko 20 000 godina p.n.e., a pronađen je u Španjolskoj na slikama u špiljama (slika 1.1)¹



Slika 1.1. Špilja u Španjolskoj²

Prema zemljopisnom položaju Indije, okruženoj planinama i oceanima, povjesničari su zaključili da su se pčele kretale prema Zapadu. Prije 1600-tih godina kolonije pčela nisu postojale u Južnoj i Sjevernoj Americi, Australiji i Novom Zelandu. Seobom naroda se dakako to promijenilo, kao što su se i mnoge biljne i životinjske vrste, kao i kulture, izmiješale. Fossil najstarije pčele, star preko 80 milijuna godina, čuva se u SAD-u u “American Museum of Natural History” u New Yorku.

U mnogim drevnim i vjerskim zapisima med se spominje kao “dar s neba” i opisuje se riječima “nektar”, “ambrozija” i “hrana bogova”. U zapisima se spominje kako su, da poboljšaju svoje zdravlje, grčki filozofi i atletičari med i limun pili svaki dan. Otac medicine Hipokrat, smatrao je da su med, zrak i voda lijek za sve ljudske tegobe. Otkrivajući svijet i prirodu oko sebe čovjek je naišao na pčele i otkrio da daju med koji su koristili kao zaslađivač

i u medicinske svrhe. Otkrivši vatru našao je način da otjera pčele i “ukrade” plodove njihovog rada.¹

1.2. PČELE

Sistematika pčela:

Carstvo: Životinje

Koljeno: Člankonošci

Razred: Kukci

Red: Hymenoptera

Podred: Apocrita

Natporodica: Apoidea

Porodica: Apidae

Potporodica: Apinae

Rod: *Apis*

Vrsta: *Apis mellifica* L.³

Na području Federacije Bosne i Hercegovine (Zakonom o stočarstvu)⁴ je dozvoljeno uzgajati pčelu vrste *Apis mellifica* L. (slika 1. 2), *Apis cerana* i *Apis mellifera* *sutellata* (slika 1.3).



Slika 1.2. *Apis mellifica*⁵



Slika 1.3. *Apis mellifera* i *Apis cerana*⁶

Od oko 25 000 vrsta pčela prisutnih u svijetu, osim na Antartici, četiri vrste iz roda *Apis* su medonosne pčele:³

- ✓ *Apis florea* F.- mala indijska pčela
- ✓ *Apis indica* F.- indijska pčela
- ✓ *Apis dorasta* F.- velika indijska pčela

✓ *Apis mellifica* L.- europsko-afrička medonosna pčela⁷

Pčele su najvažniji i najrasprostranjeniji prenosioci peluda tj. polinatori.^A One nastanjuju šume, oranice, voćnjake, vinograde, ali i kamenita tla. Žive u zajednicama u kojima svaka pčela imaju svoju zadaću te zajedničkim radom doprinose izuzetno organiziranom i kvalitetnom životu zajednice. Međutim ima i pčela kojima život u zajednici ne odgovara. Naime solitarne pčele ne vole rad i suživot u zajednicama, ne roje se, nemaju maticu, sve zadaće obavljaju same, a najpogodnija temperatura za njihov rad je 8 °C. Mogu se pronaći u rano proljeće na voćkama, zbog čega su u literaturi nazvane voćarkama, a iz roda su *Osmia*.⁸

Pčelinja zajednica broji 20 - 80 000 jedinki, svaka sa svojom zadaćom, a razlikujemo (slika 1.4):



Slika 1.4. Vrste pčela u zajednici⁹

- ✓ **trutove** - mužjak, dugačak 15-17 mm, masa mu je oko 0,196 g, ima ih do nekoliko stotina. Njihova zadaća u društvu je oplodnja matice.
- ✓ **radilice** - slične matici, ali veličinom manje (12-14 mm). Zadaća radilica je hranjenje i njegovanje legla, unošenje i prerada hrane. Radilica obavlja poslove u i izvan zajednice, neke pronalaze hranu i javljaju ostalima, a neke skupljaju pronađenu hranu.
- ✓ **matica** - najvažniji član zajednice, veličine do 20 mm, mase oko 1 g. Hrani se medom, ne izlazi iz staništa, nema organ za sabiranje i spremanje hrane. Ima veliku otpornost prema bolestima, nekada izlazi radi orijentiranosti u prostor, njena glavna funkcija je stvaranje novih pčela, dok brigu za mlada jajašca preuzimaju radilice. U zajednici živi jedna matica i sa zajednicom komunicira preko kemijskih spojeva - feromona.^{3:7}

^A Polinatori su prenosioci polena ili peluda.

Tijekom traženja i skupljanja hrane, pčele ne oštećuju biljke. Prirodna hrana pčela je medonosna biljka tj. slatki sokovi i cvjetni prah. Medonosnim biljkama se smatraju biljke koje su izvor nektara i peluda, ali i one koje su izvor medljike i propolisa. Pripadaju sljedećim porodicama: Lamiaceae (usnače), Salicaceae (vrbe), Rosaceae (ruže), Asteraceae (glavočiike), Fabaceae (mahunarke), Ciocoriaceae (jezičastocvjetne glavočiike) i Brassicaceae (kupušnjače ili krstašice).¹⁰ Pčele se hrane bjelančevinama, mastima, ugljikohidratima, mineralnim tvarima i svakako vodom. Glavni izvor ovih nutrijenata je biljni nektar. Nektar je tvar koju izlučuju biljke iz svojih žlijezda nektarija. Najveći udio u nektaru čini voda, ugljikohidrati (udio ovisi o vrsti biljke), bjelančevine, organske kiseline i vitamini. Izlučivanje nektara kod biljaka ovisi o raznim faktorima: vrsti biljke, obliku i sastavu cvijeta, vrsti i načinu obrađivanja tla, temperaturi i vlažnosti zraka, zemljopisnom položaju, zdravstvenoj ispravnosti samih biljaka.

1.3. PČELARSKA PRAKSA

*Zakon o stočarstvu*¹¹ (Federacija BiH) i *Pravilnik o uvjetima i načinu provedbe posebnih mjera pomoći za sektor pčelarstva*⁴ (RH) definira:

- ✓ pčelarstvo kao aktivnost kojom se drže i uzgajaju pčele, proizvode matice pčela, med i drugi pčelinji proizvodi
- ✓ pčelinju zajednicu kao roj pčela u košnici s pripadajućim saćem, koji se sastoji od jedne matice, radilica i trutova tijekom proizvodne sezone
- ✓ pčelinjak (gazdinstvo sa pčelama) je skup košnica s pčelama koje su smještene na slobodnom prostoru, odnosno u posebnom stabilnom ili montažnom objektu, a može biti ugrađen u vozilo preuređeno za prijevoz; odnosno stacionirani ili pomični objekt u kojem su postavljene košnice i/ili oprema.

Uzgojem pčela se bavi pčelar koji se sa svojim znanjem i vještinama i dobrom organizacijom nastoji pravilno i kvalitetno baviti ovom aktivnošću. Početak bavljenjem pčelarstvom uključuje, pored želje, hrabrosti i financijske mogućnosti za početak, pronalazak lokacije na kojoj će biti smješten pčelinjak i kupnju pčelarske opreme i osnovnog alata.

Temelje modernog pčelarstva postavio je američki svećenik Lorenzo L. Langstroth koji je konstruirao, i 1852. god. patentirao, košnicu sa vertikalno postavljenim okvirima i razmacima, koja se razlikovala od svih do tada poznatih tipova košnica. On je prvi odredio

tzv. „pčelinji prostor“, prostor u košnici kroz koji se pčele mogu provlačiti i kretati i utvrdio je njegovu veličinu od 4,8 do 9,5 mm.¹² Košnica je stanište za pčele napravljeno od strane čovjeka koje omogućuje pčelama zaštitu, mjesto za spremanje hrane i razmnožavanje i, svakako najbitnije, prezimljavanje. Na svijetu postoje različiti tipovi košnica prilagođene zemljopisnim obilježjima područja gdje se pčelinjak nalazi, a dijele se na košnice sa nepokretnim i pokretnim saćem.

Aktivnost pčelinje zajednice se mijenja kroz četiri razdoblja kroz godinu i vremenske prilike tijekom tih razdoblja.^B Pčelarska godina započinje u kolovozu/rujnu kada zajednicu napuštaju trutovi. U našem podneblju stručnjaci su definirali sljedeće stadije u životu pčela kroz godinu:

- ✓ STADIJ JESENI I ZIMOVANJA - prestanak pčelinje paše, manji izlazak skupljačica te manje izležanih jaja, pad broja pčela u zajednici. U ovom razdoblju se u košnicu ne unosi propolis, a kada nastupi zima, tj. temperature niže od 12°C, pčele ne napuštaju košnicu. U ovom razdoblju se u košnicama nalaze mlade pčele, oplodena matica i na pčelinjaku vlada mir.
- ✓ STADIJ POJAVE LEGLA I SMJENA GENERACIJE PČELA U ZAJEDNICI - matica se počinje intenzivnije hraniti te počinje leći jaja. Temperatura u košnici raste do 35 °C , troši se više hrane i cvjetnog praha, ugibaju stare pčele, a rađaju se mlade i počinju se u društvu pojavljivati trutovi. Ovaj stadij se događa krajem travnja i početkom svibnja.
- ✓ STADIJ GLAVNE PČELINJE PAŠE - pčele skupljaju hranu, odlažu višak u saće i nastaje med. Ovo je najaktivniji period u životu pčelinje zajednice, a prije same paše se događa prihranjivanje radilica da bi se povećao njihov broj.
- ✓ STADIJ ROJENJA - razmnožavanje pčelinjih društava.
- ✓ STADIJ NAKON ROJENJA I PRIPREMA DRUŠTVA ZA ZIMU - aktivnost zajednice opada. Ovaj period se događa krajem srpnja. Trutovi napuštaju zajednicu, a broj radilica se smanjuje.^{3;14}

^B Medonosna pčela izlazi na pašnjaka pri temperaturi od 16°C i relativnoj vlažnosti od 74%.¹⁴

1.4. PROIZVODI RADA PČELINJE ZAJEDNICE

Pčele svojim radom proizvode med, vosak, matičnu mliječ, propolis i pčelinji otrov. Med je ujedno i hrana i proizvod rada pčela. Kako je prethodno navedeno, pčela skuplja biljne sokove, njime se hrani, a višak “ostavi” i dodavajući mu vlastite specifične tvari prevodi u med. Pčele radilice skupljaju nektar i odnose ga u košnicu.^{C;13} Pritom radilice obrađuju nektar u svom mednom mješuru, dodaju mu vlastite enzime koji započinju reakcije razgradnje saharoze i uklanjanja viška vode te njime ispunjavaju saće dio po dio. Potom pčele tankom opnom (od voska) zatvaraju svaki šesterokut saća.⁷ Med je prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.¹³ Svojstva meda ovise o vremenskim uvjetima i o vrsti biljke čiji nektar pčele sakupljaju. Aroma, boja i gustoća meda dolazi upravo od vrste biljke.

