Hlapljivi spojevi meda s dodatkom soka od maline

Siroglavić, Dominik

Undergraduate thesis / Završni 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:392128

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA S DODATKOM SOKA OD MALINE

ZAVRŠNI RAD

DOMINIK SIROGLAVIĆ

Matični broj: 15

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ

PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA S DODATKOM SOKA OD MALINE

ZAVRŠNI RAD

DOMINIK SIROGLAVIĆ

Matični broj: 15

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

VOLATILE COMPOUNDS OF HONEY WITH THE ADDITION OF RASPBERRY JUICE

BACHELOR THESIS

DOMINIK SIROGLAVIĆ

Parent number: 15

Split, september 2019

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada: je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA S DODATKOM SOKA OD MALINE

Dominik Siroglavić, 2063

Sažetak:

Mnoštvo bioloških spojeva u medu nisu stabilni, naročito hlapljive tvari, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom zrenja meda, skladištenja te u procesu dobivanja proizvoda od meda usljed djelovanja visoke temperature. Cilj ovog rada je bio identificirati hlapljive i poluhlapljive spojeve unutar proizvoda od meda. Spojevi su izolirani ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) koristeći otapala pentan : dietil-eter (1:2 v/v) i diklormetan. Druga korištena metoda je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Izolirani spojevi su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Najzastupljeniji spojevi u istraživanom medu uzorka su bili: 5-hidroksimetilfurfural (21,9-43,9%), 2-furankarboksaldehid (furfural; 16,3%), mnogi terpeni i derivati benzena. Specifičan spoj izoliran ultrazvučnom ekstrakcijom koristeći diklormetan kao otapalo je tzv. malina keton (4-(4-hidroksifenil)butan-2-on (0,9%)).

Ključne riječi: med, hlapljivi spojevi, sok od maline, GC-MS, HS-SPME, USE

Rad sadrži: 44 stranice, 20 slika, 6 tablica, 36 literaturne reference

Jezik govornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić	predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Vesna Sokol	član
3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član - mentor

Datum obrane: 26.09.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-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, session no. 19th
Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor

VOLATILE COMPOUNDS OF HONEY WITH THE ADDITION OF RASPBERRY JUICE

Dominik Siroglavić, 2063

Abstract:

Many compounds of biological origin in honey are not stable, particulary volatile substances, and their structures can be transformed during honey maturation, storage and in the process of obtaining various honey products due to the action of high temperature. The aim of this paper was to identify volatile and semi-volatile compounds inside honey product. The compounds were isolated by ultrasound assisted solvent extraction (USE) using pentane : diethyl-ether (1:2 v/v) and dichloromethane as solvent. The second method is headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The isolated compounds were analyzed by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). Most common volatile compounds were: 5-hydroxymethylfurfural (21.9-43.9%), 2-furancarboxyaldehyde (furfural:16.3%), many terpenes and benzene derivatives. Specific volatile compound isolated with dichloromethane as solvent was „raspberry ketone“ (4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (0.9%)).

Keywords: honey, volatile compounds, raspberry juice, GC-MS, HS-SPME, USE

Thesis contains: 44 pages, 20 figures, 6 tables, 36 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ani Radonić - PhD, associate prof.	chair person
2. Vesna Sokol– PhD, associate prof.	member
3. Zvonimir Marijanović - PhD, assistant prof.	supervisor

Defence date: 26.09.2019.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Marijanovića, u razdoblju od siječnja do rujna 2019. godine.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću koji mi je omogućio rad u laboratoriju i pomogao svojim savjetima tijekom izrade ovog završnog rada, te što je uvijek imao vremena za moje upite.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima, koji su bili uz mene i omogućili mi lako i zabavno studiranje.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji i djevojci na podršci tokom studiranja, hvala na povjerenju, razumijevanju i strpljenju.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada je odrediti profil hlapljivih spojeva iz uzorka meda te na taj način odrediti specifične komponente.

U tu svrhu potrebno je izvršiti sljedeće korake:

1. Izolirati hlapljive spojeve pomoću ultrazvučne ekstrakcije (USE) s organskim otapalima diklormetan te smjesom pentana i dietil-etera u volumnom omjeru 1:2.
2. Izolirati hlapljive spojeve uzorka meda mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) koristeći sivo vlakno obavijeno tankim polimernim filmom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (PVB/CAR/PDMS).
3. Analizirati izolirane spojeve vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS), te uočiti prisutnost specifičnih hlapljivih spojeva za ovakvu vrstu proizvoda od meda.

