

Hlapljivi spojevi peluda

Klobučar, Dolores

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:167:685517>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

HLAPLJIVI SPOJEVI PELUDA

ZAVRŠNI RAD

DOLORES KLOBUČAR

Matični broj: 13

Split, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI PELUDA

ZAVRŠNI RAD

DOLORES KLOBUČAR

Matični broj: 13

Split, srpanj 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

VOLATILE POLLEN COMPOUNDS

BACHELOR THESIS

DOLORES KLOBUČAR

Parent number: 13

Split, July 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada: je prihvaćena na 6. ,elektroničkoj, sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

HLAPLJIVI SPOJEVI PELUDA

DOLORES KLOBUČAR, 13

Sažetak:

U ovom radu analiziran je kemijски sastav hlapljivih spojeva peluda sa obiteljskog poljoprivrednog gospodarstava Roguljić koja je ubrana 2020. godine. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) sa dva različita vlakna. Dobiveni uzorci analizirani su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). SPME metodom identificiran je 21 različit spoj. Identificirani spojevi mogu se svrstati u sljedeće kemijске skupine: karboksilne kiseline, alkoholi, esteri, ketoni i aldehidi.

Ključne riječi: pelud, hlapljivi spojevi, GC-MS, HS-SPME

Rad sadrži: 44 stranice, 20 slika, 31 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

| | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Sastav Povjerenstva za obranu: | 1. izv.prof.dr.sc. Ani Radonić | član-predsjednik |
| | 2. doc.dr.sc. Marina Zekić | član |
| | 3. doc.dr.sc. Zvonimir Marijanović | član-mentor |

Datum obrane: 26. srpnja 2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, electronic session no. 6.

Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

VOLATILE POLLEN COMPOUNDS DOLORES KLOBUČAR, 13

Abstract:

In this paper, the chemical composition of volatile pollen compounds from the Roguljić family farm, which was harvested in 2020, was analyzed. Volatile compounds were isolated by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers. The obtained data were analyzed by the related technique gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). 21 Different compounds were identified by the SPME method. The identified compounds can be classified into the following groups: carboxylic acids, alcohols, esters, ketones and aldehydes.

Keywords: pollen, volatile compounds, GC-MS, HS-SPME

Thesis contains: 44 pages, 20 figures, 31 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|---------------|
| 1. PhD. Ani Radonić, associate prof. | member-cheir |
| 2. PhD. Marina Zekić, assistant prof. | member |
| 3. PhD. Zvonimir Marijanović, assistant prof. | member-mentor |

Defence date: July 26th, 2021.

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,
Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira
Marijanovića, u razdoblju od ožujka do travnja 2021. godine.*

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na ukazanom povjerenju te vodstvu i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Hvala mom „malom krugu velikih ljudi“ na slušanju, vjerovanju i neograničenoj podršci.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka peluda, koristeći metodu mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi.

U tu svrhu potrebno je:

- Izolirati hlapljive spojeve uzorka peluda metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, koristeći dva vlakna i to:
 - plavo vlakno s ovojnicom polidimetiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm
 - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm
- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

SAŽETAK

U ovom radu analiziran je kemijski sastav hlapljivih spojeva peluda sa obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Roguljić koja je ubrana 2020. godine. Hlapljivi spojevi izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) sa dva različita vlakna. Dobiveni uzorci analizirani su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). SPME metodom identificiran je 21 različit spoj. Identificirani spojevi mogu se svrstati u sljedeće kemijske skupine: karboksilne kiseline, alkoholi, esteri, ketoni i aldehidi.

Ključne riječi: pelud, hlapljivi spojevi, GC-MS, HS-SPME

SUMMARY

In this paper, the chemical composition of volatile pollen compounds from the Roguljić family farm, which was harvested in 2020, was analyzed. Volatile compounds were isolated by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) with two different fibers. The obtained data were analyzed by the related technique gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). 21 Different compounds were identified by the SPME method. The identified compounds can be classified into the following groups: carboxylic acids, alcohols, esters, ketones and aldehydes.

Key words: pollen, volatile compounds, GC-MS, HS-SPME

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| UVOD..... | 1 |
| 1. OPĆI DIO..... | 2 |
| 1.1. PELUD..... | 2 |
| 1.1.1. NASTANAK PELUDA..... | 2 |
| 1.1.2. GRAĐA I OBLIK PELUDA..... | 3 |
| 1.1.3. SASTAV I OSOBINE PELUDA..... | 6 |
| 1.2. ZNAČAJ PELUDA ZA PČELINJU ZAJEDNICU..... | 9 |
| 1.3. ZNAČAJ PELUDA ZA LJUDSKU ZAJEDNICU..... | 11 |
| 1.4. SAKUPLJANJE PELUDA..... | 12 |
| 1.4.1. SAKUPLJANJE PELUDA OD STRANE PČELA..... | 12 |
| 1.4.2. SAKUPLJAČ NA LETU..... | 13 |
| 1.4.3. SAKUPLJAČ NA PODNICI..... | 14 |
| 1.5. ČUVANJE PELUDA..... | 15 |
| 1.5.1. KONZERVIRANJE..... | 15 |
| 1.5.2. SUŠENJE..... | 15 |
| 1.5.3. SMRZAVANJE..... | 16 |
| 1.6. KONTROLA BOTANIČKOG PODRIJETLA MEDA..... | 17 |
| 1.7. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA..... | 19 |
| 1.7.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI..... | 19 |
| 1.7.2. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA..... | 20 |
| 1.8. ANALIZA HLAPLJIVH SPOJEVA..... | 23 |
| 1.8.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA..... | 23 |
| 1.8.2. SPEKTROMETRIJA MASA..... | 24 |
| 1.8.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA..... | 25 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 27 |
| 2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE PELUDA..... | 27 |
| 2.2. APARATURA..... | 29 |
| 2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI..... | 30 |
| 2.4. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA..... | 32 |
| 3. REZULTATI..... | 35 |
| 4. RASPRAVA..... | 39 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 42 |
| 6. LITERATURA..... | 43 |

UVOD

Peludna zrnca su čestice koje pronalazimo na prašnicima biljaka . Točnije to su muške spolne stanice koje su presudne za razmnožavanje bilja. S obzirom na svrhu peludnih zrnaca, ona sadrže u sebi hranjive tvari koje su potrebne za rast i razvoj novih jedinki. Svrha ove definicije je naglasiti da pelud nije pčelinji proizvod premda su prva asocijacija koju vežemo za pelud upravo pčele. Naravno jedno je sa drugim usko vezano jer upravo pčele služe za prijenos peluda, dok one pelud koriste za svoju ishranu. (1)

Danas se znanstvenici trude što više istražiti pelud. Razlozi za to su pozitivna korelacija između ljudskog zdravlja i konzumiranja peludi. Ispostavilo se da nema boljke ljudskog tijela kojoj pelud ne može barem malo pomoći. U krajnjem slučaju djeluje na poboljšanje imuniteta, a znamo da je imunitet početak svega.

Sa prehrambenog stajališta shvaćeno je da pelud obiluje sa bjelančevinama, vitaminima i mineralima, dok ima smanjeni udio masti. Jedna od činjenica koja ne ide u prilog peludi kao izvrsnoj hrani je ta što sadrži prilično veliku količinu nama neprobavljivih spojeva. Osim toga ne posjeduje ni esencijalnu količinu vitamina topivih u mastima. (2)

Kvaliteta samog proizvoda je ono što se danas najviše cijeni na tržištu. Kvalitetu meda određujemo kroz sastav peludi, odnosno ako želimo neki med proglasiti uniflornim moramo za to imati potvrdu koju dobivamo peludnom analizom, odnosno identifikacijom sastava peluda.

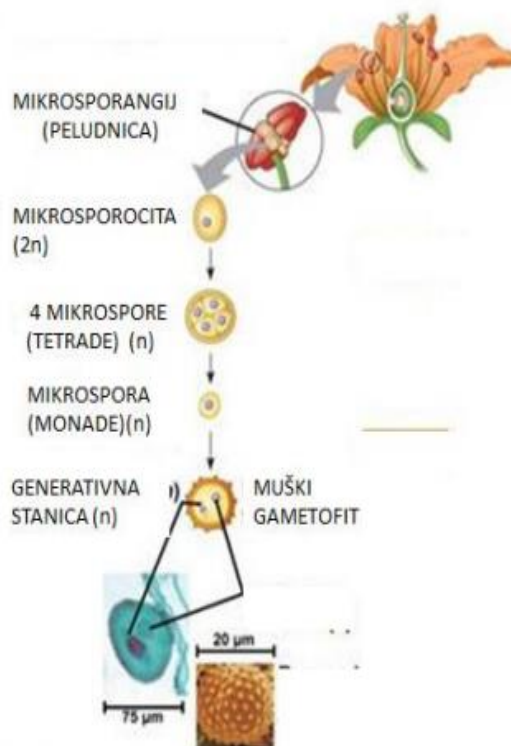
Cilj svih analitičkih istraživanja je da su ona što je moguće pouzdanija, brža te ekonomski isplativa. Nove metode istraživanja peluda kreću se u smjeru identifikacije specifičnih organskih spojeva te je upravo to biti cilj ovog završnog rada, identifikacija specifičnih spojeva koje sadrži pelud.