Med se dijeli na dva načina, prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje. Prema načinu proizvodnje med se dijeli na (Pravilnik o medu Republike Hrvatske):

- ✓ prešani
- ✓ vrcani
- ✓ med u saću
- ✓ tekući
- ✓ kristalizirani
- ✓ krem med
- ✓ sirovi med
- ✓ filtrirani med

Najčešće vrste meda, prema botaničkom porijeklu, koje se mogu pronaći u Bosni i Hercegovini i Republici Hrvatskoj su:^{10; 14}

- ✓ **nektarni** (monoflorni i poliflorni): kestenov (svijetlo jantarne boja), lipov (boja ovisi o vrsti lipe - od svijetložute do zeleno - žute boje), bagremov (svijetle boje), kaduljin (od svijetložute do maslinasto zelene boje), metvičin (tamnocrvene boje), livadni (od svijetložute do prozirne boje), suncokretov

^C Masa prinesenog nektra otprilike odgovara polovici mase pčele radilice.²⁷

(svijetložute boje), vrijeskov (svijetložute boje s nijansom zelene boje), med od drače, konoplje (svijetlije boje s nijansom zelene) i amorfe (tamnosmeđe boje)

- ✓ **medljikovac** - tamnije boje (smečkasto crvene do tamnozelene)

Pčelinji otrov (slika 1.5) je proizvod pčelinjeg organizma, izlučevina specijalnih žlijezda za proizvodnju otrova, a namijenjen je zaštititi pčela od neprijatelja, čovjeka ili životinje.



Slika 1.5. Pčelinji otrov¹⁵

Pčelinji otrov izaziva bol, crvenilo i otok na mjestu uboda žalcem. Otrovi se luče u manjim količinama, 0,2 – 0,3 mg po pčeli, te je njegovo skupljanje i istraživanje u prošlosti predstavljalo problem. Osobine pčelinjeg otrova:

- ✓ bezbojna do žućkasta gusta tekućina
- ✓ gorkog okusa
- ✓ pH vrijednosti od 4,5 do 5,5
- ✓ lako topljiv u vodi, a teže u etanolu.
- ✓ termostabilan.

Količina suhe tvari u otrovu varira od 30 do 45%. U otrovu su pronađene brojne bjelančevine i peptidi. Najaktivniji enzim otrova je hialuronidaza koja otapa osnovnu tvar za spajanje tkiva, a to omogućuje bolje prodiranje otrova u organizam. Najveći utjecaj pčelinjeg otrova je na kardiovaskularni i živčani sustav.¹⁶

Propolis

Postoje dvije teorije o nastanku propolisa. Prva teorija je da pčele u rano proljeće skupljaju ljepljivu i smolastu masu s lisnih pupoljaka jablana, topola i drugih biljaka i prenose je u košnicu. Druga teorija je da je propolis nusproizvod usitnjavanja polena čime pčele pripremaju hranu za pomladak. Općeprihvaćena je prva teorija o nastanku propolisa. Pčela svojim usnim organima uzima ljepljivu i smolastu masu, a u košnici je preuzimaju druge pčele. Propolis se skuplja krajem ljeta i početkom jeseni. Postoje i pčele koje samo skupljaju propolis i one žive samo 15 dana.

Propolis je smolasta, ljepljiva tvar (slika 1.6) žutozelene do tamnocrvene boje, relativne gustoće iznad 1,0, slabo je topljiv u vodi, a relativno dobro topljiv u etanolu.¹⁶



Slika 1.6. Propolis kapi

Kemijski sastav propolisa je:

- ✓ 30% pčelinjeg voska
- ✓ 20 % mehaničkih primjesa
- ✓ 40-60% smola i balzama
- ✓ 5-20% eteričnih ulja
- ✓ 5-15% tanina.¹⁴

Propolis sadrži flavanoide, organske kiseline, terpene, aldehide, estere, alkohole, etere, aminokiseline, minerale kao što su mangan, titan, cink barij, kalij, nikal, kobalt, krom olovo, kalcij, fosfor, sumpor te vitamine B1, B2, B6, C, E, nikotinsku i pantotensku kiselinu. Propolis ima razna biološka svojstva. Djeluje protiv mikroba, gljivica, virusa, ima antiseptički utjecaj, sprječava rast biljke, stimulira regeneraciju tkiva, povećava imunološku reakciju organizma.²² Najčešće se koristi u obliku alkoholne tinkture.^D Propolis se upotrebljava za proizvodnju umjetne vatre i mirisa, lakiranje i poliranje drvenih predmeta, za konzerviranje hrane i u terapijske svrhe za liječenje rana.¹⁶

Matična mliječ je izlučevina posebnih pčelinjih žlijezda, a proizvode je pčele radilice kao hranu za matice i ličinke. To je gusta neprozirna tvar, bijele do blijedo žućkaste boje, bogata bjelančevinama, ugljikohidratima, mastima, vitaminima, organskim kiselinama, aminokiselinama, vitaminima (slika 1.7).



Slika 1.7. Matična mliječ¹⁸

Matična mliječ se, nakon prikupljanja, brzo kvari. Stabilna je 20 h nakon vađenja pri temperaturi 0-30 °C, zbog čega se brzo po skupljanju stabilizira te priprema u oblike u kojima se stavlja na tržište.¹⁶ Mliječ pokazuje antimikrobna svojstva, koristi se pri liječenju

^D Tinktura je alkoholna otopina pripravljena obradom biljnog materijala s etanolom ili etanol-voda smjesama; mogu se dobiti otapanjem drugih ekstrakata u ovim otapalima. Ponekad se nazivaju i infuzijama.¹⁷

bolesti i stanja čija je karakteristika oštećenje regenerativnih mogućnosti, daje se djeci koja imaju poremećaj u ishrani, koristi se u liječenju anemije. Poznat je pozitivan učinak matične mliječi na oboljele od bronhijalne astme i liječenje oboljenja živčanog sustava starijih osoba, koristi se u dermatologiji i kozmetici, a često se primjenjuje i u kombinaciji s drugim pčelinjim proizvodima.¹⁶

Vosak je proizvod voštanih stanica pčela radilica. Vosak pčele koriste za izgradnju satne osnove. Pčelinji vosak je žute boje,^E specifičnog mirisa, bez ukusa, čvrste konzistencije, a lomljiv je pri sobnoj temperaturi (slika 1. 8.). Ovisno o temperaturama na kojima se nalazi on mijenja svoja fizikalno-kemijska svojstva. Dvije su vrste pčelinjeg voska:

- ✓ topljeni koji se dobiva topljenjem voštane sirovine u topionicima
- ✓ ekstrakcijski koji se dobiva ekstrakcijom pomoću otapala iz voskarine^F, slabije je kvalitete i koristi se u industrijske svrhe.



Slika 1.8. Pčelinji vosak (OPG Trupina)

Zbog visoke cijene na tržištu pčelinji vosak se često patvori, a za to se koriste parafin, stearin ili njihove mješavine, također se dodaju neki biljni (karnauba vosak) i životinjski voskove.¹⁴ Pčele koriste vosak za izgradnju saća, a ljudi koriste vosak u medicini, farmaciji, kozmetici, npr. kao jednu od sirovina za izradu melema, flastera, masti...¹⁶

^E Boja voska se dobiva miješanjem voska s propolisom.¹⁰

^F Voskarina je ostatak topljenja voštine (netopljivo voštano saće, saće na okvirima, voštana nadogradnja na okvirima i zidovima košnice, voštani zatvarači na satovima s medom i polomljeno saće i osnove) sadrži do 50% voska.

Polen (pelud)

Polen, pelud ili cvjetni prah (slika 1.9) su zapravo biljne muške spolne stanice koje se raznose kako bi se biljka dalje razmnožavala. Pčele skupljaju polen^G hvatačima polena. Polen je neophodan za ishranu pčela, jer je izvor bjelančevina, masti, vitamina^H i minerala.

Polen se koristi u medicini i farmakologiji te kozmetici. Ima antimikrobiološko djelovanje, a konzumacija polena preporučuje se pacijentima s kroničnim crijevnih oboljenima te za liječenje hepatitisa.

Polen se skuplja u travnju, svibnju i lipnju, nakon čega slijedi sušenje te čuvanje pri niskim temperaturama i na tamnom mjestu.¹⁶



Slika 1.9. Polen¹⁹

1.5. FIZIKALNO - KEMIJSKA SVOJSTVA MEDA

1.5.1. Fizikalna svojstva meda

Kao što je već spomenuto, osobine meda ovise o njegovom porijeklu. Porijeklo i starost meda može se odrediti relativno jednostavnim testovima. Određivanje fizikalnih svojstava meda obuhvaća određivanje viskoznosti, kao jednog od važnijih svojstava, higroskopnosti, kristalizacije i električne vodljivosti meda.

Određivanjem viskoznosti može se procijeniti i udio vode u medu. Viskoznost, osim o udjelu vode, ovisi i o udjelu proteina te o omjeru monosaharida i disaharida. Određivanje udjela vode je važno budući da su količinom vode određena i neka druga svojstva meda. Količina vode u medu ovisi o vrsti pčela, vremenskim prilikama u okolišu i stanju u košnici,

^G Oduzimanjem polena pčelama se povećava aktivnost.¹⁶

^H Po količini vitamina je bogatiji od voća¹⁶

itd. Med sa većim udjelom vode je skloniji kvarenju.¹ Udio vode se određuje refraktometrijski i viskozimetrijskom metodom.²⁰ Udio vode dozvoljen u medu prema Pravilniku o medu je:¹³

KOLIČINA VODE

općenito – najviše 20%;
vrijesak i pekarski med općenito - najviše 23%;
pekarski med od vrijeska – najviše 25%

Električna vodljivost se određuje konduktometrijski u 20%-tnim otopinama meda. Prema vodljivosti mogu se razlikovati medljikovac od nektarnog meda, budući da je za svaku vrstu meda pravilnikom propisana vrijednost električne vodljivosti kako slijedi:¹³

ELEKTRIČNA VODLJIVOST

medljikovac i med od kestena - najmanje 0,8
mScm⁻¹; med od planike, vrijeska, eukaliptusa,
lipe, čajevca - najviše 0,8 mScm⁻¹

Određivanje organoleptičkih svojstava meda podrazumijeva određivanje boje, mirisa i okusa.

1.5.2. Kemijski sastav meda

Med je smjesa više od 70 različitih kemijskih spojeva, od kojih neki potječu od biljaka, a neki nastaju tijekom prerade meda. Zbog toga određivanje kemijskog sastava meda još uvijek predstavlja izazov, a metode određivanja kemijskog sastava se još uvijek usavršavaju.