SAŽETAK

Mnoštvo bioloških spojeva u medu nisu stabilni, naročito hlapljive tvari, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom zrenja meda, skladištenja te u procesu dobivanja proizvoda od meda usljed djelovanja visoke temperature. Cilj ovog rada je bio identificirati hlapljive i poluhlapljive spojeve unutar proizvoda od meda.

Spojevi su izolirani ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) koristeći otapala pentan : dietil-eter (1:2 v/v) i diklormetan. Druga korištena metoda je mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Izolirani spojevi su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Najzastupljeniji spojevi u istraživanom medu uzorka su bili: 5-hidroksimetilfurfural (21,9-43,9%), 2-furankarboksaldehid (furfural; 16,3%), mnogi terpeni i derivati benzena. Specifičan spoj izoliran ultrazvučnom ekstrakcijom koristeći diklormetan kao otapalo je tzv. malina keton (4-(4-hidroksifenil)butan-2-on (0,9%)).

SUMMARY

Many compounds of biological origin in honey are not stable, particulary volatile substances, and their structures can be transformed during honey maturation, storage and in the process obtaining honey products due to the action of high temperature. The aim of this paper was to identify volatile and semi-volatile compounds inside honey product.

The compounds were isolated by ultrasound assisted solvent extraction (USE) using pentane : diethyl-ether (1:2 v/v) and dichloremethane as solvent. The second method is headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The isolated compounds were analyzed by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS).

Most common volatile compounds were: 5-hydroxymethylfurfural (21.9-43.9%), 2-furancarboxyaldehyde (furfural; 16.3%), many terpens and benzene derivatives. Specific volatile compound isolated with dichloremethane as solvent was „raspberry ketone“ (4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (0.9%)).

SADRŽAJ

1. OPĆI DIO 2

1.1 MED 3

1.2 KLASIFIKACIJA MEDA 3

1.2.1 Nektarni med 4

1.2.2 Medljikovac 4

1.3 KEMIJSKI SASTAV MEDA 5

1.3.1 Ugljikohidrati 6

1.3.2 Voda 7

1.3.3 Aminokiseline 7

1.3.4 Vitamini 7

1.3.5 Enzimi 8

1.3.6 Hidroksimetilfurfural (HMF) 8

1.4 FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA 9

1.5 KEMIJSKI SASTAV MALINE (*Rubus idaeus L.*) 10

1.6 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA 11

1.6.1 Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE) 11

1.6.2 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) 12

1.7 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA 13

1.7.1 Plinska kromatografija (GC) 13

1.7.2 Spektrometrija masa 14

1.7.3 Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS) 15

2. EKSPERIMENTALNI DIO 17

2.1 UZORAK MEDA S DODATKOM SOKA OD MALINE 18

2.2 APARATURE 19

2.3 KEMIKALIJE 19

2.4 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA 20

2.4.1 Izolacija hlapljivih spojeva ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) 20
2.4.2 Izolacija hlapljivih spojeva mikroekstrakcijom vršnih para (HS-SPME) 21
2.5 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)..... 22
3. REZULTATI..... 25
4. RASPRAVA..... 32
4.1 HLAPLJIVI SPOJEVI UZORKA IZOLIRANI HS-SPME METODOM..... 35
4.2 HLAPLJIVI SPOJEVI UZORKA IZOLIRANI USE METODOM 37
4.2.1 Ekstrakcija pentan : dietil-eterom (1:2 v/v) 37
4.2.2 Ekstrakcija diklormetanom 37
5. ZAKLJUČAK..... 39
6. LITERATURA 41

UVOD

Prema pravilniku o medu iz 2015. godine, med je prirodno sladak proizvod kojeg proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) od nektara medonosnih biljaka, sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka. Pčele dodaju vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu takav nezreo med u stanice saća sve do sazrijevanja. (*1*)

Kemijski sastav meda usko je povezan s njegovim botaničkim porijeklom te sa značajkama zemljopisnog područja gdje je med proizveden, jer tlo i klimatski uvjeti određuju medonosnu floru. Upravo zbog toga je određivanje kemijskog profila od velikog značaja jer direktno utječe na procjenu kvalitete i vrijednosti meda. Od najvećeg su interesa analize isparljivih spojeva s ciljem identifikacije specifičnih botaničkih markera čija prisutnost potvrđuje porijeklo meda. (*2*)

Cilj rada je odrediti kemijski profil hlapljivih spojeva meda od bagrema s dodatkom maline uz pomoć metode mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi te metode ultrazvučne ekstrakcije koristeći organska otapala. Koristeći vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa dobit ćemo kompletnu analizu izoliranih spojeva.