1. OPĆI DIO

1.1. PELUD

1.1.1. NASTANAK PELUDA

Pelud nastaje u peludnicama prašnika (slika 1). U samom početku su prisutne sporogene stanice koje redukcijском diobom daju peludna zrnca. Ona su vezana u tetrade koje se u velikoj većini raspadaju te dalje nastavljaju kao monade. Uvijek postoje iznimke tako da peludna zrnca pojedinih biljaka svoje rasprostranjivanje nastavljaju u obliku poliada. Poliade tako mogu sadržavati od 8,16 do 32 peludna zrnca. (1)



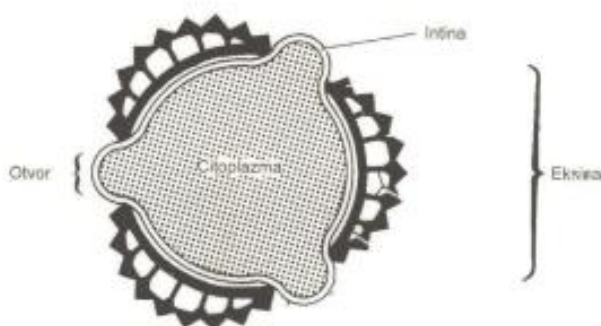
Slika 1. Nastajanje peludnog zrnca (3)

Pelud možemo podijeliti na anemofilnu i entomofilnu pelud. Anemofilna pelud je po veličini sitnija i nema izražene hranjive vrijednosti. Najčešće se rasprostranjuje vjetrom te izaziva alergije. Entomofilna pelud je hrapava i ljepljiva, a naokolo je prenose kukci. (4)

1.1.2. GRAĐA I OBLIK PELUDA

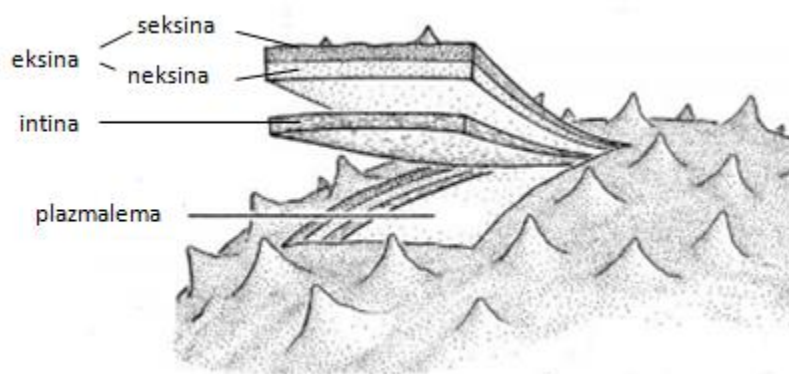
Boja, veličina i oblik su karakteristike peludnog zrna koje nam pomažu u identifikaciji (slika 2). Ono što određuje peludno zrno su sljedeće osobine:

- a) broj, veličina i oblik mjesta klijanja (pore klijanja),
- b) građa, boja i oblik vanjske stijenke (eksina),
- c) građa i boja unutrašnje stijenke (intina). (2)



Slika 2. Struktura peludnog zrnca (1)

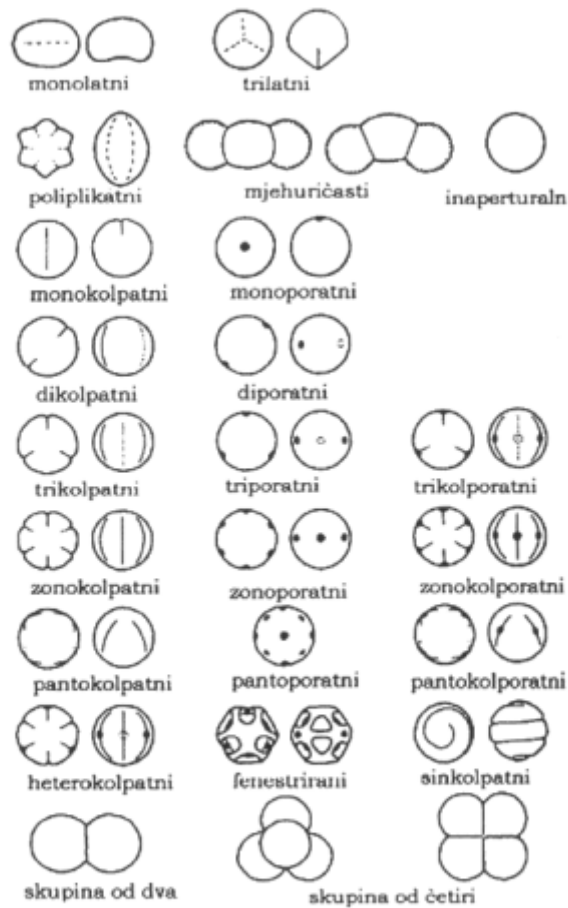
Samo peludno zrno je stanica sa dva karakteristična sloja koji sačinjavaju njenu stijenku (slika 3). Unutarnju stijenku čini intina koja obavija citoplazmu te se u većinskom dijelu sastoji od pektina i celuloze. Eksina je vanjska ovojnica koja se sastoji od neksine i seksine.



Slika 3. Shematski presjek stanične stijenke peludnog zrna (1)

Eksina sadrži i specifične otvore koji su zapravo mjesta klijanja koji mogu biti okruglastih ili duguljastih pora (slika 4). S obzirom na vrstu otvora na eksini pelud dijelimo na:

- a) inaperturnu pelud koja ima jedva naznačena mjesta klijanja,
- b) aperturnu pelud koja ima različite oblike mjesta klijanja. (1)



Slika 4. Prikaz različitih tipova peludnih zrnaca s obzirom na broj, oblik i položaj otvora (1)

Eksina na svojoj površini ima karakteristične tvorbe u obliku brazdi, mreža i izbočina koje služe za identifikaciju peluda. Kada se kreće sa analizom bitno je znati nalazi li se zrnca u polarnom ili ekvatorijalnom položaju. U polarnom položaju vidimo samo otvore ili karakteristične pore, dok ekvatorijalni položaj daje uvid između polova, ali omogućuje i uočavanje pora i brazdi. (2)



Slika 5. Pelud

1.1.3. SASTAV I OSOBINE PELUDA

Pelud je kao prehrambena namirnica bogata tvarima kao što su vitamini i minerali. Izrazito je dobar izvor bjelančevina, dok oskudijeva mastima. Biokemijskim istraživanjima je utvrđeno da sadrži čak sve 22 poznate aminokiseline. (2)

Gledajući pelud kao prehrambenu namirnicu treba se dotaknuti njene hranidbene vrijednosti. Ako analiziramo dolje priloženu tablicu 1 možemo primijetiti kako jedino piletina ima veći udio bjelančevina od peluda.

Tablica 1. Hranidbena vrijednost peluda i uobičajenih namirnica

(temeljena na 1000 kcal) (2)

| namirnica | bjelančevine(g) | masti(g) | ugljikohidrati(g) |
|------------------|------------------------|-----------------|--------------------------|
| pelud | 96,3 | 19,5 | 109,8 |
| govedina | 59,4 | 82,7 | 0 |
| piletina | 152,8 | 35,9 | 6,5 |
| grah | 50,1 | 6,5 | 155,9 |
| kruh | 43,2 | 12,3 | 196,4 |
| jabuka | 3,4 | 10,3 | 250,2 |
| kupus | 54,1 | 8,3 | 224,8 |
| rajčica | 50 | 8,8 | 213,8 |

Ako se osvrnemo na mineralni sastav peluda (tablica 2) može se primijetiti kako je bogata kalijem, dok u odnosu na ostale namirnice sadrži puno manje natrija. Od ostalih elemenata može se ustanoviti kako sadrži dva puta više željeza, dok više kalcija od peluda ima samo kupus.

Tablica 2. Hranidbena vrijednost peluda i uobičajenih namirnica obzirom na glavne makroelemente

(temeljena na 1000 kcal) (2)

| namirnica | fosfor (mg) | kalij (mg) | natrij (mg) | kalcij (mg) | željezo (mg) |
|------------------|------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| pelud | 602 | 2.360 | 179 | 915 | 57 |
| govedina | 468 | 665 | 145 | 26 | 7,5 |
| piletina | 1.238 | 2,010 | 484 | 60 | 8,9 |
| grah | 754 | 1.723 | 3797 | 443 | 14,8 |
| kruh | 938 | 1.123 | 2169 | 407 | 12,3 |
| jabuka | 171 | 1.900 | 19 | 122 | 5,3 |
| kupus | 1.211 | 9.700 | 835 | 2037 | 16,5 |
| rajčica | 1.225 | 11.000 | 138 | 588 | 22,5 |

Nakon osvrta na minerale potrebno je osvrnuti se i na vitamine u sastavu peluda. Tablica 3 je izražena s obzirom na 1000 kcal . Ako krenemo od analize količine vitamina A da se primijetiti kako ga više od peluda ima samo rajčica.

Tablica 3. Hranidbena vrijednost peluda i uobičajenih namirnica obzirom na vitamine

(temeljena na 1000 kcal) (2)

| namirnica | vitamin a* (ij) | vitamin b1 (mg) | vitamin b2 (mg) | vitamin b3 (mg) | vitamin c (mg) |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| pelud | 14500 | 3,82 | 7,56 | 63,8 | 142 |
| govedina | 143 | 0,17 | 0,46 | 12,2 | 0 |
| piletina | 484 | 0,28 | 1,29 | 57,7 | 0 |
| grah | 1070 | 0,65 | 0,25 | 4,9 | 16 |
| kruh | U trag. | 1,06 | 0,49 | 11,5 | U trag. |
| jabuka | 1560 | 0,53 | 0,34 | 1,9 | 68 |
| kupus | 5410 | 2,11 | 2,11 | 12,8 | 1950 |
| rajčica | 41000 | 2,75 | 1,88 | 31,2 | 1050 |

* vitamin A je izračunat na temelju karotena, gdje je μg karotena = 0,375 IJ

Na kraju je potrebno naglasiti kako je pelud idealna hrana, ali za pčele. Razlog zbog kojeg ona nije idealna hrana za čovjeka je taj što ne sadrži esencijalnu razinu vitamina topivih u mastima te sadrži poprilično veliku količinu neprobavljivih tvari.