Većinu meda (99 %) čine ugljikohidrati i voda, a ostatak od 1% otpada na mineralne tvari, vitamine, organske kiseline, fenolne spojeve (flavanoide) i tvari koje čine aromu. I tako mali udio od 1% ostalih spojeva u medu je neobično važan budući da su neki od tih spojeva važni za organoleptička i ljekovita svojstva meda.²⁰

Ugljikohidrati čine od 73 do 83% sastava meda. Najzastupljeniji su monosaharidi (fruktoza i glukoza), te disaharidi^J i oligosaharidi. Prema Pravilniku¹³, dozvoljene vrijednosti su:

¹ U ovom radu se nisu određivale fizikalno-kemijske osobine meda, te je samo navedeno kako se to u praksi običava raditi.

^J Prisutni disaharidi su: saharoza, maltoza, izomaltoza, nigerzoza, turanoza, kobioza, laminoriboza, gentiobioza, maltuloza..., te prisutni oligosaharidi: erloza, melecitoza, panoza, centozza, izopanoza, rafinoza...²⁰

KOLIČINA ŠEĆERA

- količina fruktoze i glukoze: cvjetni med – najmanje 60 g/100 g
medljikovac - najmanje 45 g/100 g
- količina saharoze: općenito – najviše 5 g/100 g
bagrem – najviše 10 g/100 g
lavanda – najviše 15 g/100 g

Omjer glukoze i fruktoze je karakterističan je za svaku vrstu meda i uobičajeno iznosi više od 1,0.

Udio vode u medu se kreće od 15 do 23 %. O udjelu vode ovise i druga svojstva meda kao što su stabilnost meda, odnosno otpornost prema kvarenju (fermentacija). Najzastupljenije organske kiseline u medu su mravlja i glukonska kiselina. Od ostalih kiselina u medu se nalaze oksalna, limunska, mliječna, vinska, jabučna, maleinska, maslačna, jantarna i valerijanska kiselina. Većina se ovih kiselina u medu nalazi u obliku estera (te tako utječu na miris i okus).

U medu se nalaze sljedeće mineralne tvari: kalcij, fosfor, nikal, željezo, cink, magnezij, selen, bakar i mangan. Udio ovih elemenata ovisi o klimatskim uvjetima i o vrsti tla gdje je biljka rasla.

Proteini u medu mogu biti biljnog i životinjskog podrijetla. Najveći udio proteina u medu potječe iz polena. Proteini se u medu nalaze u obliku otopine aminokiselina^K ili u obliku koloida. Najznačajniji proteini u medu su albumin i globulin. Određivanjem bjelančevina određuje se čistoća meda, odnosno prepoznaje je li med patvoren. Osim vezanih u proteine, med sadrži i slobodne aminokiseline, a najzastupljeniji je prolin. U medu su prisutni sljedeći enzimi: invertaza, dijastaza, katalaza, fosfataza, glukoza oksidaza, perkosidaza, esteraza, inulaza, kisela fosfataza. Prisustvo enzima u medu je svojstvo meda koje ga razlikuje od ostalih zaslađivača.

Med nije važan kao izvor vitamina. Med sadrži manju količinu vitamina skupine B i vitamina C te vitamine topljive u mastima. Ovisno o metodi dobivanja meda oni se mogu izgubiti. (npr. prilikom izvođenja filtracije desi se veliki gubitak polena, pa tako i svih vitamina koje polen sadrži).

^K U medu se nalazi 18 esencijalnih i neesencijalnih kiselina: prolin, lizin, histidin, arginin, asparaginska kiselina, leucin, izoleucin, tirozin, fenilalanin, glutaminska kiselina, serin, treonin, glicin, alanin, valin i triptofan.²⁰

Od sekundarnih biljnih metabolita u medu najznačajniji su flavonoidi i fenolne kiseline te vitamini. Flavanoidi koji se mogu pronaći u medu su: kamferol, pinocembrin, apigenin, galangin, krisin...^L Veći udio flavanoida je u polenu i propolisu nego u medu. Med sadrži sljedeće fenolne kiseline: kumarinska, galna, kafeinska, elaginska kiselina. Određivanjem fenolnih kiselina može se utvrditi biološko podrijetlo meda.^M Fenolni spojevi, prvenstveno flavonoidi i fenolne kiseline, nositelji su antioksidacijske aktivnosti meda. Fenolni spojevi određuju boju, ali i aromu meda. Antioksidacijska aktivnost meda u korelaciji je sa sadržajem ukupnih fenola i bojom meda. Veća količina fenolnih spojeva u medu znači bolju antioksidacijsku moć, a takav med je i tamniji.²⁰

1.6. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

U senzorska svojstva meda spadaju boja, okus i miris. Ona ovise o botaničkom podrijetlu meda i o uvjetima tijekom skladištenja i prerade. Senzorska analiza je važna za definiranje kvalitete meda i ona može ukazati na razna krivotvorenja meda.

Boja meda ovisi o botaničkom podrijetlu te može varirati od svijetložute do tamnosmeđe. Boja meda ovisi i o kemijskom sastavu meda, posebno o udjelu karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijanina, tanina i šećera. Med mijenja boju nakon procesa kristalizacije, odnosno boja postaje bljeđa zbog bijelih kristala glukoze.

Okus i miris su usko povezana senzorska svojstva koja zajedno čine aromu hrane i prehrambenih proizvoda pa tako i meda. Aroma^N prehrambenog proizvoda je jedna od njegovih važnijih značajki, ona određuje njegovu konkurenciju i potražnju na tržištu te je jedan od faktora za određivanje cijene proizvoda. Slatkoća meda ovisi o omjeru glukoze i fruktoze, prisustvu aminokiselina, eteričnih ulja, hlapljivih i nehlapljivih organskih kiselina. Miris meda uglavnom ovisi o biljci od koje med potječe. Svježi med je općenito aromatičniji jer su mirisni spojevi lako hlapljivi pa se čuvanjem i, posebno, zagrijavanjem meda gube i

^LU biljkama je funkcija flavanoida različita, npr. razvijanje jače boje kod biljke što je ključno za proces oprašivanja i privlačenje polinatora.²⁰

^MOdređivanjem fenolnih kiselina u medu možemo s većom točnošću i sigurnošću odrediti biološko podrijetlo meda nego određivajući flavanoide, koji mogu poticati od propolisa prilikom „kontaminacije“ meda propolisom.

^NGrč. aroma-mirodija; miris trave, naročito ugodan miris; aromatičan; -čna;-čno- mirisan; ugodnog mirisa, miomrisan isto i aromatički;aromat, -ata;-začin, mirisno sredstvo; aromatizirati,-iziran- snabdjeti aromom, začiniti, isto i aromatizovati, - ujem (Veliki rječnik stranih riječi, Bratoljub Klajjić).

miris meda slabi. Također, svježi med je aromatičniji od kristaliziranog meda jer se hlapljivi spojevi uklapaju u kristale.^{1,21,22}

1.7. HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU

Hlapljivi spojevi prisutni u medu odgovorni su za njegov miris. Aromatični profil određene vrste meda, odnosno sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u medu, najviše ovisi o vrsti biljke s koje su pčele skupljale nektar, vremenskim uvjetima i zemljopisnom položaju ispaše pčela. Međutim, hlapljivi spojevi mogu nastati i pretvorbom biljnih sastojaka od strane pčela kao i za vrijeme prerade meda (npr. zagrijavanjem meda) ili tijekom skladištenja meda.

Hlapljivi spojevi koji čine aromu meda pripadaju sljedećim grupama organskih spojeva:

- ✓ alkoholima
- ✓ ketonima
- ✓ aldehydima
- ✓ karboksilnim kiselinama
- ✓ esterima.

Hlapljivi spojevi koji se nalaze u medu su različitog biosintetskog porijekla, a prevladavaju terpenoidi, norizoprenoidi, derivati benzena te derivati furana i pirana.²²

1.7.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Općenito, za izolaciju hlapljivih spojeva neke namirnice, potrebno je poznavati tu namirnicu, ali i metodu izolacije kako bi se odabrala najoptimalnija za izolaciju hlapljivih spojeva. Med je vrlo složen supstrat za analizu. Hlapljivi spojevi prisutni su u medu u vrlo niskim koncentracijama u vrlo složenom matriksu. Za njihovu izolaciju koriste se različite metode. Laboratorijske metode koje se primjenjuju za izolaciju hlapljivih spojeva dijele se u nekoliko skupina:

- ✓ ekstrakcije otapalima
- ✓ destilacijske tehnike
- ✓ tehnike “vršnih” para
- ✓ sorpcijske tehnike.²²

1.7.1.1. Ekstrakcijske tehnike

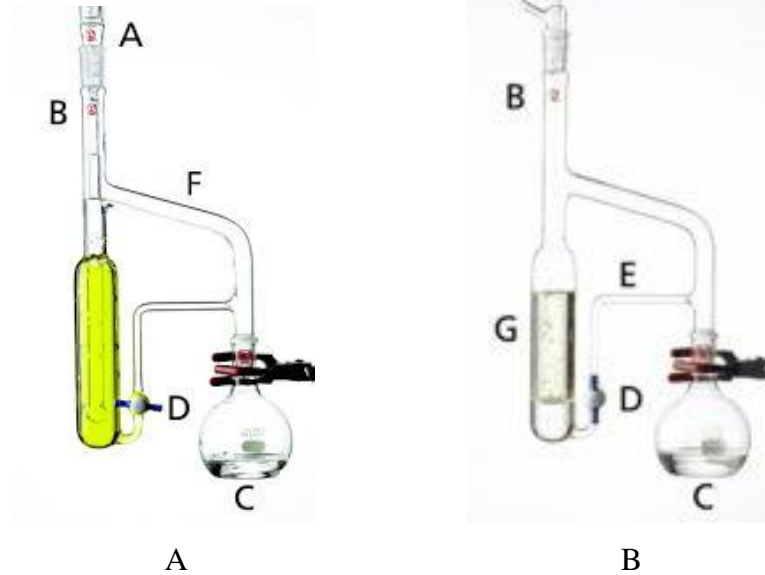
Ekstrakcija je metoda pročišćavanja i izolacije neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala.²³ Za ovu metodu najbitniji faktor je izbor otapala.^o Glavna prednost ove metode je jednostavnost izvedbe, no manu predstavlja upravo otapalo tj. njegova potencijalna toksičnost i zapaljivost te potreba uklanjanja iz ekstrakta. Naime, neuklonjeno otapalo može ometi daljnju analizu hlapljivih spojeva koja se provodi plinskom kromatografijom tako što može prekriti pikove hlapljivih spojeva od interesa. Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju su:

- ✓ diklormetan
- ✓ dietil-eter
- ✓ pentan
- ✓ smjesa pentana i dietil-etera
- ✓ heksan
- ✓ etanol
- ✓ aceton.