1. OPĆI DIO

1.1 MED

Od davnina su med i drugi pčelinji proizvodi pratili čovjeka tokom evolucije te mu služili prvenstveno kao hrana, a zatim kao lijek i vjerski simbol. Još u starom Egiptu se med koristio u medicini vjerujući da je dar od Boga koji liječi sve bolesti. Koristio se kao hrana, lijek, kozmetički preparat ili kao dio religijskih ceremonija.

Mogućnost mumija da se ne raspadnu se dijelom pripisuje drugim pčelinjim proizvodima poput propolisa kojeg su dodavali u ogromnim količinama preparatima za proces mumificiranja. Sve ove povijesne činjenice su istinite zahvaljujući pisanim tragovima i slikama pronađenim unutar hramova i grobnica. (*3*)

1.2 KLASIFIKACIJA MEDA

Prema podrijetlu se med dijeli na nektarni ili cvjetni med, koji nastaje od nektara cvjetova medonosnih biljaka različitih vrsta (bagrem, lipa, lavanda, kadulja i dr.), a može biti monoflorni i poliflorni. Osim nektarnog, dijeli se i na medljikovac, koji nastaje od medne rose bjelogoričnih i crnogoričnih biljaka ili iz izlučevina kukaca roda *Hemiptera* koji sišu žive dijelove biljaka. (*4*)

Prema načinu proizvodnje i/ili predstavljanja med dijelimo na:

- med u saću – pčele ga skladište u svježe izgrađene stanice saća koje ne sadrže legla ili u listove tankog saća koje je napravljeno isključivo od pčelinjeg voska. Ovakav se med stavlja u prodaju u cijelom komadu ili u dijelovima saća
- med u komadima ili dijelovima saća – ovakav med sadrži jedan ili više komada rezanog saća
- cijeđeni med – dobiva se cijeđenjem otvorenih saća u kojima se nalazi med, ali ne i legla
- vrcani med – dobiva se vrcanjem (centrifugiranjem) otvorenih saća u kojima se nalazi med, ali ne i legla
- prešani med – dobiva se postupkom hladnog gnječenja saća koje ne sadrže legla uz mogućnost primjene umjerenog zagrijavanja najviše do 45°C

- filtrirani med – dobiva se procesom odstranjivanja stranih organskih ili anorganskih tvari prilikom čega se uklanja značajan dio peludi

1.2.1 Nektarni med – pčele ga proizvode od nektara, tekućine slatkog okusa koju izlučuju biljne žlijezde kako bi privukle kukce u vrijeme oprašivanja stoga zaključujemo da je količina nektara na površini medonosne biljke najveća za vrijeme oprašivanja biljaka. Koliko će biljka izlučiti nektara ovisi o biljnoj vrsti (sorta, količina cvjetova, faza razvoja cvijeta, veličini i površini same biljke) te o vremenskim čimbenicima (temperatura okoline, vlažnost zraka, svojstvo tla, dužina dana i sl.).

Po kemijskom sastavu nektar spada u vodenu otopinu raznoraznih ugljikohidrata gdje dominira glukoza, fruktoza i saharoza. Odnos ovih ugljikohidrata u nektaru prvenstveno ovisi o vrsti biljke koja ga izlučuje te o vremenskim, geografskim i sl. uvjetima. U nektaru se osim ugljikohidrata nalaze i razni spojevi poput fosfornih i dušikovih spojeva, vitamini, minerali, enzimi, pigmenti, aromatski spojevi, aminokiseline, organske kiseline i dr.

U svijetu postoji nekoliko tisuća vrsta biljaka koje luče nektar i stvaraju pelud, ali samo dio njih ima značaj za pčelarstvo. Najčešće se medu daje ime po biljci od koje su pčele skupljale nektar, ako se radi o poliflornom medu onda se daju nazivi poput livadni med, voćni med i sl. (*4*)

1.2.2 Medljikovac – lisne i štitaste uši izlučuju slatku tvar (medna rosa) kroz analni otvor u obliku sitnih kapljica medljike koje kasnije budu skupljene od strane medonosnih pčela. Kukci uz pomoć specifičnog rila izvlače kvalitetne biljne sokove te ih iskorištavaju. Medljikovac sadrži više mineralnih tvari i oligosaharida u odnosu na nektarni med, ali manje organskih kiselina te mu je pH vrijednost veća. (*5*)

Bagremov med - izrazito svijetle žute, limun bijele ili žutozelene boje, a ako med sadrži veći postotak peludnih zrnaca bagremovog podrijetla, boja meda može biti vrlo prozirna kao što je prikazano na slici 1. Okus bagremovog meda je blag, vrlo je slatkast, blago kiselkast te vrlo postojan. Zbog svojeg laganog okusa, dobar je za djecu i idealno se uklapa u ostala jela. Zbog visokog sadržaja fruktoze, ovakav med jako sporo kristalizira te time ostaje mjesecima u početnoj tekućoj fazi. Bagremova paša je kratkotrajna (10-12 dana), ali jedna od najizdašnijih paša u kontinentalnim dijelovima