1.2. ZNAČAJ PELUDA ZA PČELINJU ZAJEDNICU

Pelud u svom sastavu sadrži bjelančevine, ugljikohidrate, masti, minerale i vitamine. Pčele je sakupljaju u svoje košnice i pospremaju u stanice saća, a trebaju je u radnom razdoblju. Odnosno, u nedostatku peluda dolazi do gubitka na težini pčela, a postoji mogućnost da matica prestane izlijevati jaja te da pčele izbace ličinke. U fazi zimskog mirovanja pelud nije obavezan uvjet za ishranu pčela. (2)

Ispaša pčela ili sakupljanje peluda je proces koji je istaknut u proljeće i krajem ljeta. Krajem ljeta pčela počinje sa sakupljanjem svojih zimskih zaliha. To radi na način da počinje sa zadebljanjem svog zadka točnije masnobjelančevinastog tijela. Razina tih zaliha se smanjuje pred kraj zime kad pčele počinju sa hranjenjem legla i kada njihove mliječne žlijezde počinju sa sekrecijom. Ako je nekim slučajem peludna paša loša dolazi do slabijeg razvitka zajednice. Kako se to ne bi događalo pčelama se može pomoći u ishrani tako da se u košnice stave okviri sa dodatnom peludi ili mješavinom meda i peluda. (5)

Glavni izvor proteina za pčele je upravo pelud. Kvaliteta samog peluda se izražava u obliku postotka sirovih proteina, a mjerenja se provode određivanjem sadržaja dušika. Račun se provodi tako da se izmjerena količina dušika pomnoži sa faktorom 6,25 te se dobije udio proteina. Medonosne pčele koriste proteine za izgradnju mišića, žlijezda i drugih tkiva.

Različite vrste peluda se razlikuju po hranjivoj vrijednosti. Pelud se razvrstava u 4 skupine:

- a) visoko hranjiva pelud, kao što je pelud od voća, vrbe,
- b) nešto manje hranjiva, kao što je pelud od brijesta, pamuka,
- c) pelud sa malo nutritivnih svojstava, kao što je pelud johe ili lijeske,
- d) pelud sa vrlo malo hranjivih tvari, kao što je pelud raznog crnogoričnog drveća. (2)

Što točno utječe na hranjivu vrijednost peluda ne zna se u potpunosti ni danas. Daljnja istraživanja su bila usmjerena na sadržaj aminokiselina. Ustanovljeno je da su neke aminokiseline neophodne te da ih pčele ne mogu same sintetizirati već da im je potrebno te aminokiseline unijeti kroz hranu.

Istraživanje je provedeno na način da je jedan dio pčela hranjen samo sa šećernom otopinom, a drugom dijelu pčela je u šećernu otopinu dodano i raznih aminokiselina. Rezultati istraživanja su pokazali da je mješavina aminokiselina u korelaciji sa duljinom života pčela. (2)

Ako se govori o probavljivosti samog peluda kod pčela, utvrđeno je da se peludna zrna teško mehanički drobe. Iz tog razloga je zaključeno da se pelud enzimatski razgrađuje u srednjem crijevu. Podrijetlo tih enzima ni do danas nije definirano. Razmatraju se tri podrijetla: podrijetlo od pčela, podrijetlo od mikroorganizama u probavi te konačno da su enzimi proizvod samog peluda.

1.3.ZNAČAJ PELUDA ZA LJUDSKU ZAJEDNICU

Pelud je korištena kao lijek kod ljudi. Znanstvena istraživanja na tu temu nisu često provođena pa ne postoje službene potvrde, ali diljem svijeta postoje dokazi za djelotvornost peluda. Jedina potvrđena činjenica je da pelud djeluje u liječenju tegoba prostate i hemoroida. Također dokazani su i općeniti pozitivni učinci na tijelo nakon što je isto bilo izlagano zračenju X zraka.

Pelud je po svom sastavu idealna hrana, ali samo za pčele. Ali ipak zbog svoje izrazito dobre hranjive vrijednosti valja je uključiti i u ljudsku ishranu. Odnosno potvrđen je njen utjecaj na povećanje apetita i poboljšanje metabolizma tako da je preporučljiva kod slučajeva anoreksije i mršavosti. Osim toga može se koristiti i kod poboljšanja krvne slike jer uzrokuje povećanje eritrocita i hemoglobina. (1)

Pokazalo se da pelud ima i pozitivan utjecaj na spolno zdravlje ljudi, kao i kod problema sa želucem kako što su gastritis i ulkus. Jetra također ima benefite od konzumiranja peluda jer dolazi do njene obnove. Sumarno, konzumacija peluda nam nikako ne može odmoći jer na svaki dio našeg tijela ima neki povoljan učinak.

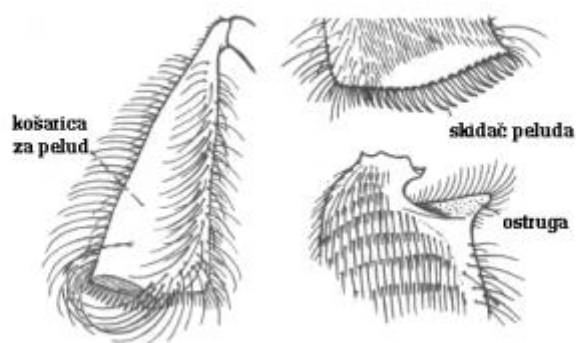
Nadasve uz sva pozitivna djelovanja peluda moramo i dalje imati na umu da je pelud izraziti alergen. Iz tog razloga na početku ju je potrebno uzimati u malim količinama i umjereno.

1.4. SAKUPLJANJE PELUDA

Kada govorimo o sakupljanju peluda možemo o tome govoriti na dva načina: sakupljanju peluda od strane pčela i sakupljanju peluda iz košnice. Sakupljanje peluda iz košnice provodi se konstrukcijom same košnice tj. prilagođavanjem košnice tako da možemo prikupiti pelud. To se radi na način da se stave određene prepreke na ulasku u košnicu koje skidaju pelud. Iste mogu biti postavljene iznad podnice ili biti prikačene na ulazu. Najpoznatije metode su postavljanje sakupljača na letu i sakupljača na podnici.

1.4.1. SAKUPLJANJE PELUDA OD STRANE PČELA

Pčele imaju tri para nogu, a svaka se noga sastoji od kuke, bedrenog valjka, bedra, goljenice, 5 članka stopala i 2 čaporaka. Noge im prvenstveno služe za hodanje, a potom za sakupljanje i nošenje peluda i propolisa. Sva tri para nogu pčela prekrivene su dlačicama koje im služe kao alat za čišćenje tijela odnosno skupljanje peluda. Kod pčela radilica, koje zapravo skupljaju pelud, stražnji par nogu namijenjen je za skupljanje peluda i propolisa (slika 6). Goljenica njenih stražnjih nogu ima udubljenje koje se naziva košaricom. Na dnu goljenice se nalazi i red dlačica koje se nazivaju peludnim češljem, a služi za sakupljanje peluda. Također na prvom članku stražnjih stopala ima dio nazvan ostruga koji služi za utiskivanje peluda u košaricu. (5)



Slika 6. Prikaz košarice za pelud kod pčela (5)

Kada pčela obilazi bilje ona u potpunosti biva zaprašena peludom. U procesu uklanjanja peluda sa svog prednjeg dijela pčela tu istu pelud vlaži medom ili nektarom tako da ona postaje ljepljiva. Potom pčela kreće u lebdenje te u tom

procesu premješta pelud sa prednjih na srednje te na kraju na stražnje noge gdje ljepljivu pelud miješa sa onom suhom koja se nalazi na peludnim četkama. Kako bi tu istu pelud sa unutarnje strane nogu prebacila u košarice na vanjskoj strani nogu pčele taru noge jedne o druge. Kada se košarice na njima napune vraćaju se u košnice . (5)

1.4.2. SAKUPLJAČ NA LETU

Ovakva vrsta sakupljača se postavlja ispred leta košnice te je oblikovan kao kutija koja ima ladicu (slika 7). Kroz tu kutiju je postavljena perforirana ploča i to na način da pčele moraju proći kroz tu perforiranu ploču ako žele ući u košnicu. Prilikom prolaska dolazi do skidanja peludi sa pčela. Ispod perforirane ploče se nalazi još gušća mreža koja je u odnosu na kutiju vodoravna. Ona služi za sakupljanje peluda, a razlog zašto je to mreža je taj da se pelud može automatski sušiti.



Slika 7. Sakupljač peluda na letu košnice (6)

Karakteristike perforirane ploče su takve da ploča ima promjere otvora od približno 5 mm. Ploča se može zamijeniti sa žičanim mrežama koje imaju otvore od 4,2 do 4,5 mm s tim da mreže moraju biti odmaknute 6 do 7 mm. Negativna strana mreža je ta što nisu stabilne pa može doći do povećanja otvora zbog samih prolazaka pčela pa se pelud i ne skida. (2)

Glavni nedostatak ovakvog skupljača je taj da ako dođe do masovnog povratka pčela u košnicu dolazi do zatvaranja otvora, a time i smanjenja protoka zraka. Također, poželjno je da se sakupljač nalazi unutar zatvorenog dijela košnice kako ne bi dolazilo do utjecaja atmosferilija na pelud. U suprotnom je pelud potrebno svakodnevno ubirati.

1.4.3. SAKUPLJAČ NA PODNICI

Sakupljač na podnici sastoji se od dva dijela, mreže za skidanje i ladice u koju pelud pada (slika 8). Ladica je jednakih dimenzija kao podnica te se postavlja u istu. Potom slijedi perforirana ploča koju se može lako vaditi iz okvira sakupljača, a ispod ploče se nalazi mreža sa otvorima od 3,5 mm koja je učvršćena u okvir. Kako bi pčele prošle između perforirane ploče i mreže udaljenost između njih treba biti do 2 cm.