Izvedbe ekstrakcija koje se primjenjuju :

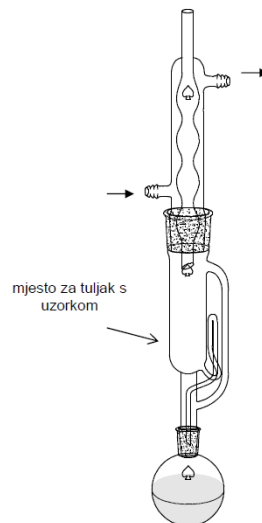
- Ekstrakcija tekuće-tekuće se provodi diskontinuirano, u lijevku za odjeljivanje, ili kontinuirano u ekstraktorima. Komercijalni ekstraktori za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće razlikuju se po izvedbi ovisno o tome jesu li namijenjeni za korištenje otapala lakših ili težih od vode (slika 1.10).

^o Otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima, ne smije imati visoko vrelište, mora se moći lako ukloniti, mora biti što manje zapaljivo, otrovno i jeftino, tvar koju želimo ekstrahirati mora imati što veću topljivost u tom otapalu...²³



Slika 1.10. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće: A - izvedba za otapala lakša od vode; B - izvedba za otapala teža od vode²²

- ✓ Ekstrakcija kruto-tekuće se koristi za ekstrakciju krutog uzorka iz kojeg se spojevi ekstrahiraju direktno ili se taj uzorak otopi u pogodnom otapalu. Jedna od laboratorijskih aparatura koja se najčešće koristi za ovu vrstu ekstrakcije je aparatura po Soxhletu (slika 1. 11). Ekstrakcija u aparaturi po Soxhletu je kontinuirani proces, budući da otapalo stalno kruži kroz tuljac s uzorkom te se kondenzira i vraća u tikvicu s ekstraktom.²²

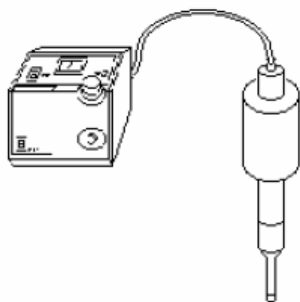


Slika 1.11. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu²²

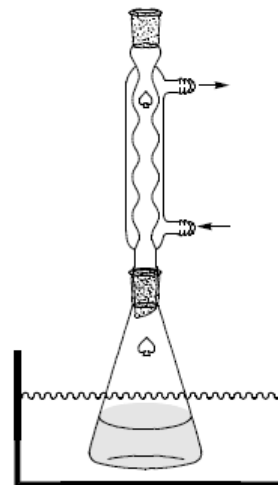
- ✓ Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (engl. *ultrasound-assisted solvent extraction*, USE) je jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama. USE je oblik ekstrakcije kod koje se koristi ultrazvuk frekvencije između 20 i 2000 kHz. Tijekom ultrazvučne ekstrakcije dolazi do povećanja propusnosti staničnih stijenki i pojave kavitacije koja dovodi do bubrenja stanice i pucanja stanične stijenke čime se znatno ubrzavaju procesi difuzije i omogućeno je jednostavnije istjecanje sastojka iz stanice. Prednost ove metode je to što je brza i učinkovita, koristi male količine otapala i provodi se pri niskim temperaturama.

Postoje dvije izvedbe ove ekstrakcije:

- ✓ izravna ultrazvučna ekstrakcija koja koristi ultrazvučne sonde koje se postavljaju u otopinu s uzorkom (slika 1.12)
- ✓ neizravna ultrazvučna ekstrakcija koja koristi ultrazvučnu kupelj (slika 1.12).



izravna ultrazvučna ekstrakcija



neizravna ultrazvučna ekstrakcija

Slika 1.12. Ultrazvučna ekstrakcija²²

1.7.1.2. Destilacijske tehnike

Destilacija je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru koja se odvodi i hlađenjem kondenzira, a kondenzat se skuplja u drugu posudu.²³ Glavna prednost destilacije je što destilat sadrži samo hlapljive spojeve što omogućuje analizu plinskom kromatografijom, odnosno u destilatu nema spojeva koji bi mogli kontaminirati kromatografsku kolonu. Najveći nedostatak destilacije je primjena temperature koja može uzrokovati nastanak toplinskih artefakata.^P Izvedbe destilacije su sljedeće:

- ✓ hidrodestilacija
- ✓ vodeno-parna destilacija
- ✓ destilacija vodenom parom.

Razlika navedene tri destilacije je u kontaktu uzorka i vode tj. vodene pare. Prilikom hidrodestilacije uzorak i voda su u neposrednom kontaktu, nalaze se u istoj aparaturi (tikvici) te se istovremeno zagrijavaju. Kod vodeno-parne destilacije uzorak je odvojen od prostora za zagrijavanje vode te je nastala vodena para u kontaktu s uzorkom.²²

Destilacijske tehnike nisu pogodne metode za izolaciju hlapljivih spojeva meda jer uključuju zagrijavanje. Toplinska obrada meda može dovesti do nastanka toplinskih artefakata, derivata furana i pirana, zbog utjecaja topline na ugljikohidrate ili aminokiseline.

1.7.1.3. Tehnike izolacije vršnih para

Vršne pare (engl. *headspace*) su skupni naziv za najisparljivije spojeve koji se nalaze u ravnoteži s uzorkom.¹⁷ Tehnike izolacije (uzorkovanja) i analize vršnih para ili, kraće, *headspace* tehnike (HS), su separacijske tehnike kojima se lakohlapljivi sastojci izdvajaju iz složenog matriksa i automatski injektiraju u plinski kromatograf gdje se vrši analiza. *Headspace* tehnika se, općenito, definira kao ekstrakcija plinovite faze, a uključuje raspodjelu analita između nehlapljive tekućine ili čvrste faze te plinovite faze iznad tekućine ili krutine.

Tehnike izolacije vršnih para imaju velike prednosti u odnosu prethodno navedene metode izolacije hlapljivih spojeva, jer su brze i jednostavno se izvode, a prilikom rada ne koristi se otapalo tako da nema kontaminacije uzorka otapalom. Za izolaciju i analizu

^P Artefakti su spojevi koji nisu prisutni u izvornom uzorku, već su nastali dekompozicijom ili reakcijom individualnih isparljivih spojeva tijekom izolacije.²⁴

potrebna je mala količina uzorka, a ne nastaju ni toplinski artefakti. No, i ove tehnike imaju mane kao što su:

- ✓ udio sastojaka u vršnim parama ne predstavlja njihov udio u uzorku zbog razlika u hlapljivosti pojedinih spojeva,
- ✓ profil hlapljivih spojeva ovisan je o temperaturi i masi (volumenu) uzorka i posudice u kojoj se nalazi.

Tehnike vršnih para se dijele na:

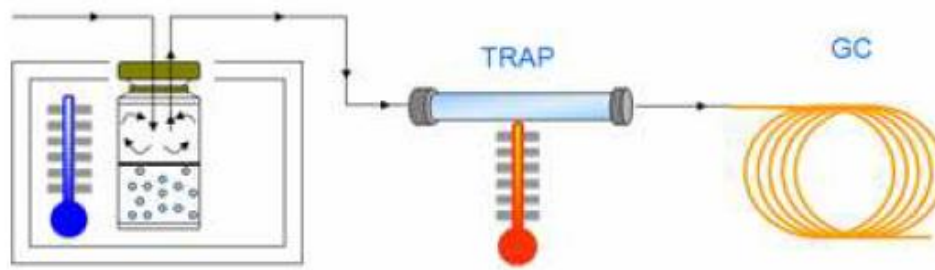
- ✓ statičke (slika 1.13)
 - ✓ dinamičke (slika 1.14)²²
- glavna razlike ove dvije izvedbe je u tome kako i kada se “odvode” vršne pare u kromatografsku kolonu



Slika 1.13. Statička tehnika vršnih para²²

Kod statičke *headspace* izolacije, uzorak se nalazi u hermetički zatvorenoj bočici, tzv. *headspace* vialici koja se zagrijava na određenu temperaturu. Kad se uspostavi ravnoteža, dio plinovite faze iznad uzorka, vršne pare, se automatski injektira u plinski kromatograf.

Kod dinamičke tehnike vršnih para (slika 1.14), isparljivi spojevi se kontinuirano odvođe plinom nositeljem iz prostora iznad uzorka.



Slika 1.14. Dinamička tehnika vršnih para²²

Prednost dinamičkog HS u odnosu na statički HS je u tome što kod ove tehnike volumen vialice nije ograničavajući faktor, jer se vršne pare konstantno odvođe iz vialice, a hlapljivi spojevi se koncentriraju adsorpcijom na trapu što povećava osjetljivost metode.²⁴

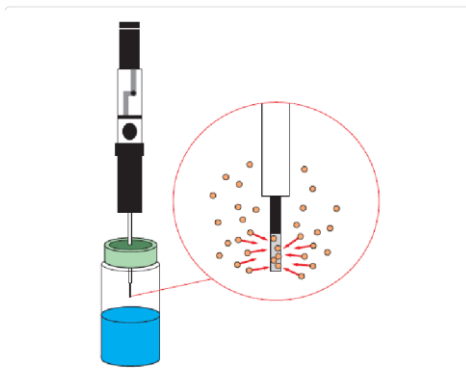
1.7.1.4. Sorpcijske tehnike

Prednost sorpcijskih tehnika izolacije hlapljivih spojeva su brzina izvođenja i nekorisćenje otapala. Dvije vrste ove tehnike su:

- ✓ mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid phase microextraction*, HS-SPME)
- ✓ sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (engl. *stir bar sorptive extraction*, SBSE).²⁴

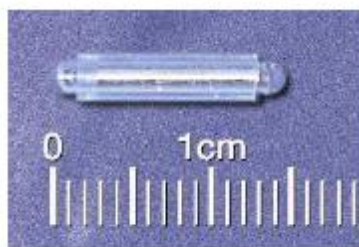
Sorpcijske tehnike temelje se na particiji organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. Hlapljivi spojevi se skupljaju na polimernom filmu, vlaknu ili štapiću.

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristi silikonska vlakna prekrivena polimernim filmom za adsorpciju (sakupljanje) hlapljivih spojeva iz uzoraka. Vlakno se nalazi u sastavu igle koja je postavljena na SPME držač za uzorkovanje i desorpciju (slika 1.15). Izolacija hlapljivih spojeva iz uzorka se provodi tako da se uzorak stavi u posudu koja se hermetički zatvori i zagrijava. Zatim se u prazni prostor iznad uzorka uvodi igla s vlaknom na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi koji su isparili iz uzorka tijekom zagrijavanja, tzv. vršne pare. Potom se vlakno uvlači, a vršne pare se desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa. Mane ove tehnike su što je ovisna o vremenu i temperaturi uzorkovanja te debljini i vrsti vlakna, a i neka vlakna su diskriminirajuća za polarne spojeve.