Hrvatske prilikom čega se može dobiti i do 70 kg po košnici. Ovisno o nadmorskoj visini bagremove paše, ona cvjeta krajem svibnja i početkom lipnja. Zbog nepovoljnih vremenskih uvjeta može doći do vrlo slabog prinosa što se često događa u kontinentalnim dijelovima države pogotovo u Hrvatskom Zagorju, Moslavini, Baranji i Podravini. (*6*)

Jedna od najvećih prednosti ovakve vrste meda je ta što se bagrem ne zaprašuje pesticidima, pa prilikom punog cvata dolazi do otpuštanja toliko jakog mirisa da pčele počinju skupljati samo bagremov nektar čime se postiže nevjerojatna čistoća nektara i meda. Vrlo je djelotvoran kod smanjenja stresa te pozitivno djeluje na živčani sustav radi čega je medicinski preporučljiv za konzumaciju u svako doba godine. (*7*)



Slika 1. Med *(8)*

1.3 KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med kao prirodan proizvod je smjesa složenog kemijskog sastava s više od 70 različitih jednostavnih i složenih komponenti. Dio tih komponenti je prenesen iz medonosne biljke dok je ostatak dospio putem metabolizma pčele te dio u procesu zrenja i skladištenja meda. Dragocjeno svojstvo meda je varijabilnost te ne postoje u praksi dva uzorka meda koja su u potpunosti identična.

Kemijski sastav prvenstveno ovisi od koje je medonosne biljke med dobiven. Također ovisi o biljnom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, pasmini pčele te mogućnostima i sposobnostima samog pčelara. Glavni dio mase meda čine u vodi topljivi šećeri gdje glavnu ulogu imaju glukoza i fruktoza. Voda zajedno s ugljikohidratima čini 99% ukupne smjese meda, dok pod ostatak spada veliki broj kemijskih spojeva poput proteina (uključujući enzime), mineralne tvari, organske kiseline, vitamini, fenolni spojevi, tvari arome. (*9*)

Unatoč činjenici da svi ovi ostali spojevi čine manje od 1% ukupnog sastava meda, vrijedi napomenuti da su oni glavni odgovorni za senzorska i nutritivna svojstva meda. Obzirom da svaka vrsta meda ima svoj specifični kemijski sastav, teško je reći u kojim su postotcima prisutne određene tvari u medu.

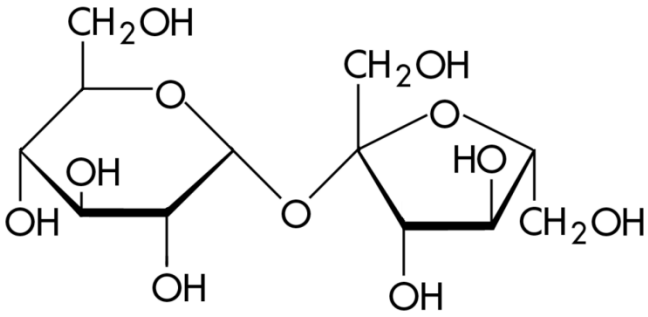
U tablici br.1 je prikazana prisutnost tvari i njihov postotak unutar cvjetnog meda. Osim toga, unutar tablice su prikazane iste tvari, ali za med od bagrema. (*10*)

Tablica 1. Prisutnost sastojaka u cvjetnom medu te u medu od bagrema

SASTOJAK	**CVJETNI MED**		**MED OD BAGREMA**	
	PROSJEČNA VRIJEDNOST g/100g	MIN-MAX g/100g	PROSJEČNA VRIJEDNOST g/100g	MIN-MAX g/100g
VODA	17,2	15,0-20,0	15,9	14,7-17,9
GLUKOZA	38,2	30,0-45,0	32,2	27,1-36,9
FRUKTOZA	31,3	24,0-40,0	42,7	34,7-46,8
SAHAROZA	0,7	0,1-4,8	0,8	0-2,0
MINERALI	0,2	0,1-0,5	/	/
AMINOKISELINE	0,3	0,2-0,4	/	/
ORGANSKE KIS.	0,5	0,2-0,8	/	/