Slika 8. Sakupljač peluda na podnici košnice (7)

Prednost ovakve vrste sakupljača je u tome da je pelud zaštićena od vanjskih izlaganja i da ne dolazi do sprječavanja prolaska zraka. Naravno uz prednosti dolaze i mane, što je u ovom slučaju sakupljanje ostalog otpada i prašine koji padaju na dno košnice zajedno sa peludi. (1)

1.5. ČUVANJE PELUDA

Pelud se koristi za pčelinju ishranu i ljudsku uporabu. Kako to obično biva u većini slučajeva želimo sačuvati proizvode jer ih ne možemo istog trena u potpunosti iskoristiti kako ih prikupimo i proizvedemo. Cilj svakog čuvanja je očuvati prehrambenu vrijednost namirnice. Čuvanje peludi se najčešće provodi na tri načina: sušenjem, smrzavanjem ili konzerviranjem. (2)

1.5.1. KONZERVIRANJE

Konzerviranje je najjednostavniji postupak iz razloga što ga je najlakše provesti. Odnosno potrebni su nam samo pelud i šećer. U posudu slažemo naizmjenice sloj šećera pa sloj peludi u odnosu 2: 1. Potrebno je naglasiti da površinski sloj u posudi mora biti šećer. Dakako sama posuda mora biti dobro zatvorena te se mora čuvati na hladnom mjestu. (2)

1.5.2. SUŠENJE

Voda je problematičan sastojak peludi. Ona sačinjava 30-40% peludi te na taj način pelud postaje savršena hranidbena podloga za razvoj plijesni. Sušenje se može provesti na dva načina, klasično na zraku ili u sušionicama. Rezultat i jednog i drugog treba biti pelud koja se trljanjem među prstima ne lijepi. Pelud je osušena onda kada se njen sadržaj vlage smanji na razinu između 5 i 8%.

Kako je cilj provesti sušenje na način da se ne smanje ljekovita i hranidbena svojstva peluda, ono se ne smije provoditi na direktnom suncu ili pod infracrvenim svjetlom. Razlog je gubitak vitamina B-kompleksa i provitamina A.

U sušionicama se sušenje provodi kroz najviše dva dana. Prva 24 sata na temperaturi od 49 °C da se uklone spore gljivica, a druga 24 sata na temperaturi od 35 do 36 °C. Kontrola same temperature je izrazito bitna kako ne bi došlo do prelaska nekih aminokiselina u toksične tvari. Nakon sušenja pelud se čuva na sobnoj temperaturi u zatvorenim posudama. (2)

1.5.3. SMRZAVANJE

Smrzavanje peluda se provodi na način da istu izložimo temperaturi od -18 °C. Preciznije pelud se ubire u posude i odmah nosi na smrzavanje te se na taj način čuva sve do uporabe. Kada jednom odmrzemo pelud potrebno ju je odmah iskoristiti. Ako je ipak nismo u mogućnosti iskoristiti potrebno ju je osušiti na načine koji su prethodno navedeni. (2)

1.6. KONTROLA BOTANIČKOG PODRIJETLA MEDA

Sastav meda se mijenja u ovisnosti o tipu vegetacije, razdoblju cvatnje biljnih vrsta, ali i o vremenu kada je pčelar proizveo med. Bitno je naglasiti da apsolutno uniflorni med ne postoji, jer bez obzira koliko neko bilje dominira na nekom području pčele nikad neće posjećivati samo to bilje. Upravo određivanje botaničkog podrijetla uvelike određuje kvalitetu meda na tržištu. (8)

Za određivanje botaničkog podrijetla meda moramo provesti dvije vrste analiza. Prva je melisopalinološka, odnosno peludna, a druga je fizikalno-kemijska. Melisopalinologija je grana palinologije koja se bavi proučavanjem peluda i drugih tvari koje se nalaze u talogu meda. Pod pojmom taloga meda smatramo sve netopive čestice koje dobijemo centrifugiranjem, a te čestice uz pelud čine kristali, kvasci i ostale čestice. Melisopalinološka analiza podrazumijeva kvalitativan i kvantitativan pregled peludi. Parametri koje promatramo kod fizikalno-kemijske analize su električna vodljivost te specifična rotacija i sastav šećera. Također dobrodošla je i provjera odnosa glukoze i fruktoze, ali i sadržaj dijastaze. Dijastaza je enzim koji med može sadržavati u visokoj ili niskoj koncentraciji pa nam to može pomoći kod karakterizacije. (2)

Udio peluda u nektaru te, na samom kraju, u medu ovisi o biljnoj vrsti koju pčela oblijeće. Odnosno, ako je cvijet građen tako da su antere iznad nektarija veća je vjerojatnost da ćemo pronaći pelud. Osim građe cvijeta, udio peluda u medu ovisi i o količini proizvedenog peluda, njegovoj dimenziji, kao i vremenu sazrijevanja antera. Pčele također mogu utjecati na udio peluda. One su građene tako da u svom mednom mjehuru mogu izdvojiti pelud, a sam proces ovisi o vrsti peluda i vremenu zadržavanja nektara unutar njihovog tijela. (5,9)

Sam proces peludne analize meda je definiran od strane International Commission for Bee Botany (ICBB) te se koristi u svim europskim laboratorijima kao standardan postupak analize meda. Suština analize je u tome da odredimo relativnu zastupljenost različitih vrsta peluda. Smatra se da je med unifloran ako relativna zastupljenost određene vrste peluda prelazi 45%. Analiza se provodi tako da nakon što pripremimo uzorak na točno predviđen način stavljamo isti pod svjetlosni mikroskop te počinjemo identifikaciju i brojenje. Pri tom si pomažemo

tako da odredimo vidna polja koja promatramo, a identifikaciju vršimo uz pomoć referentnih uzoraka i literature. (8)

S obzirom da pelud može u odnosu na količinu nektara biti normalno zastupljena, podzastupljena ili nadzastupljena vidimo da može doći do problema kod određivanja botaničkog podrijetla. Danas se iz tog razloga traže nove metode analize koje bi bile pouzdanije te na taj način nadopunile prethodne metode ili ih u potpunosti zamijenile. Također sve se više usredotočuje na metode kemijskog profiliranja kako bi se odredili spojevi koji karakteriziraju određene vrste meda.

1.7. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

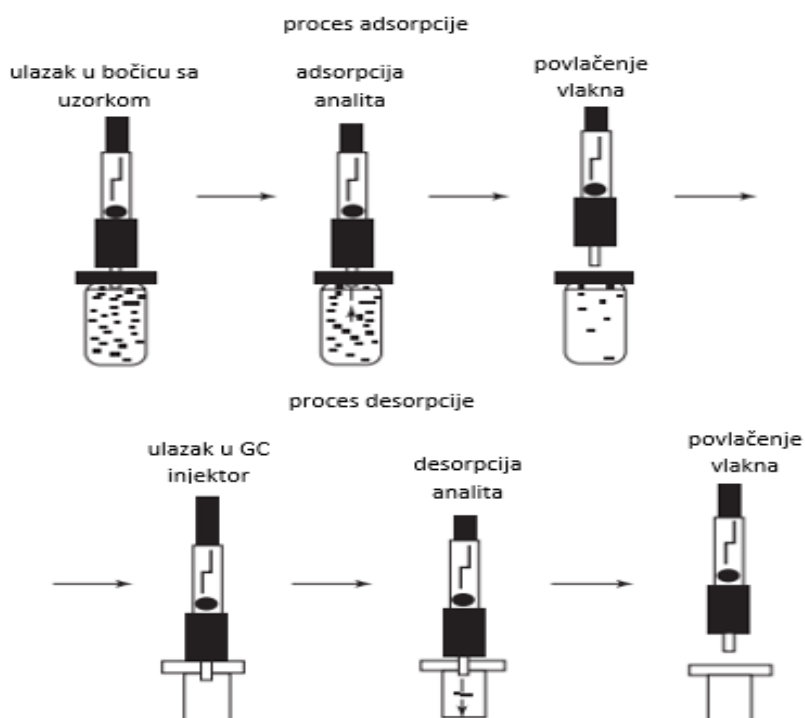
Metode analize općenito se sastoje od sljedećih koraka: uzorkovanja, pripreme uzorka, izolacije spojeva od interesa, detekcije odnosno karakterizacije spojeva te analize dobivenih rezultata. Točnije čak 80% vremena utrošenog na analizu podređeno je upravo pripremi uzorka iz razloga što većina uređaja ne može izravno obrađivati matrice uzoraka. Iz tog razloga upravo je priprema samog uzorka i odabir analitičke metode ključan korak kako bismo osigurali ponovljivost, točnost i selektivnost rezultata te vrijeme i troškove analize sveli na minimalne vrijednosti. Kao rezultat dobre primjene analitičkih metoda danas vrlo lako dolazimo do sastava vrlo kompleksnih smjesa koje mogu uključivati hlapljive, poluhlapljive i nehlapljive spojeve. (10)

1.7.1. MIKROEKSTRAKCIJA NA KRUTOJ FAZI

Mikroekstrakcija na krutoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*, SPME) je metoda čije su karakteristike jednostavnost, brzina, učinkovitost, a najistaknutija je ta da ne koristi otapala. Također treba naglasiti ona je i relativno niskih financijskih troškova u odnosu na druge, a i sigurna je za okoliš zbog toga što ne koristi otapala. Metodu su 1990. -ih otkrili Janus Pawliszyna i njegovi suradnici. Sama metoda pokazala se izrazito atraktivnom za analizu hlapljivih, poluhlapljivih i nehlapljivih spojeva, kao i za analizu aroma prehrambenih proizvoda. Mikroekstrakcija na krutoj fazi se u praksi najčešće koristi sa vezanom tehnikom plinska kromatografija - spektrometrije masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS). (11)

Mikroekstrakcija na krutoj fazi provodi se pomoću uređaja koji izgleda kao modificirana šprica, odnosno jednostavnog je izgleda. Sastoji se od nosača, igle i SPME vlakna. SPME vlakna su tanka modificirana optička vlakna načinjena od silicijevog dioksida te presvučena tankim polimernim filmom kako što je primjerice polidimetsiloksan (PDMS). Svrha polimernog filma je adsorpcija i koncentriranje organskih spojeva, a njegov pravilan odabir je ono što nam određuje selektivnost ekstrakcije. Točnije za ekstrakciju nepolarnih spojeva koriste se nepolarni premazi kao što je PDMS, dok se za ekstrakciju polarnih spojeva koriste polarni premazi kao primjerice poliakrilat. Također potrebno je naglasiti da je vlakno prije upotrebe potrebno kondicionirati i to na način da se na 0,5-4 h stavi na visoku temperaturu. (10)