Slika 1.15. Shematski prikaz ekstrakcije HS-SPME tehnikom

Sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću prekrivenom filmom adsorbensa (slika 1.16) je također jednostava i brza tehnika, a najveći problem je desorpcija spojeva nakon uzorkovanja.



Slika 1.16. Miješajući štapić²²

1.7.2. Analiza hlapljivih spojeva

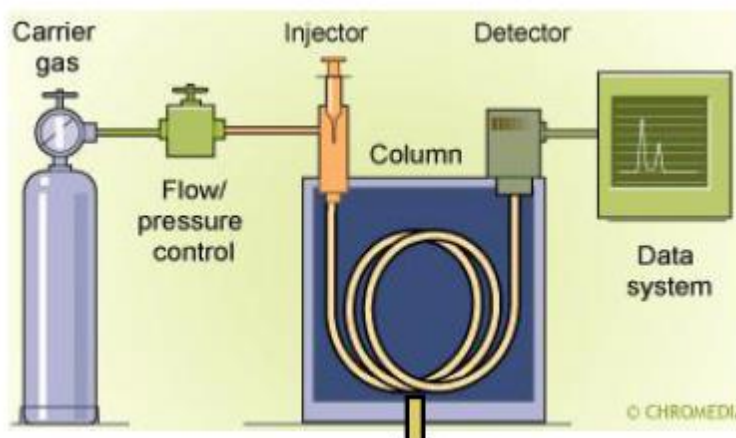
Najbolja instrumentna metoda za analizu hlapljivih spojeva je plinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa kao metodom detekcije, kraće spregnuta tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS). Plinska kromatografija i spektrometrija masa su metode koje se odlično nadopunjuju, a njihovom kombinacijom se može postići vrlo visoka osjetljivost.

1.7.2.1. Plinska kromatografija i spektrometrija masa

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja tvari u smjesi na temelju njihove razdiobe između dviju faza, nepokretne odnosno stacionarne faze i pokretne odnosno mobilne faze. Kromatografija se najčešće dijeli prema agregatnom stanju mobilne faze na plinsku (engl. *gas chromatography*, GC) i tekućinsku kromatografiju (engl. *liquid chromatography*, LC).

Plinska kromatografija, GC, je instrumentna metoda odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva. Kod plinske kromatografije dolazi do raspodjele uzorka, koji mora biti u plinovitom stanju, između inertnog plina koji je mobilna faza i tekuće ili čvrste stacionarne faze. Uređaj za plinsku kromatografiju se naziva plinski kromatograf, a sastoji se od injektora, kromatografske kolone koja je smještena u termostatiranom prostoru, tzv. peći, detektora i računala (slika 1.17). Injektor i detektor su zagrijani na višu temperaturu nego sama kromatografska kolona kako bi pri injektiranju osiguralo prevođenje tekućeg uzorka u plinovito stanje te spriječila kondenzacija odijeljenih sastojaka koji ulaze u detektor. Inertni plin - plin nositelj, prenosi pare uzorka od injektora preko kolone, gdje se odijele sastojci smjese, do detektora. Za odjeljivanje sastojaka primjenjuje se postupak eluiranja ili ispiranja. Sastojci uzorka koje se eluiraju s kolone u detektoru se registriraju na temelju neke fizikalne ili kemijske promjene. Karakterističan podatak za svaki eluirani sastojak je njegovo vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme, t_R . Vrijeme zadržavanja je vrijeme između injektiranja uzorka i odziva detektora, tj. pojave signala na detektoru. Ono ovisi o prirodi eluiranog sastojka i vrsti stacionarne faze, ali i o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i dr.

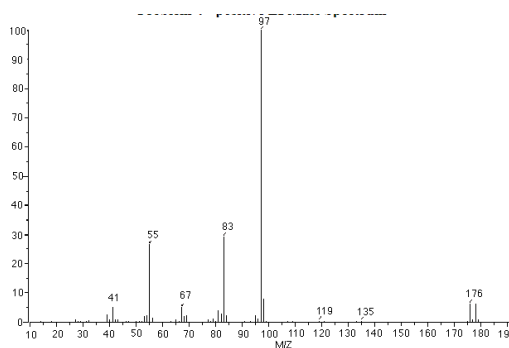
Najčešći detektori u plinskoj kromatografiji su plameno ionizacijski detektor, detektor toplinske vodljivosti i detektor apsorpcije elektrona (slika 1.17). Plinska kromatografija u kombinaciji s navedenim detektorima prvenstveno služi za kvantitativnu analizu, tj. određivanje količine tvari u smjesi. Za potrebe kvalitativne analize smjesa hlapljivih spojeva plinska kromatografija se povezuje s nekom od spektroskopskih metoda kao što su masena spektroskopija, infracrvena spektroskopija i nuklearna magnetska rezonancija. Tako nastaju kombinirane (vezane, spregnute) tehnike koje spajaju sposobnost odjeljivanja kromatografije s mogućnošću kvalitativne i kvantitativne analize koje imaju spektroskopske metode.



Slika 1.17. Shematski prikaz plinskog kromatografa²⁵

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda kojom se može odrediti relativna molekulska masa spoja. MS je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari jer je spektar masa karakterističan za pojedinu tvar. Princip rada uređaja je da se molekule uzorka bombardiraju elektronima visoke energije koji uzrokuju izbijanje elektrona iz molekule te nastajanje molekulskog iona visoke energije sklonog cijepanju u fragmente. Nabijeni fragmenti, kationi, dolaze do detektora masa, gdje se razdvajaju prema njihovoj masi, točnije prema omjeru mase i naboja.²⁸ Rezultati MS analize, maseni spektri, se prikazuju u obliku dijagrama (slika 1.18).

Prednost spektrometrije masa je njena visoka osjetljivost i točnost. Identifikacija nepoznatog spoja provodi se usporedbom masenog spektra tog spoja s masenim spektrom iz baza spektara poznatih tvari, tako da se nađe identičan maseni spektar.²⁶



Slika 1.18. Primjer spektra masa²⁷

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su metode koje su idealne za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju. Plinska kromatografija vrlo je uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa pogodna upravo za kvalitativnu analizu. Obje metode su vrlo osjetljive te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenata u redu pikogramskih, 10^{-12} g, pa čak i femtogramskih, 10^{-15} g, količina uzoraka.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. OBITELJSKO POLJOPRIVREDNO GOSPODARSTVO TRUPINA

Med koji je korišten u ovom radu proizveden je na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu Trupina osnovanom 2015. godine. Osnivač OPG-a Mato Trupina pčelarstvom se počeo baviti kao hobijem, a to je kasnije preraslo u mali obiteljski posao. Od dvije-tri košnice, koje pčelari vrlo rado i uvijek poklanjaju jedni drugima za početak, danas je u OPG-u registrirano 60 društava. Med se prodaje isključivo na kućnom pragu, što znači da nije uveden u trgovačke lance. Kroz godine držanja pčela M. Trupina je nailazio na razne probleme, od trovanja i uginuća pčela, „posjete“ medvjeda do problema s kemikalijama koje se nalaze u okolišu. Obiteljski pčelinjak (slika 2.1) je zimi smješten u selu Potkraju, dok se u proljeće, početkom svibnja, košnice sele na sjever, u Odžak. Početkom jeseni pčele se smještaju na planinu Vlašić (slika 2.2).



Slika 2.1. Pčelinjak u srednjoj Bosni



Odžak 45°04 N 18°27 E

Potkraj 44°15'22"N; 17°33'40"E
 Vlačić 44°16'58"N; 17°38'24"E; nadmorska
 visina 1943m, Paljenik najveći vrh

Slika 2.2. Karta Bosne i Hercegovine²⁸

Proizvodi OPG-a Trupina su (slika 2.3):

- planinski med
- cvjetni med
- propolis
- polen
- vosak.



Slika 2.3. Proizvodi OPG-a na sajmu malina u Novom Travniku, BiH

2.2. KEMIKALIJE I APARATURA

Kemikalije:

- ✓ destilirana voda
- ✓ pentan, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ✓ dietil - eter, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ✓ natrijev sulfat, bezvodni, p.a., Gram - Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

Aparature:

- ✓ tehnička vaga, Kern 572, Velika Britanija
- ✓ ultrazvučna kupelj, Elma D – 78224, Njemačka
- ✓ aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- ✓ magnetska miješalica, model MR Hei - Standard s termostatom i temperaturnom probom, model EKT 3001, Heidolph, Njemačka
- ✓ aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa SPME vlaknom PDMS/DVB (polidimetilsiloksa/divinilbenzen), Supelco, SAD
- ✓ centrifuga, Centric 322A, Tehnica, Slovenija
- ✓ vezani sustav plinska kromatografija–spektometrija masa, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD:
 - plinski kromotograf model 7820A
 - spektrometar masa model 5977E.

2.3. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena su dva uzorka meda i to:

- ✓ livadni med OPG-a Trupina - Vlačička livada, proizvodnja 2019. BiH (slika 2.4)



Slika 2.4. Med proizvodnja 2019.

- ✓ livadni med sa dijelovima saća OPG-a Trupina - Vlačička livada, proizvodnja 2018., BiH (slika 2.5)



Slika 2.5. Med proizvodnja 2018.

Hlapljivi spojevi meda izolirani su ultrazvučnom ekstrakcijom (USE), ekstrakcijom tekuće-tekuće i mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).

2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija (USE)

Ultrazvučna ekstrakcija je ustvari ekstrakcija organskim otapalom potpomognuta ultrazvučnim valovima. Hlapljivi spojevi meda izolirani su ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom, smjesom pentan : dietil-eter = 1:2, v/v. Aparatura za USE sastojala se od Erlenmeyerove tikvice, Liebigovog hladila i ultrazvučne kupelji (slika 2.6).



Slika 2.6. Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju

U Erlenmeyerovu tikvicu je izvagano 40 g meda i dodano 22 mL destilirane vode (tablica 1) te 1,5 g bezvodnog natrijevog sulfata. Smjesa je intenzivno promiješana. U tako pripravljenu otopinu dodano je otapalo za ekstrakciju, 20 mL smjese dietil-etera i pentana. Zatim je tikvica uronjena u ultrazvučnu kupelj, postavljeno je povratno hladilo te je započeta ekstrakcija. Vrijeme trajanja ekstrakcije je 30 minuta pri temperaturi 25 ± 3 °C i frekvenciji 35 kHz. Nakon završetka ekstrakcije i hlađenja, ekstrakt je centrifugiran u trajanju od 5 minuta pri 3000 omin^{-1} radi što boljeg odjeljivanja slojeva (slika 2.7). Potom je iz uzorka odijeljen gornji, organski sloj pomoću kapaljke i osušen filtriranjem preko lijevka u kojem se nalazila pamučna vata, a iznad nje bezvodni Na_2SO_4 .



Slika 2.7. Centrifuga

Postupak je ponovljen još dva puta, uz dodatak nove količine otapala. Dobiveni organski ekstrakti su združeni (slika 2.8) i koncentrirani na volumen od oko 2 mL, odnosno uklonjeno je organsko otapalo frakcijskom destilacijom uz zagrijavanje tikvice s uzorkom preko vodene kupelji (slika 2.9). Tako je dobiven uzorak za GC-MS analizu koji je čuvan u zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku do GC-MS analize.



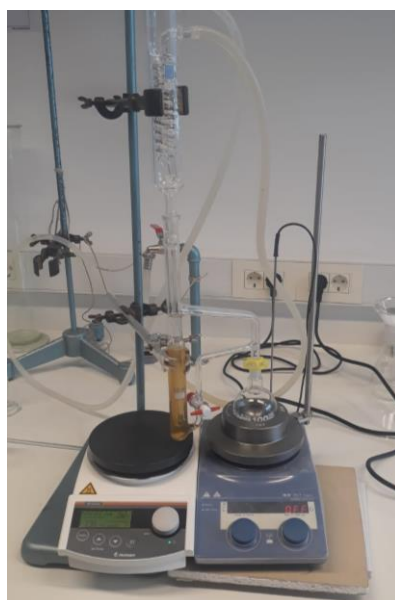
Slika 2.8. Ekstrakti nakon USE (lijevo) i nakon centrifugiranja (desno)



Slika 2.9. Koncentriranje ekstrakata frakcijskom destilacijom

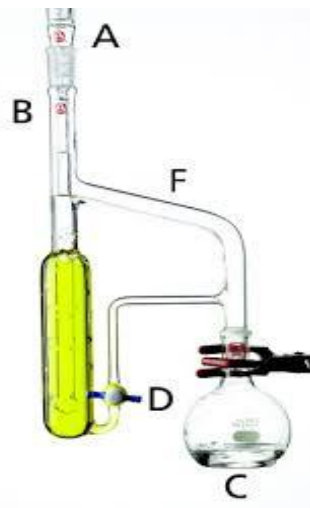
2.3.2. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće provedena je u komercijalnom ekstraktoru, a kao otapalo korištena je smjesa pentan : dietileter 1:2, v/v. Aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće sastojala se od ekstraktora s hladilom po Allihnu i tikvice s okruglim dnom od 100 mL, vodene kupelji, električnog kuhala i magnetske miješalice (slika 2.10).



Slika 2.10. Aparatura za ekstrakciju tekuće-tekuće za otapala lakša od vode

Za otapala lakša od vode (slika 2.11), u ekstraktor (B) je potrebno umetnuti adapter koji omogućava da otapalo koje se zagrijava u tikvici (C) i isparava pa potom kondenzira u hladilu (A) kroz cijev adaptera dolazi do dna ekstraktora odakle difundira kroz vodeni sloj. Zbog manje gustoće otapala od vode, ono se uzdiže kroz vodeni sloj i pritom ekstrahira željene tvari. Ekstrakcijsko otapalo reciklira se preko bočne cijevi (F) natrag u tikvicu (C). Za vrijeme ekstrakcije pipac (D) mora biti zatvoren.



Slika 2.11. Shematski prikaz ekstraktora za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće za otapala lakša od vode²²

U Erlenmeyerovu tikvicu odvagano je 15 g meda i dodano 25 ml destilirane vode te je smjesa snažno potresivana kako bi se med otopio. Nakon sastavljanja aparature, u ekstraktor je uliven pripremljeni uzorak i umetnut je adapter (uska cjevčicu sa malim otvorom na dnu). Potom je dodano otapalo za ekstrakciju, smjesa pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Ekstrakcija se kontinuirano odvijala 3 sata. Nakon završetka ekstrakcije, čitava smjesa (uzorak i organsko otapalo) je ulivena u kivete za centrifugiranje. Centrifugiranje je provedeno pri 3000 o/min u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja, gornji, organski sloj je odijeljen kapaljkom, filtriran na prethodno opisan način i pridružen u tikvicu u kojoj se nalazila većina organskog ekstrakta. Organski ekstrakt je koncentriran, odnosno uklonjeno je organsko otapalo frakcijskom destilacijom uz zagrijavanje tikvice s uzorkom preko vodene kupelji. Tako je dobiven uzorak za GC-MS analizu koji je čuvan u zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku do GC-MS analize.

2.3.3. Mikroekstrakcija vršnih para (HS-SMPE)

Uzorak za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (2 g meda u 2 mL zasićene otopine NaCl) je stavljen u staklenu bočicu volumena 20 mL te je bočica hermetički zatvorena teflonskom septom. Bočica s uzorkom je stavljena u vodenu kupelj zagrijanu na 60 °C koja je pripremljena na magnetskoj miješalici. Tijekom 15 minutnog termostatoriranja hlapljivi spojevi iz uzorka su isparili u prazni prostor iznad uzorka.

U skladu s uputama, plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 minuta na 250 °C postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzorka.

Nakon kondicioniranja vlakna, u prazni prostor iznad uzorka uvedena je SPME igla s vlaknom radi adsorpcije hlapljivih spojeva. Adsorpcija vršnih para vršena je 40 minuta. Nakon adsorpcije SPME vlakno vraćeno je u iglu, izvučeno iz bočice s uzorkom i odmah umetnuto u GC - MS injektor gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (250 °C, 7 minuta).

2.4. GC - MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom - spektrometrijom masa (GC-MS). Pri tom je korišten vezani sustav GC-MS proizvođača Agilent Technologies. Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa 7820A i spektrometra masa 5977E (slika 2.12).



Slika 2.12. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Analize su izvršene na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies (5% difenil-95% dimetilpolisilksan, 30 m x 0,25 mm, debljina sloja stacionarne faze 0,20 μm). Plin nositelj je helij protoka 1mL/min, omjer cijepanja 50:1, temperatura injektora iznosila je 250°C, temperatura detektora 280°C, a energija ionizacije 70 eV.

Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3 min pri 70°C, zatim zagrijavanje od 70°C do 200°C brzinom od 3°C/min i zadržavanje od 2 min pri 200°C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara (Wiley9 i NIST17) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Za svaki uzorak analiziran GC-MS sustavom dobiveni su sljedeći rezultati:

- ✓ kromatogram ukupne ionske struje
- ✓ vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- ✓ relativni udio pojedinog sastojka izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini) i
- ✓ naziv spoja ili spojeva čiji je spektar najbliži spektru nepoznate komponente (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postotcima).²⁶

3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi izolirani su iz livadnog meda proizvođača OPG Trupina (dva uzorka, med iz 2019. god. i med iz 2018. god.) metodama ultrazvučne ekstrakcije, USE, ekstrakcijom tekuće-tekuće i mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME (poglavlje 2.3.). Dobiveno je šest uzoraka hlapljivih spojeva, a svi su analizirani vezanim sustavom GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 1 - 3. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

1 – livadni med 2019. godina

2 – livadni med 2018. godina

/ - spoj nije identificiran u uzorku

* - točan izomer nije određen

^a – spoj identificiran samo na temelju masenog spektra, odnosno usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i NIST17 biblioteka masenih spektara.

Tablica 1. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u ekstraktima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			1	2
1.	benzaldehyd	5,50	/	0,4
2.	<i>cis</i> -linalol oksid	8,82	/	0,3
3.	2-feniletanol	10,39	/	1,0
4.	benzojeva kiselina	13,14	0,1	/
5.	dekanal ^a	13,90	/	0,5
6.	2-feniloctena kiselina	16,63	0,1	/

7.	siringaldehid	32,37	0,9	5,2
8.	neidentificirani ravnolančani CH	33,90	0,4	/
9.	5-metil-2- <i>tert</i> -butilfenol ^a	34,09	0,5	/
10.	metil-siringat	36,30	2,0	/
11.	4-hidroksi-3,5,5-trimetil -4-(3-oksobuten-1-il)ciklo- heks-2-en-1-on	37,05	1,0	1,2
12.	nonadekan	40,47	/	1,2
13.	palmitinska kiselina	42,76	2,0	/
14.	etil-palmitat	43,54	/	2,0
15.	eikosan	43,69	/	0,7
16.	ceril-alkohol	46,22	0,3	/
17.	heneikosan	46,88	/	7,6
18.	linolna kiselina	48,35	/	0,4
19.	etil-oleat	49,48	/	4,5
20.	dokosan	50,02	85,9	6,4
21.	dokosan-1-ol ^a	53,53	0,1	/
22.	oktadec-1-en ^a	54,63	/	1,6
23.	trikosan	56,37	0,4	66,9
Identificirano			93,7	99,9

Tablica 2. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom tekuće-tekuće

Red. broj	Spoj	<i>t_R</i> (min)	Udio (%)	
			1	2
1.	<i>p</i> -benzokinon ^a	4,50	1,4	1,9
2.	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	15,42	/	2,0

3.	ar-kurkumen	25,35	/	3,8
4.	siringaldehid	32,37	/	46,4
5.	oktadekan	37,35	2,2	/
6.	palmitinska kiselina	42,76	41,2	4,3
7.	heneikosan	46,88	/	4,7
8.	trikosan	56,37	/	20,7
9.	neidentificirani ravnolančani CH	63,20	42,7	/
Identificirano			87,5	83,8

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama (HS-SPME)

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%)	
			1	2
1.	etil-butanoat	2,67	0,2	/
2.	furfural	3,20	/	2,9
3.	benzaldehyd	5,50	/	25,3
4.	etil-heksanoat	6,49	0,4	/
5.	2-fenilacetaldehyd	7,86	0,9	4,6
6.	<i>cis</i> -linalol oksid	8,82	/	22,4
7.	<i>trans</i> -linalol oksid	9,41	/	5,4
8.	stiren ^{a,*}	9,42	1,0	/
9.	nonanal	9,90	0,3	/
10.	hotrienol ^a	10,00	/	8,3
11.	2-feniletanol	10,39	/	11,2
12.	aldehid jorgovana ^{a,*}	11,42	/	5,3
13.	aldehid jorgovana ^{a,*}	11,74	/	6,4
14.	1-metil-2-(propen-2-il)benzen ^a	13,20	0,8	/
15.	etil-oktanoat ^a	13,56	11,0	/

16.	<i>p</i> -alilanol ^a	13,65	3,2	/
17.	(<i>Z</i>)-anetol ^{a,*}	15,88	4,4	/
18.	(<i>E</i>)-anetol ^{a,*}	17,29	68,2	/
19.	etil-dekanoat ^a	21,83	7,1	/
<hr/>				
	Identificirano		97,5	91,8
<hr/>				

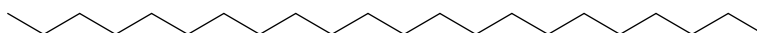
4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti hlapljive (i poluhlapljive) spojeva iz dva uzorka livadnog meda istog proizvođača (OPG Trupina, Bosna i Hercegovina), ali različite godine vrcanja, 2018. i 2019. godine. Za izolaciju su korištene tri metode, ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE), ekstrakcija tekuće-tekuće i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Svi uzorci hlapljivih spojeva su potom analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa na nepolarnoj HS-SPME koloni. Prilikom izvođenja ultrazvučne ekstrakcije i ekstrakcije tekuće-tekuće korišteno je isto organsko otapalo, smjesa otapala pentan: dietil-eter 1:2 v/v. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 1-3 (stranice 38.-41.).