Ekstrakcija tekuće-tekuće sastoji se od više koraka koji su redom: ekstrakcija, koncentriranje i prijenos do plinskog kromatografa. Prednost SPME pred ekstrakcijom tekuće-tekuće je u tome da je kod nje to sve obuhvaćeno u jednom koraku. Odnosno cijela metoda počiva na odnosu adsorpcije i desorpcije (slika 9). Iglom koja sadrži vlakno sa premazom ulazimo u bočicu sa uzorkom te je ostavljamo tako dok se ne postigne adsorpcijska ravnoteža između analita i premaza na vlaknu. Potom izvlačimo iglu sa vlaknom te je prenosimo u GC injektor gdje dolazi do desorpcije analita te njihove analize. (11)



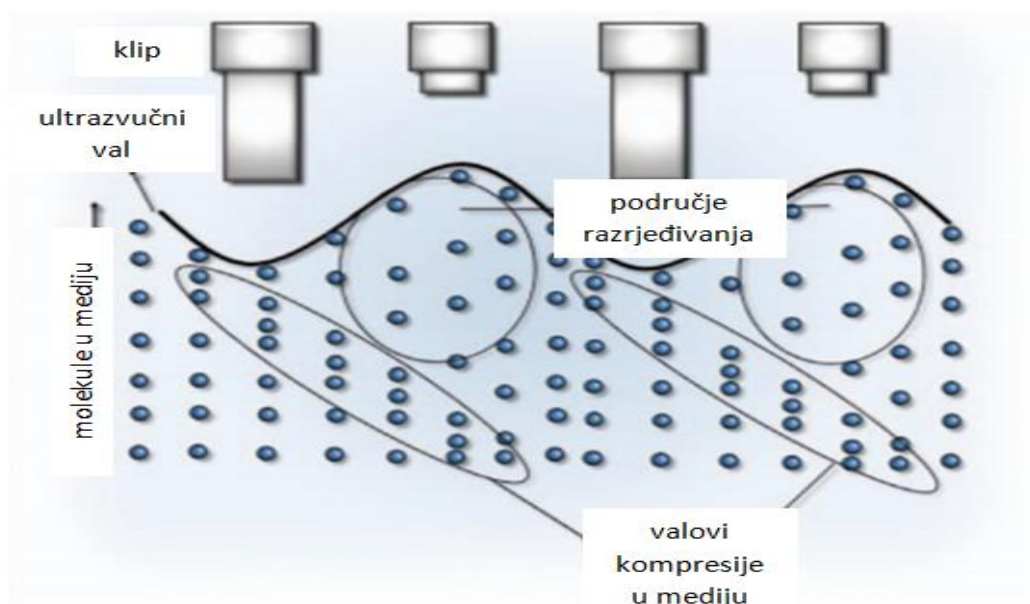
Slika 9. Prikaz mikroekstrakcije na krutoj fazi (10)

1.7.2. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

Ultrazvučna ekstrakcija je jedna od metoda analize nastala u 21. stoljeću. Ima široku primjenu u farmaceutskoj industriji kao i u kozmetičkoj, ali i prehrambenoj. Ultrazvuk je mehanički val koji iziskuje elastični medij kako bi se mogao širiti, a takav val pojavljuje se u frekvencijama između 20 kHz i 10 MHz. Valovi frekvencija od 20 kHz do 2 MHz se koriste u sonokemiji gdje su u stanju

stvoriti fizičke ili kemijske promjene u mediju koje dovode do olakšanja provedbe procesa reakcije ili do ubrzanja samih reakcija. (12)

Glavni učinci ultrazvuka u tekućem mediju posljedica su kavitacije. Kavitacija je proces u kojem se stvaraju, povećavaju i implodiraju mjehurići plinova otopljenih u tekućini. Odnosno prilikom prolaska ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova koji izazivaju pomicanje molekula. Ultrazvučni val na molekule djeluje kao klip, a sve je posljedica niza faza kompresije i razrjeđivanja (slika 10). U fazi kompresije dolazi do istiskivanja molekula tekućine iz prvobitnog položaja pa se mogu sudariti sa susjednim molekulama, dok u fazi razrjeđivanja zbog djelovanja negativnog tlaka dolazi do razdvajanja molekula. Točnije, u jednom trenu, ovisno o prirodi i čistoći tekućine, snaga negativnog tlaka bude veća od privlačnih sila između molekula tekućine te dolazi do nastanka kavitacijskih mjehurića. (12,13)



Slika 10. Prikaz ultrazvučne ekstrakcija (12)

Kavitacijski mjehurići mogu i rasti jer dolazi do difuzije plinova u fazi razrjeđivanja, a u fazi kompresije ne dolazi do potpunog izbacivanja plinova. Kada mjehurići dosegnu kritičnu točku u fazi kompresije dolazi do njihovog urušavanja. U samom trenutku urušavanja moguće je da dosegnu temperaturu od 500 K i tlak od 5000 atm što uvelike ubrzava kemijsku reakciju. Kada govorimo

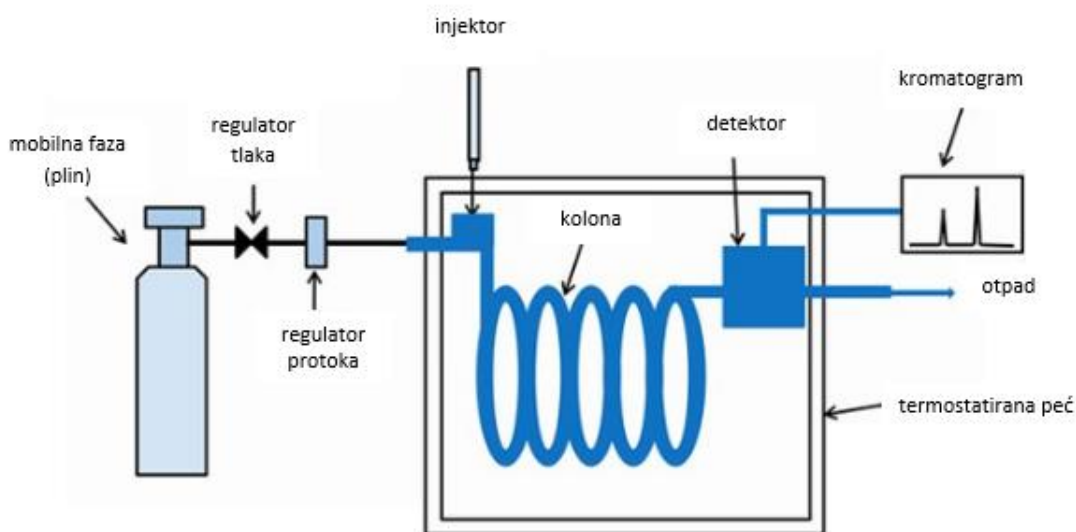
o urušavanju tih mjehurića na čvrsti materijal, onda taj visoki tlak i temperatura imaju djelovanje u obliku mikro-mlaznica i usmjerenih udarnih valova.

1.8. ANALIZA HLAPLJIVH SPOJEVA

Dobivene uzorke je potrebno analizirati, odnosno treba identificirati izolirane spojeve. U tu svrhu najčešće se koristi vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa.

1.8.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija je analitička metoda razdvajanja koja se koristi kako bi se analizirali hlapljivi spojevi unutar plinske faze. Princip rada plinske kromatografije je u tome da se uzorak otopi i ispari kako bi se analiti razdvojili i to na način da se raspodjele između dvije faze, stacionarne i mobilne (slika 11). Mobilnu fazu u ovom slučaju čini inertan plin poput helija ili dušika, koji prenosi molekule analita kroz zagrijani stupac kromatografa. Stacionarna faza je ili čvrsti adsorbent ili tekućina na inertnom nosaču. Kromatograf se sastoji od: otvora za ubrizgavanje, kolone, opreme za kontrolu protoka plina nosača, termostatičke peći, detektora i pisača koji nam daje kromatograme. (14,15)



Slika 11. Shematski prikaz plinske kromatografije (16)

Na samom početku uzimamo uzorak, otopinu koja sadrži organske spojeve koji nas zanimaju te je moramo ispariti. To se događa u otvoru za ubrizgavanje ili injektoru i to na način da podesimo temperaturu istog na 50 °C iznad najnižeg vrelišta uzorka. Potom se ispareni uzorci miješaju sa inertnim plinom koji nam služi kao nosač za spojeve. Takav inertni plin prolazi kroz kolonu kromatografa gdje se vrši odjeljivanje spojeva. Sve ovo se odvija u termostatiranoj peći koja je

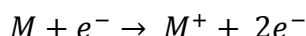
zadužena za održavanje temperature injektora i kolone. Na izlazu iz termostatičke peći se nalazi detektor koji mjeri komponente smjese na izlazu iz kolone. On ima dva glavna dijela, od kojih jedan prikuplja uzorke, a drugi je načinjen od elektroničke opreme koji analogni signal pretvara u digitalni te na taj način omogućuje analizu podataka koje na računalu vidimo kao kromatograme. (17)

1.8.2. SPEKTROMETRIJA MASA

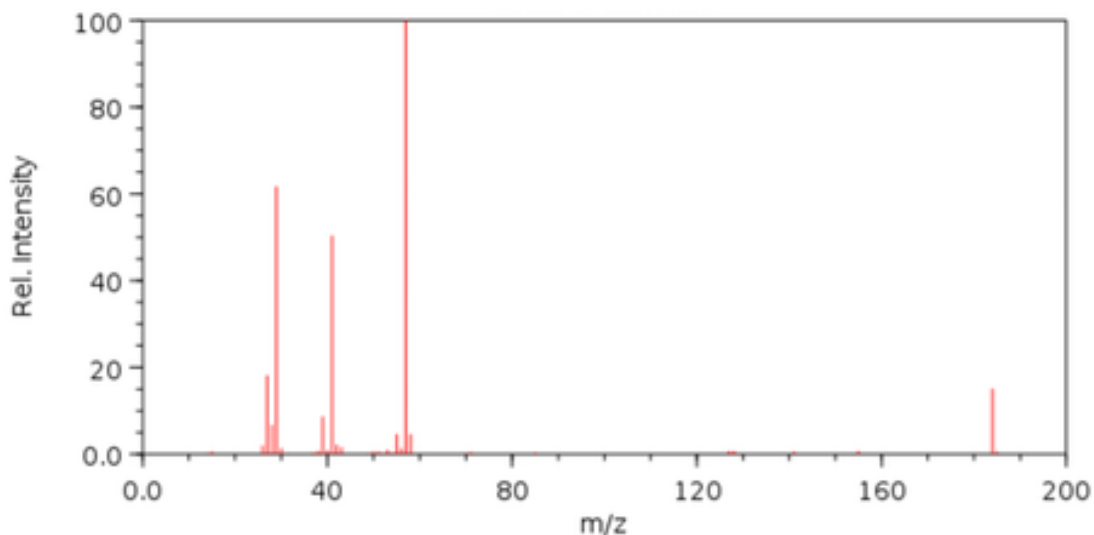
Spektrometrija masa je analitička metoda koja se zasniva na ioniziranju molekula. Potom dobiveni ioni se razdvajaju prema masi. Ova metoda nam osim za identifikaciju služi i za određivanje relativnih molekulskih masa, ali i samih molekulskih formula. Metoda je sačinjena od dva glavna postupka: ionizacije uzorka te razdvajanja i određivanja iona.