4.1. PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIVADNOG MEDA IZOLIRANIH ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM

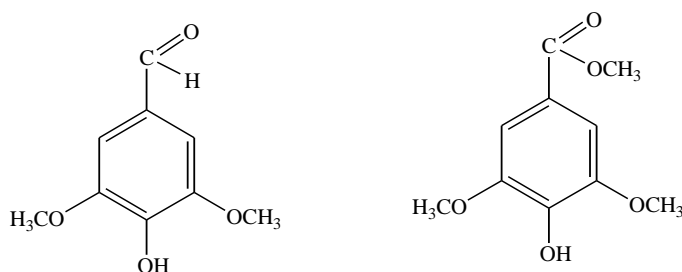
Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom je metoda kojom se osim hlapljivih izoliraju i poluhlapljivi spojevi. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih (i poluhlapljivih) spojeva oba uzorka, izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom, prikazan je u tablici 1. Uzorak 1 je med iz ove, 2019. godine, a uzorak 2 „stari“ med, tj. med iz 2018. godine. U uzorku 1 je identificirano 12 spojeva koji čine 93,7% od ukupnog uzorka. Glavni spoj u uzorku je ravnolančani ugljikovodik dokosan čiji udio iznosi 85,9% (slika 4.1). Ostali identificirani spojevi sa znatno manjim udjelima su metil-siringat (2,0%), palmitinska kiselina (2,0%), 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4(3-oksobuten-1-il)ciklo-heks-2-en-1-on (1,0%) i siringaldehid (0,9%). Udio ostalih identificiranih spojeva je manji od 1,0%.

Dokosan spada u skupinu viših ravnolančanih ugljikovodika molekulske fomule $C_{22}H_{46}$. Linearni ugljikovodici vjerojatno potječu iz okruženja košnice i karakteristični su za kemijski sastav voska. Istraživanja su pokazala da kemijski sastava voska, tj. udio i vrsta ugljikovodika, ovisi o vrsti pčele roda *Apis*.²⁹ Ovi se spojevi ne mogu koristiti kao markeri za određivanje biološkog podrijetla meda.



Slika 4.1. Struktura dokosana

U ovom uzorku meda identificirano je nekoliko fenolnih spojeva s ukupnim udjelom 3,6%, a najzastupljeniji su metil-siringat (2,0%) i siringaldehid (0,9%) (slika 4.2). Metil-siringat je trivijalno ime estera metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoata. Fenolni spojevi dopijevaju u med prilikom pčelinjeg unosa biljnog nektara ili medne rose u košnicu kao i iz pčelinjeg voska. Ovi spojevi imaju važnu ulogu u ispitivanju uniflornosti meda te je ustanovljeno da su oni markeri biološkog podrijetla meda *Asphodelus microcarpus* sa Sardinije.³⁰



Slika 4.2. Strukture siringaldehida i metil-siringata

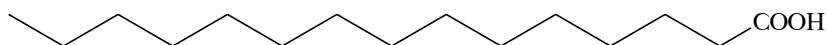
U ovom uzorku također je identificiran spoj 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4(3-oksobuten-1-il)ciklo-heks-2-en-1-on koji pripada skupini C_{13} norizoprenoida koji nastaju prilikom kemijske ili enzimatske razgradnje karotenoida, prirodnih nestabilnih spojeva zbog tipične strukture s konjugiranim dvostrukim vezama. C_{13} Norizoprenoidi su najzastupljeniji norizoprenoidi u prirodi.

U uzorku 2 je identificirano 15 spojeva koji čine 99,9% od ukupnog uzorka. Glavni spoj u uzorku je trikosan, $C_{23}H_{48}$ (66,9%), a ostali identificirani spojevi su heneioksan, $C_{21}H_{44}$ (7,6%), dokosan, $C_{22}H_{46}$ (6,4%), siringaldehid (5,2%), etil-oleat (4,5%), etil-palminat (2,0%), nonadekan i 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-oksobuten-1-il)ciklo-heks-2-en-1-on (1,2%).

U ovom uzorku je identificiran veći broj alifatskih ravnolančanih ugljikovodika u odnosu na uzorak 1 (5 prema 2), a njihov ukupni udio je 82,8%. Vjerojatni razlog tome što je uzorak 2 imao više saća, a što je bilo vidljivo čak i golim okom (vidi sliku 2.5). Trikosan je viši alifatski ugljikovodik ($C_{23}H_{48}$) koji najvjerojatnije nastaje razgradnjom viših masnih kiselina, a tipični je predstavnik toplinskih artefakata u medu. Također, i nešto veći ukupni udio fenolnih spojeva u uzorku 2 nego u uzorku 1 (6,6% prema 3,6%) ukazuje na veći sadržaj voskova u ovom uzorku. Identificirani su i manji udjeli alkohola i kiselina.

4.2. PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIVADNOG MEDA IZOLIRANIH EKSTRAKCIJOM TEKUĆE-TEKUĆE

Ekstrakcija tekuće-tekuće provedena je kontinuirano i s istim organskim otapalom kao i ultrazvučna ekstrakcija, smjesom pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Kemijski sastav i sadržaj (udio) hlapljivih i poluhlapljivih spojeva u oba uzorka livadnog meda prikazan je u tablici 2. U uzorku 1 identificirana su samo 3 spoja. Jedan spoj nije u potpunosti identificiran, ali je vjerojatno ravnolančani ugljikovodik sa više od 23 C atoma u lancu. Četiri spoja čine 87,5% uzorka. Identificirani spojevi su palmitinska kiselina (42,7%), oktadekan (2,2%) i *p*-benzokain (1,4%) te neidentificirani ravnolančani ugljikovodik s udjelom 42,7%. Prisustvo palmitinske kiseline (slika 4.3) u medu može se povezati s prisustvom polena u medu, jer je poznato da je palmitinska kiselina jedna od četiri glavne masne kiseline u kemijskom sastavu polena.



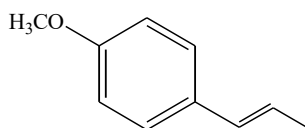
Slika 4.3. Struktura palmitinske kiseline

U uzorku 2 je identificirano 7 spojeva koji čine 83,8% ukupnog uzorka. Glavni sastojci u uzorku hlapljivih spojeva su siringaldehid (46,4%) i trikosan (20,7%), a slijede palmitinska kiselina (4,3%), heneioksan (4,7%), ar-kurkumen (3,8%), HMF (2,0%) i *p*-benzokinon (1,9%). Karakteristika ovog uzorka hlapljivih spojeva je znatno veći udio siringaldehida nego među hlapljivim spojevima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom iz istog meda (46,4% prema 5,2%). Za razliku od siringaldehida udio trikosana u ovom uzorku je znatno manji nego u uzorku hlapljivih spojeva dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom (20,7% prema 66,9%). U uzorku 2 identificiran je i 5-hidroksimetilfurfural, HMF, koji je poznati produkt Maillardove reakcije i pokazatelj starosti meda te neprikladnih uvjeta skladištenja. HMF je tipični toplinski artefakt. Inače, HMF je prirodni sastojak meda, koji nastaje dehidratacijom fruktoze i u medu je prisutan u malim količinama, a njegov udio se povećava zagrijavanjem meda na temperaturama većim od 20 °C. Udio HMF-a u ovom uzorku je 2,0% iz čega se može zaključiti da je med, iako je riječ o prošlogodišnjem medu, pravilno skladišten i nije bio podvrgnut nikakvoj toplinskoj obradi. U uzorku je identificiran također i jedan terpen - ar-kurkumen (3,8%).

Iz navedenog je vidljivo da ova metoda izolacija hlapljivih spojeva, ekstrakcija tekuće-tekuće, nije prikladna za izolaciju hlapljivih spojeva iz meda. Uspješnost izolacije u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju uz korištenje istog otapala je znatno lošija. Izolirano je manje spojeva, a i uspješnost identifikacije je ispod 90%. Med je gusta, viskozna smjesa, a za ekstrakciju je trebalo pripremiti otopinu meda u vodi. Nadalje, aparatura za ekstrakciju koja je korištena u ovom radu je malog volumena, tako da je količina uzorka iz kojeg su izolirani hlapljivi spojevi bila manja u odnosu na količinu uzorka upotrijebljenu za ultrazvučnu ekstrakciju, a i volumen otapala za ekstrakciju je bio manji.

4.3. PROFIL HLAPLJIVIH SPOJEVA LIVADNOG MEDA IZOLIRANIH MIKROEKSTRAKCIJOM VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u oba uzorka meda, izoliranih mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi, prikazan je u tablici 3. U vršnim parama uzorka 1 je identificirano 11 spojeva koji čine 97,5% od uzorka. Glavni spoj u vršnim parama je monoterpeni eter (*E*)-anetol (68,2%), a identificiran je i njegov izomer (*Z*)-anetol (4,4%) (slika 4.4). Ova dva izomera u prirodi uvijek dolaze zajedno, a *trans*-izomer je uvijek glavni u smjesi. Anetol je glavni sastojak eteričnog ulja komorača, pa je vjerojatno porijeklo ovog spoja u livadnom medu iz nektara, odnosno ispaše pčela na livadama na kojima raste komorač.

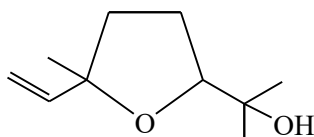


Slika 4.4. Strukturna formula anetola

Kvantitativno značajni sastojci u vršnim parama uzorka 1 su i dva etilna estera masnih kiselina etil-dekanoat (7,1%) i etil-oktanoat (11,0%) koji su najvjerojatnije preneseni u med iz okoline košnice. Mali udio 2-fenilacetaldehida (0,9%) te izostanak furfurala ukazuju da u ovom uzorku nema termičkih artefakata.