Cijela metoda se odvija u uređaju pod nazivom spektrometar masa, koji se načinjen od komore za bombardiranje. U komoru je potrebno unijeti uzorak u plinovitom stanju, sama komora je pod vakuumom. Vakuum je potreban iz razloga da se već nastali ioni ne bi sudarali sa drugim molekulama na putu od izvora do senzora, jer bi na taj način izgubili svoj naboj. (18)

Prilikom elektronske ionizacije uzorak se bombardira elektronima visoke energije pri čemu dolazi do ionizacije na način:



Odnosno vidimo da dobivamo M^{+} koji se dalje fragmentira. Daljnjom analizom se određuje struktura spoja i molekulska masa. Ione koje smo dobili analizator razvrstava prema intenzitetu i veličini m/z . Analizator također ione razvrstava kao električne signale koje uz pomoć računala vidimo kao spektar masa (slika 12). Spektar masa je linijski dijagram koji sadrži odnos relativnog intenziteta i omjera mase i naboja (m/z) fragmenta. (19)



Slika 12. Spektar masa (20)

1.8.3. VEZANI SUSTAV PLINSKA KROMATOGRAFIJA- SPEKTROMETRIJA MASA

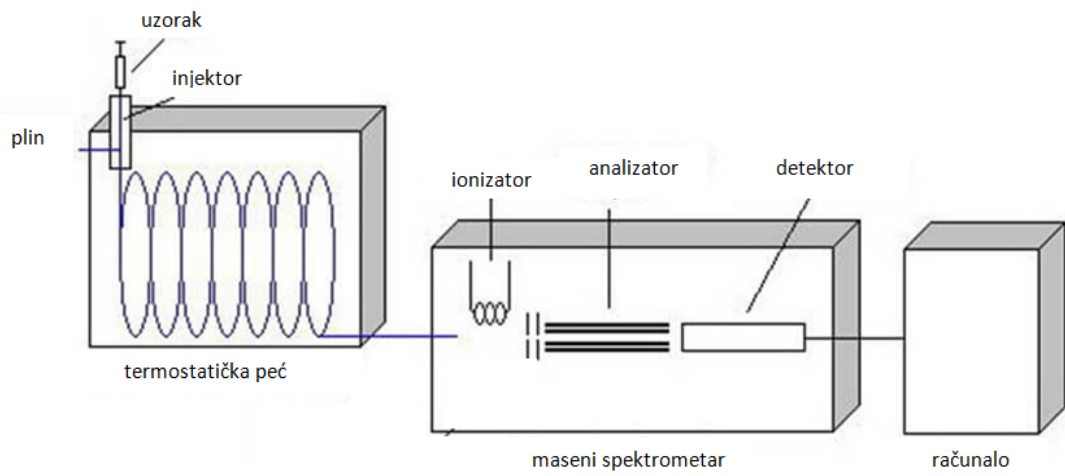
Vezani sustav plinska kromatografija- spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je instrumentalna tehnika koja u sebi ima povezanu plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju (slika 13). Uz pomoć ove tehnike moguće je odvojiti, identificirati i kvantificirati veliki broj spojeva. Iz tog razloga ova je metoda idealna za analizu velikog broja spojeva male molekulske mase. Također za sve te analize nije potrebna velika količina uzroka. (21)

Plinska kromatografija je kao metoda uspješna kad su u pitanju separacija i kvantifikacija. Nepouzdana je kada se govori o kvalitativnom određivanju, no zato je tu spektrometrija masa koja je za to savršena.

U vezanom sustavu spektrometar masa ima funkciju osjetljivog detektora za plinsku kromatografiju. Posebnost je trenutno u tome da može detektirati opće, odnosno sve fragmente m/z u nekom intervalu ili vrlo selektivno, gdje detektira samo određene fragmente m/z koji se vežu za određene strukture. (22)

Otopina uzorka se stavlja u injektor i isparava te prolazi kroz kromatografsku kolonu. Odnosno dolazi do odjeljivanja komponenata te odlaze u spektrometar masa. U spektrometru masa dolazi do ionizacije te dobivamo

spektar masa. Dobiveni spektar masa računalu uspoređuje sa već poznatom bazom spektara masa te na taj način identificira spojeve koje uzorak sadrži. (23)



Slika 13. Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (24)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE PELUDA

Pelud se sastoji od vrlo sitnih čestice koje su zapravo sitni biljni organi koji na sebi nose genetski materijal biljaka. Veličina peludnih zrnaca ovisi o vrsti bilja od kojeg potječe, ali kreće se u rasponu od 0,015 do 0,050 mm u promjeru. Također o vrsti bilja od kojeg pelud potječe ovisi i količina peludnih zrnaca. Tako će bilje koje biva oprašeno vjetrom imati puno veći broj peludnih zrnaca za razliku od onog bilja koje oprašuju pčele i ostali kukci. (1)

Organoleptička svojstva peludi uključuju osobine kao što su boja, izgled, miris i okus. Boja peluda može varirati od bijele do crne, iako se uglavnom može vidjeti u spektru boja od žute do narančaste. U većini su peludna zrnca okruglastog oblika premda taj oblik nikad neće biti u potpunosti savršen ili jednak kod svih peludnih zrnaca. Miris i okusi peludi je izrazito vezan za podrijetlo peluda, stoga sve ovisi o izraženosti naših osjetilnih receptora.

Prilikom skupljanja i spremanja peludi u saće pčele se koriste nektarom i medom kako bi isti slijepile i lakše se koristile njime. Iz tog razloga pelud je jako podložna raznim vanjskim utjecajima. Kako bi se to spriječilo pelud se najčešće suši. Nakon što se osuši pelud bi se prilikom trljanja pod prstima trebala rasipati te se ne bi smjela lijepiti.

Kao uzorak korištena je pelud koja potječe sa obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Roguljić (slika 14). OPG Roguljić pelud skuplja na otocima Šolta i Čiovo i to u proljeće. U to vrijeme na otocima uz maslinu raste i bušinci koji daju pelud visoke kvalitete, koja ima prepoznatljivu jarko narančastu boju. Pelud istraživana u ovom radu sakupljena je 2020. godine. (25)



Slika 14. Pelud obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Roguljić

2.2. APARATURA

- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi
- Magnetska miješalica (Heidolph MR Her-Standard (100-1400 o/min))
- Termostat (Heidolph EKT 3001, Njemačka)
- Vlakna različite polarnosti
 - plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
 - sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD)
- Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)
 - plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890A
 - maseni detektor (Agilent Technologies, SAD), model 5975C
- Kapilarna kolona HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan, J&W, SAD),

2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA KRUTOJ FAZI

1g uzorka peluda se stavi u staklenu posudu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C). Na slici 15 prikazana je korištena aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). (26)

Prije upotrebe, u skladu s uputama proizvođača, plavo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 30 min na 250 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa, dok je sivo vlakno kondicionirano na isti način 60 min na 270 °C. Nakon kondicioniranja, vlakna su odmah korištena za ekstrakciju vršnih para uzoraka. (26)



Slika 15. Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) (26)

Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je najpogodnije vlakno za ekstrakciju vršnih para uzorka peluda s obzirom na ukupni broj identificiranih spojeva u vršnim parama:

- plavo vlakno s ovojnicom polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) dužine 5 cm (slika 16)
- sivo vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (slika 16)



Slika 16. Vlakna s ovojnicama DVB/CAR/PDMS (sivo vlakno) i PDMS/DVB (plavo vlakno) (26)

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno se izvlači te se provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min, uz konstantnu brzinu miješanja otopine uzorka peluda (1000 o/min). Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu. (26)

2.4. GC-MS ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza izoliranih isparljivih spojeva provedena je spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf, model 7890A, u kombinaciji s masenim detektorom, model 5975C, spojenim na računalo (slika 17).

Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni:

- HP-5MS ((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm; debljina sloja stacionarne faze 0,25 μm)



Slika 17. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °C min⁻¹,
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin⁻¹.

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 280 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbližiji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima. (26)

Injektiranje uzoraka provedeno je ručno pomoću držača za SPME vlakna (slika 18).



Slika 18. Uređaj za mikroekstrakciju

3. REZULTATI

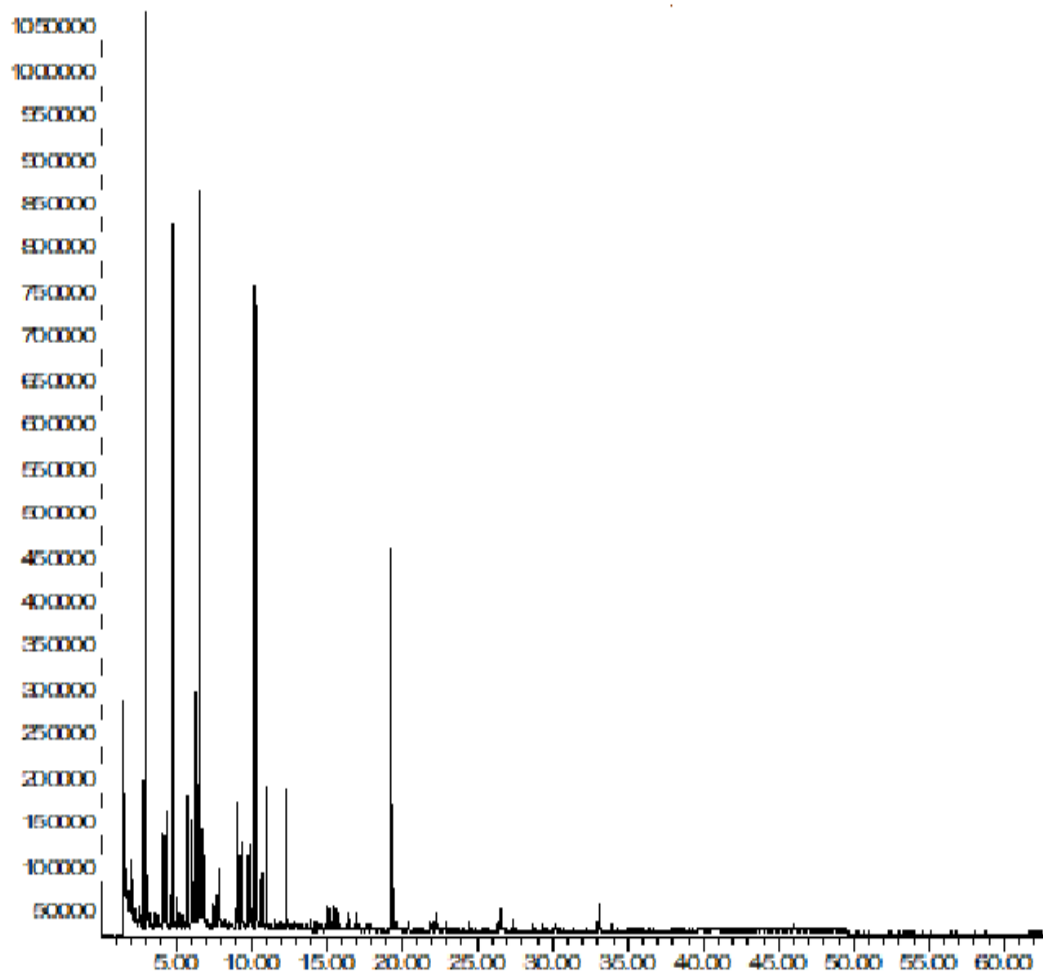
Hlapljivi spojevi peluda analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa GC-MS na koloni HP-5MS. Dobiveni rezultati ispitivanja prikazani su u tablicama i u obliku kromatograma.

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva peluda izoliranih pomoću plavog vlakna

| Red. broj | RI | Spoj | Udio (%) |
|------------------------------|------|--------------------------|----------------|
| 1. | <900 | butanal | 3,15 |
| 2. | <900 | 3-metilbutanal | 2,13 |
| 3. | <900 | butanska kiselina | 2,06 |
| 4. | <900 | heksanal | 1,71 |
| 5. | <900 | (E)-heks-2-enal | 11,01 |
| 6. | 904 | heptanal | 1,66 |
| 7. | 924 | metil-heksanoat | 10,21 |
| 8. | 969 | benzaldehyd | 2,38 |
| 9. | 986 | heksanska kiselina | 1,88 |
| 10. | 989 | 6-metilhept-5-en-2-on | 4,05 |
| 11. | 998 | oktan-3-ol* | 14,09 |
| 12. | 1000 | dekan | 2,02 |
| 13. | 1005 | oktanal | 1,47 |
| 14. | 1046 | benzil-alkohol | 1,71 |
| 15. | 1075 | (E,E)-okta-3,5-dien-2-on | 2,86 |
| 16. | 1096 | (E,Z)-okta-3,5-dien-2-on | 1,71 |
| 17. | 1105 | nonanal | 13,76 |
| 18. | 1128 | metil-oktanoat | 3,23 |
| 19. | 1327 | metil-dekanoat | 9,87 |
| Ukupno identificirano | | | 90,96 % |

RI-retencijski indeks na koloni HP5MS, *-točan izomer nije identificiran

Intezitet



Vrijeme

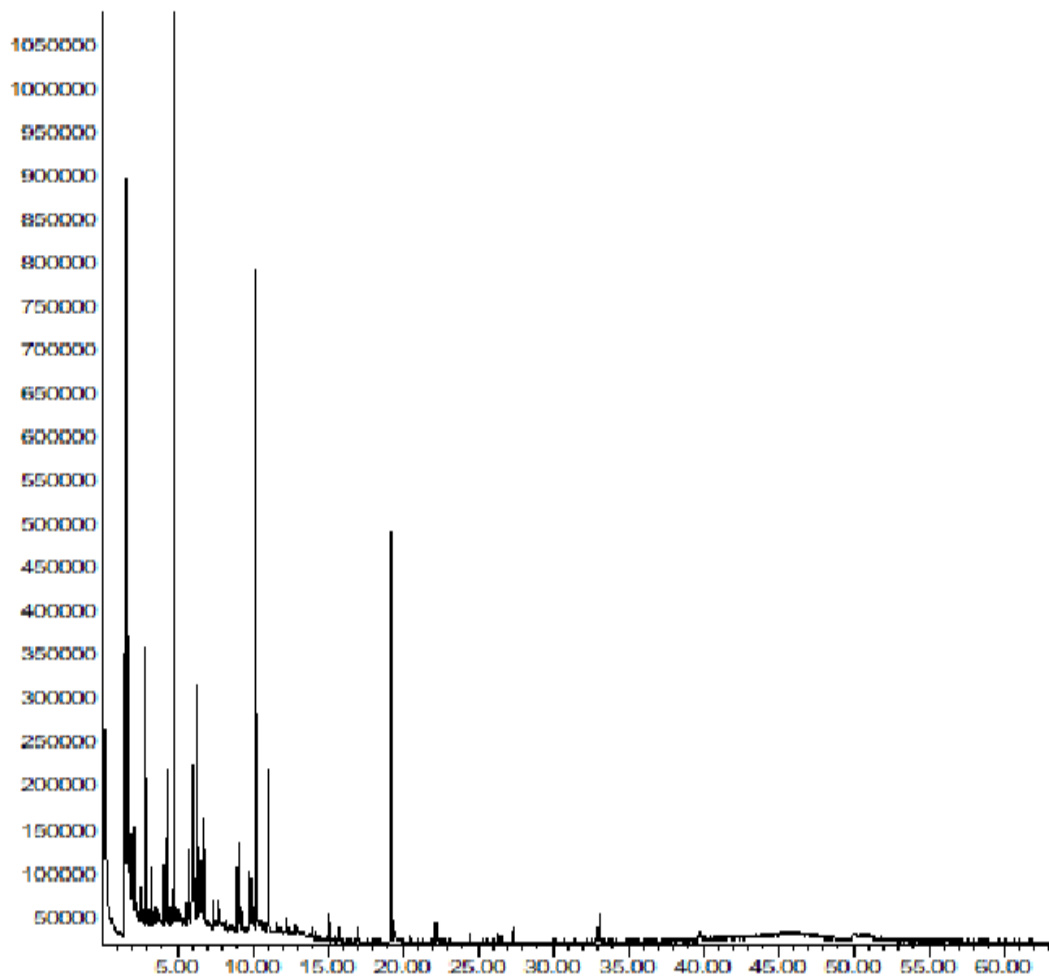
Slika 19 . Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva peluda izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom polidimetiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB) (plavo vlakno)

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva peluda izoliranih pomoću sivog vlakna

| Red. broj | RI | Spoj | Udio (%) |
|------------------------------|------|-----------------------------------|----------------|
| 1. | <900 | butanal | 3,77 |
| 2. | <900 | 3-metilbutanal | 2,13 |
| 3. | <900 | butanska kiselina | 16,13 |
| 4. | <900 | 2-etilfuran | 0,45 |
| 5. | <900 | heksanal | 3,33 |
| 6. | <900 | (<i>E</i>)-heks-2-enal | 1,60 |
| 7. | 904 | heptanal | 2,14 |
| 8. | 924 | metil-heksanoat | 13,07 |
| 9. | 969 | benzaldehyd | 1,42 |
| 10. | 986 | heksanska kiselina | 5,61 |
| 11. | 989 | 6-metilhept-5-en-2-on | 4,20 |
| 12. | 998 | oktan-3-ol* | 1,88 |
| 13. | 1000 | dekan | 1,17 |
| 14. | 1005 | oktanal | 1,51 |
| 15. | 1008 | felandren | 1,89 |
| 16. | 1075 | (<i>E,E</i>)-okta-3,5-dien-2-on | 1,52 |
| 17. | 1096 | (<i>E,Z</i>)-okta-3,5-dien-2-on | 0,95 |
| 18. | 1105 | nonanal | 13,25 |
| 19. | 1128 | metil-oktanoat | 3,36 |
| 20. | 1327 | metil-dekanoat | 9,37 |
| Ukupno identificirano | | | 88,75 % |

RI-retencijski indeks na koloni HP5MS, *-točan izomer nije identificiran

Intezitet



Vrijeme

Slika 20. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva peluda izoliranih HS-SPME metodom s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) (sivo vlakno)

4. RASPRAVA

Pelud je jedan od jedinstvenih bioloških proizvoda prirode. To nam dokazuje najinteresantnija harmonija između biljnog i životinjskog carstva zvana pčela. S jedne strane, bilje proizvodnjom peluda osigurava život pčelama, dok s druge strane, pčele skupljajući nektar pridonose preživljavanju biljnog svijeta kroz proces oprašivanja. (27)

Organoleptička svojstva pčelinjeg peluda se mijenjaju ovisno o botaničkom podrijetlu peluda. Miris peluda je specifičan prema biljnom izvoru, a okus sladak, kiselkast ili ponekad gorak. (27)

Cilj ovog završnog rada bio je odrediti sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u uzorku peluda. Kako bi izolirali spojeve korištena je metoda ekstrakcije vršnih para na krutoj fazi. Dobiveni spojevi analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na HP-5MS koloni. Rezultati analize prikazani su u obliku tablica i kromatograma.