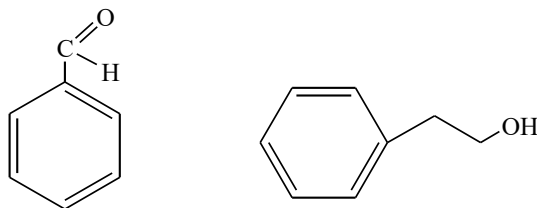
U vršnim parama uzorka 2 je identificirano 9 spojeva koji čine 91,8% od uzorka. U uzorku su identificirani terpeni i derivati benzena. Glavni sastojci vršnih para su benzaldehid (25,3%), *cis*-linalol oksid (22,4%), 2-feniletanol (11,2%) i hotrienol (8,3%), a slijede dva

izomerna aldehida jorgovana (6,4% i 5,3%), *trans*-linalol oksid (5,4%), 2-fenilacetaldehid (4,6%) i furfural (2,9%). Kemijski spoj s najvećim udjelom je monoterpenški ciklički eter, *cis*-linalol oksid (slika 4.5). Linalol oksid je derivat monoterpenškog alkohola linalola. U vršnim parama uzorka 2 su identificirani i drugi derivati linalola, dva aldehida jorgovana i hotrienol. Derivati linalola su glavni kemijski spojevi vršnih para meda korijandera i meda različitih agruma. Omjeri aldehida jorgovana i hotrienola mogu poslužiti kao kemijski markeri za razlikovanje različitih vrsta meda, npr bagremovog meda.³²



Slika 4.5. Strukturna formula linalol oksida

Identificirani derivati benzena u uzorku su benzaldehid i 2-feniletanol (slika 4.6). Općenito, koncentracija i omjer derivata benzena može poslužiti kao marker za specifičnu vrstu meda. Nešto veći udio 2-fenilacetaldehida (4,6%) ukazuje na moguće zagrijavanje meda jer fenilacetaldehid nastaje tijekom zagrijavanja meda iz aromatske aminokiseline fenilalanina.



Slika 4.6. Strukturne formule benzaldehida i 2-feniletanola

HS-SPME metodom su izolirani i identificirani spojevi koji uopće nisu identificirani u ekstraktima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom tekuće-tekuće, prvenstveno terpenški spojevi, linalol oksidi, aldehidi jorgovana i hotrienol. S druge strane ovom metodom se izoliraju samo najhlapljiviji spojevi, pa je u tom pogledu HS-SPME metoda diskriminirajuća.

5. ZAKLJUČAK

- Cilj rada bio je izolirati i identificirati hlapljive spojeve dva uzorka livadnog meda pčelara OPG-a Trupina različite godine vrcanja, 2018. i 2019. godine. Za izolaciju su korištene tri metode, ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE), ekstrakcija tekuće-tekuće i mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME).
- Ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom, smjesom pentana i dietil-etera u omjeru 1:2 izolirani su hlapljivi i poluhlapljivi spojevi iz meda, a njihov kemijski sastav i sadržaj određen je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Među hlapljivim spojevima u oba uzorka dominiraju ravnolančani ugljikovodici dokosan ($C_{22}H_{46}$) i trikosan ($C_{23}H_{48}$). Ovi ugljikovodici vjerojatno potječu iz okruženja košnice i karakteristični su za kemijski sastav voska.
- Iz rezultata analize uzoraka hlapljivih spojeva dobivenih ekstrakcijom tekuće-tekuće vidljivo je da ta metoda nije prikladna za izolaciju hlapljivih spojeva iz meda. Izoliran je mali broj spojeva, svega 4, odnosno 7 spojeva, a i uspješnost identifikacije nije zadovoljavajuća.
- Glavni sastojci vršnih para ovogodišnjeg meda (2019. god.) su monoterpenski eter (*E*)-anetol te etilni esteri masnih kiselina etil-dekanoat i etil-oktanoat. Vjerojatno porijeklo ovog spoja i njegovog (*Z*)-izomera u livadnom medu je iz nektara, odnosno ispaše pčela na livadama na kojima raste komorač. Esteri masnih kiselina su najvjerojatnije preneseni u med iz okoline košnice.
- U vršnim parama prošlogodišnjeg meda (2018. god.) identificirani su pretežno terpeni i derivati benzena. Glavni sastojci vršnih para su benzaldehid i *cis*-linalol oksid, a slijede 2-feniletanol i hotrienol.
- Dobiveni rezultati ukazuju da za bolji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva meda treba primijeniti više metoda izolacije hlapljivih spojeva. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom u kombinaciji s mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi pokazale su se boljim metodama za izolaciju hlapljivih spojeva livadnog meda.

Ekstrakcija tekuće-tekuće, iako provedena istim otapalom kao i ultrazvučna ekstrakcija, nije dala zadovoljavajuće rezultate.

- Razlika u profilu hlapljivih spojeva dvaju uzoraka meda može se pripisati i razlikama u pčelinjoj ispaši između dvije godine.

6. LITERATURA

1. K. Batinić, D. Palinić, *Priručnik o medu*, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet u Mostaru, Mostar, 2014, str. 5-35.
2. URL:https://www.google.com/search?q=%C5%A1pilje+u+%C5%A1panjolskoj+koje+daju+podatke+o+p%C4%8Delarstvu&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjX9vyGoq_jAhUEiYsKHXUCDywQ_AUIECgB&biw=1366&bih=657#imgrc=CNej7X7z-xwv1M: (27.05.2019)
3. Z. Tucak, T. Bačić, S. Horvat, Z. Puškadija, *Pčelarstvo III.*, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2005.
4. NN 79/2011, *Pravilnik o uvjetima i načinu provedbe posebnih mjera pomoći za sektor pčelarstva prema Nacionalnom pčelarskom programu za razdoblje od 2011. do 2013. god. u 2011. god.*, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja
5. URL:https://www.google.com/search?q=apis+mellifica&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiyqOuV0KPkAhUMp4sKHfmzBJAQ_AUIESgB&biw=1366&bih=608#imgrc=l6X27u2zD1OCqM: (27.05.2019.)
6. URL:https://www.google.com/search?q=Apis+cerana+i&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjFs7Yz6PkAhVBposKHRamCOkQ_AUIESgB&biw=1366&bih=608#imgrc=_ (27.05.2019.)
7. N. Plavša, N. Nedić, *Praktikum iz pčelarstva*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2015.
8. M. Šever, *Solitarne pčele*, Hrvatski zavod za poljoprivrednu savjetodavnu službu, Zagreb, 2016. str. 2.
9. URL:https://www.google.com/search?q=matica+trut+i+radilica&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiwmMCY1qPkAhVSpYsKHVUYC-cQ_AUIESgB&biw=1366&bih=608#imgrc=V_NPMeMLBI_RM: (27.05.2018.)
10. A. Benjamin, B. Mccallum, *Uzgoj pčela*, Rijeka-Zagreb, 2010., str. 80.
11. *Zakon o stočarstvu*, Službene novine Federacije BiH br. 66/13
12. URL:<https://bhpcelar.com/zanimljivosti/istorijski-razvoj-kosnica-od-papirusa-i-pruca-do-poloske-i-stiropora-1-dio/> (27.05.2019.)

13. *Pravilnik o medu*, Zakon o poljoprivredi, Ministarstvo poljoprivrede, NN br. 30/2015.
14. M. Bašić, *Farmaceutski med po metodi od Karla Dorfelera*, Apis Travnik, 2015., str. 23-67
15. URL:[https://www.google.com/search?q=p%C4%8Delinji+otrov&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNRBMaGPW01t2ZoD5JapvC-iMnfMHQ:1571849489162&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMIMTT67LIAhXDzqQKHfwrDbgQ_AUIEigB&biw=1366&bih=657#imgrc=j7aDtpu_VULD_M: \(03.06.2019.\)](https://www.google.com/search?q=p%C4%8Delinji+otrov&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNRBMaGPW01t2ZoD5JapvC-iMnfMHQ:1571849489162&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMIMTT67LIAhXDzqQKHfwrDbgQ_AUIEigB&biw=1366&bih=657#imgrc=j7aDtpu_VULD_M: (03.06.2019.))
16. S. Škenderov, C. Ivanov, *Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje*, Beograd, 1986.
17. D. Kuštrak, *Farmakognozija fitofarmacija*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2005, str. 58.
18. URL:[https://www.google.com/search?q=mati%C4%8Dna+mlije%C4%8D&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNT3E6EDGVUJr1Ovbl-81350XIVO3g:1571849954319&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3iaux7bLIAhWNbFAKHatvDJcQ_AUIEigB&biw=1366&bih=657#imgrc=T2p-LiYzdylAM: \(03.06.2019.\)](https://www.google.com/search?q=mati%C4%8Dna+mlije%C4%8D&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNT3E6EDGVUJr1Ovbl-81350XIVO3g:1571849954319&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3iaux7bLIAhWNbFAKHatvDJcQ_AUIEigB&biw=1366&bih=657#imgrc=T2p-LiYzdylAM: (03.06.2019.))
19. URL:[https://www.google.com/search?q=polen&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNTRkJEtC7cpqUzOqU2TzMt8flY90A:1571850028821&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjTt-7U7bLIAhXLJ1AKHabbBcUQ_AUIEigB&biw=1366&bih=657#imgrc=Zo6922TmkQk7M: \(05.06.2019.\)](https://www.google.com/search?q=polen&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNTRkJEtC7cpqUzOqU2TzMt8flY90A:1571850028821&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjTt-7U7bLIAhXLJ1AKHabbBcUQ_AUIEigB&biw=1366&bih=657#imgrc=Zo6922TmkQk7M: (05.06.2019.))
20. Z. Marjanović, *Med i drugi pčelinji proizvodi*, nerecenzirani nastavni materijal, Kemijsko - tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019.
21. A. Poljanec, *Kemijska analiza bagremovog i šumskog meda*, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017, str. 11-14.
22. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011.
23. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Sveučilište u Splitu, Kemijsko- tehnološki fakultet, 2009.

24. N. C. Da Costa, S. Eri, *Identification of Aroma Chemicals*, in: D. J. Rowe (Ed.), *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, pp. 20-25.
25. URL:<http://www.pbf.unizg.hr/content/download/31762/127186/version/1/file/IA.pdf> (07.06.2019.)
26. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (Juniperus oxycedrus L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
27. URL: <https://www3.nd.edu/~smithgrp/structure/workbook.html> (25.06.2019.)
28. URL:https://www.google.com/search?q=kARTA+bih&rlz=1C1GCEA_enHR837HR837&sxsrf=ACYBGNRfpbe14L9KtK3MDFx5Xy9CogToQQ:1571851436128&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi5vPXz8rLIAhVNr6QKHUC8B5oQ_AUIEygC&biw=1366&bih=657#imgc=UMkTHMK9S-jLgM:
29. E. Was, T. Szczena, H. Rybak-Chmielewska, *Hydrocarbon composition of beewax (Apis mellifera) collected from light and dark coloured combs*, Research Institute of Horticulture **58** (2014) 99-101
30. C. Tuberoso, E. Bifulco, I. Jerković, P. Caboni, P. Cabras, I. Floris, *J Agric Food Chemistry* **13** (2009) 3895-3900.
31. M. Kranjac, *Bioorgansko istraživanje kemijskih profila i markera odabranih vrsta meda*, Doktorski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2017, str. 17.