Hlapljivi spojevi peluda, točnije kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva izoliranih pomoću metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi sa plavim vlaknom (PDMS/DVB) prikazan je u Tablici 4. Pomoću njega je izolirano 19 spojeva koji ukupno čine 90,96 % hlapljivih spojeva uzorka. U uzorku dominira oktan-3-ol (14,09%) dok ga sa ponešto nižim udjelima slijede nonanal (13,76%) i (E)-heks-2-enal (11,01%). Redom prema udjelima slijede: metil-heksanoat (10,21%) i metil-dekanoat (9,87%), 6-metilhept-5-en-2-on (4,05%), metil-oktanoat (3,23%) i butanal (3,15%). Ostatak spojeva nalazi se u udjelima manjim od 3%.

Tablica 5. sadrži sastav hlapljivih spojeva izoliranih uz pomoć sivog vlakna(DVB/CAR/PDMS). Izolirano je 20 spojeva koji sumarno čine 88,75% ukupnih hlapljivih spojeva. Spoj koji ima prvenstvo s obzirom na najveći udio je butanska kiselina (16,13%), a osim butanske kiseline kvantitativno značajni spojevi su i nonanal (13,25%) te metil-heksanoat (13,07%). Preostali spojevi se nalaze u nešto manjim udjelima i to su redom: metil-dekanoat (9,37%), heksanska kiselina (5,61%), 6-metilhept-5-en-2-on (4,20%), butanal (3,77%), metil-oktanoat (3,36%), heksanal (3,33%), heptanal (2,14%), 3-metilbutanal

(2,13%), felandren (1,89%) te oktan-3-ol (1,88%). Ostatak spojeva koji su izolirani nalaze se u udjelima manjim od 1,6 %.

Usporedbom podataka dobivenih na oba vlakna može se primijetiti kako su izolirani spojevi gotovo identični i kod plavog i kod sivog vlakna, samo sa različitim relativnim udjelima. Primjerice oktan-3-ol kod analize sa plavim vlaknom ima udio od 14,09% dok kod analize sa sivim vlaknom ima udio od 1,88%. Udio butanske kiseline kod analize sa plavim vlaknom je 2,06% dok je kod analize sa sivim vlaknom njen relativan udio 16,13%. Izuzetak kod analize sivim vlaknom su spojevi felandren i 2-etilfuran, koji nisu identificirani kod analize sa plavim vlaknom. Također benzil-alkohol je identificiran uporabom samo plavog vlakna.

Kod plavog vlakna najzastupljeniji spoj je sekundarni alkohol oktan-3-ol, koji se može javiti u dva oblika (R) ili (S). Ovaj alkohol ima miris po gljivama, a privlači insekte pčela, komaraca ... (28)

Metil-heksanoat je metilni ester heksanske kiseline, a može se koristiti u formulaciji za okus breskve, kajsije, miris cvijeta jabuke, manga... Također i esteri metil-oktanoat i metil-dekanoat se mogu naći u hlapljivim spojevima cvijeta jabuke, manga i slično. (29)

Svi gore navedeni esteri su također izolirani pomoću sivog vlakna samo sa različitim relativnim udjelima.

6-metilhept-5-en-2-on (4,05%-4,20%) je nezasićeni metilirani keton s voćnim mirisom, koji također privlači insekte.

Butanska kiselina (16,13%) i heksanska kiselina (5,61%), koje su izolirane pomoću sivog vlakna u većem udjelu, su sastavni dio ljudskog znoja vrlo neugodnog mirisa. (30)

(E)-heks-2-enal je izoliran pomoću plavog vlakna (11,01%) u većem postotku nego kod sivog vlakna (1,60%). Ovaj aldehid koji potječe od razgradnje linolenske kiseline, ima cvjetni miris i miris po pokošenoj travi. (31)

Identificirani spojevi se mogu razvrstati u kemijske skupine poput: karboksilnih kiselina, estera, ketona...Svi ti spojevi sa sobom donose

karakteristične mirise, a to mogu biti cvjetni mirisi, mirisi voća, miris pokošene trave, ali i neugodni mirisi poput mirisa znoja.

5. ZAKLJUČAK

Razmatrajući dobivene rezultate analize završnog rada može se zaključiti sljedeće:

- Dobiveni rezultati pokazuju da su izolirani identični spojevi na oba vlakna, samo sa različitim udjelima.
- Iz izoliranih spojeva može se zaključiti da su najzastupljenije skupine spojeva: karboksilne kiseline, alkoholi, esteri, ketoni i aldehidi.
- Spojevi 2-etilfuran i felandren izolirani su samo uz pomoć sivog vlakna (DVB/CAR/PDMS).
- Spoj benzil-alkohol izoliran je uz pomoć plavog vlakna (PDMS/DVB).
- Pronađeni kemijski spojevi u ovom radu privlače insekte, a upravo je to ono što je potrebno bilju za opstanak. Nije bitno koji je od mirisa privukao insekte, bitno je da dođe do prijenosa peluda.

6. LITERATURA

1. Levaković M. Pelud - ljekovita svojstva i primjena. Diplomski rad. Osijek, Hrvatska: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek; 2014.
2. Kezić N, Bubalo D, Grgić Z, Dražić M, Barišić D, Filipi J, Ševar M. Konvencionalno i ekološko pčelarenje Interna skripta. Agronomski fakultet u Zagrebu. Sveučilište u Zagrebu. 2011.
3. Sabljak D. Medonosna flora i karakterizacija peluda u medu požeškog kraja. Završni rad. Osijek, Hrvatska: Odjel za biologiju. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2017.
4. Punt W, Hoen P.P , Blackmore S , Nilsson S, Le Thomas A. Glossary of pollen and spore terminology. Review of Palaeobotany and Palynology. 2007; 143: 1-81.
5. Filipi J, Dražić M. M. Uzgoj pčela: sistematika i anatomija. Zadar, Hrvatska : Sveučilište u Zadru; 2017.
6. URL:
<https://i1.wp.com/medno.net/wp-content/uploads/2020/04/pcele-sakupljac-peludi-pvc-vanjski-cijene-2016-g-recesija-slika-59442796.jpg?fit=899%2C690&ssl=1> (pristupljeno: 4.7.2021.)
7. URL:<https://apismarket.hr/image/cache/catalog/proizvodi/skuplja%C4%8D%20peluda-355x355.jpg> (pristupljeno: 4.7.2021.)
8. Kranjac M. Bioorgansko istraživanje kemijskih profila i markera odabranih vrsta meda. Doktorska disertacija. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2018.
9. Rašić S. Poljoprivredna botanika Skripta za studente stručnih studija biotehničkih znanosti. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2017.
10. Mottaleb M. Solid-Phase Microextraction(SPME) and Its Application to Natural Products. In: Hostettmann. Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical methods. London, UK; 2014. pp. 105-127.
11. Kovačić D. Karakterizacija hlapljivih spojeva salame od mesa istarskog magarca. Završni rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2019.

12. Pingret D, Fabiano-Tixier A, Farid Chemat F. Ultrasound-assisted Extraction . In: Rostagno M, editors. Natural Product Extraction Principles and Applications. Cambridge,UK: The Royal Society of Chemistry; 2013. pp.89-109.
13. Uidl D. Izolacija hlapljivih spojeva meda od ružmarina ultrazvučnom ekstrakcijom prije i nakon zagrijavanja. Završni rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2019.
14. URL:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography) (pristupljeno: 30.6.2021.)
15. Bartle K, Myers P. History of gas chromatography. Trends in analytical chemistry. 2002; vol.21, nos.9+10: 547-557.
16. Evers F. Development of a Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometer Method for Clinical Drugs of Abuse Testing with Automated On-Line Extraction Using Turbulent Flow Chromatography. Doctorate of Biomedical Science. Portsmouth, UK: Faculty Of Science; 2014.
17. AL-Bukhaiti W, Noman A, Aseela Saeed Qasim A, AL-Farga A. Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2017; vol6: 123-128.
18. Sinovčić D. Kemijska analiza hlapljivih spojeva craft piva "Mrka". Završni rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2020.
19. Vlaić I. Hlapljivi spojevi meda od facelije prije i poslije zagrijavanja. Završni rad. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu; 2018.
20. URL:
<https://content.instructables.com/ORIG/F90/5ZJG/IVO3HWO6/F905ZJGIVO3HWO6.png?auto=webp&fit=bounds&frame=1&auto=webp&frame=1&height=300> (pristupljeno: 4.7.2021.)
21. URL:
<https://www.bristol.ac.uk/chemistry/facilities/nerc-lsmsf/techniques/gcms/> (pristupljeno: 28.6.2021.)
22. Pawliszyn J. Handbook of Solid Phase Microextraction. London, UK: Elsevier Inc; 2012. pp. 1-8.

23. Maštovska K, Lehotay S. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003; 1000: 153-180.
24. URL:
<https://www.winning-dwi-defenses.com/wp-content/uploads/2018/11/Gas-Chromatograph-with-Mass-Spectrometer.jpg> (pristupljeno: 4.7.2021.)
25. URL:
<http://opgroguljic.hr/> (pristupljeno: 9.7.2021.)
26. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Osijek Hrvatska: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku; 2014.
27. Bubalo D, Rogulja D. Pelud, botaničko i zemljopisno porijeklo meda. 2011.
URL: <https://www.facebook.com/307003142550/posts/10150523162462551/> (pristupljeno: 15.7.2021.)
28. Afify A, Betz J, Riabinina O, Lahondere C, Potter C. Commonly Used Insect Repellents Hide Human Odors from Anopheles Mosquitoes. *Current Biology*. 2019; 29: 3669-3680.
29. Pino J, Mesa J, Munoz Y, Marti M, Marbot R. Volatile Components from Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 2213-2223.
30. Kanlayavattanakul M, Lourith. Body malodours and their topical treatment agents. *International Journal of Cosmetic Science*. 2011; 33: 298-311.
31. Šarolić M, Gugić M, Friganović E, Tuberoso C, Jerković I. Phytochemicals and Other Characteristics of Croatian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils from Oblica, Lastovka and Levantinka Varieties. *Molecules*. 2015; 20: 4395-4409.