1.3.1 Ugljikohidrati – predstavljaju glavni sastojak meda te njihov udio iznosi 73-83%, što med prezentira kao prezasićenu otopinu šećera. Iz tablice priložene iznad, može se uočiti da fruktoza dominira kao glavni ugljikohidrat unutar bagremovog meda s udjelom i do 46%. Uz fruktozu, glavni predstavnik je glukoza s udjelom i do 36,7%. U cvjetnom medu glukoza ima veći udio u odnosu na fruktozu, dok je bagremov med specifičan po većem udjelu fruktoze. Ova dva monosaharida uz saharozu (slika 2) i

maltozu određuju slatkoću, energetsku vrijednost te znatno utječu na fizikalna svojstva poput gustoće, viskoznosti, ljepljivosti, kristalizacije te higroskopnosti meda. (*11*) (*12*)



Slika 2. Struktura saharoze (*13*)

1.3.2 Voda – poslije ugljikohidrata čini drugi najzastupljeniji sastojak meda prilikom čega njezin udio iznosi između 14 i 21%. Voda je najvažniji parametar kakvoće meda jer direktno utječe na stabilnost meda te njegovu otpornost na kvarenje tijekom skladištenja. Prilikom čuvanja meda, neće doći do fermentacije ukoliko se održava udio vode ispod 17,1% iako ni to nije točna vrijednost jer mogućnost kvarenja također ovisi i o količini kvasaca u medu i temperaturi. Najčešća rutinska kontrola vode unutar meda se izvodi pomoću refraktometra. (*14*)

1.3.3 Aminokiseline – porijeklo aminokiselina unutar meda može biti i biljnog i animalnog karaktera. Prolin je glavni predstavnik aminokiselina unutar meda te čini i do 85% udjela svih aminokiselina. Prvenstveno potječe od pčela i akumulira se u med tokom procesa prerade nektara u med, a njegov udio može biti indikator zrelosti te nam njegova količina u medu može biti glavna stavka da bi med procijenili kao patvoreni. (*15*)

1.3.4 Vitamini – prisutnost vitamina u medu je dokazana i određena, ali zbog malih količina ne može se reći da je med dobar izvor vitamina za ljudsku prehranu. Koji će vitamini biti prisutni i u kojim količinama prvenstveno ovisi i botaničkom podrijetlu meda. Glavni vitamini u medu su vitamini B skupine (tiamin, riboflavin, nikotinamid, piridoksin, pantotenska kiselina, biotin i folna kiselina), vitamin C te vitamin K. Unutar

meda od bagrema, najzapaženiji je tiamin (B1) te se njegova vrijednost kreće između 0,5 i 1,5 mg na 100g meda. (*16*)

1.3.5 Enzimi - prisutnost ovih kemijski složenih tvari unutar meda može biti rezultat prerade nektara u med ili potječu iz peludi, kvasaca i bakterija koje se nalaze u medu. Obzirom da se enzimi teško mogu proizvesti i nakon toga ubaciti u med te na taj način patvoriti med, oni postaju važan parametar za određivanje kakvoće i podrijetla meda. U tablici br. 2 su prikazani enzimi koji su prisutni u medu te njihova uloga. (*14*)

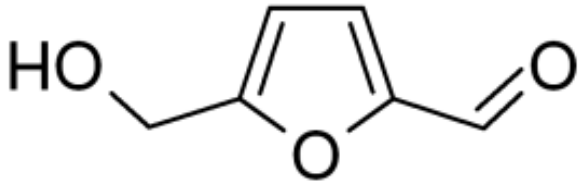
Tablica 2. Prisutnost enzima unutar sastava meda

TRIVIJALAN NAZIV ENZIMA	KEMIJSKI NAZIV ENZIMA	ULOGA ENZIMA
dijastaza (amilaza)	α- i β-amilaza	razgrađuje škrob na jednostavnije ugljikohidrate
invertaza	α-glukozidaza	razgrađuje saharozu na glukozu i fruktozu
glukoza-oksidaza	grupa peroksidaza	razgrađuje glukozu u glukonolakton
katalaza	grupa oksidoreduktaza	razgrađuje peroksid na vodu i kisik
kisela fosfataza	/	iz organskih fosfata uklanja fosfatnu skupinu
proteaza	grupa protein hidrolaza	hidrolizira proteine i polipeptide
esteraza	/	razgrađuje estersku vezu

1.3.6 Hidroksimetilfurfural (HMF) – spada u skupinu cikličkih aldehida čija je struktura sačinjena od 6 ugljikovih atoma (slika 3) te sadrži alkoholnu i aldehidnu funkcionalnu skupinu. Ovaj spoj nastaje dehidratacijom heksoza poput fruktoze i glukoze unutar kiselog medija. Brzini reakcije pogoduju povišena temperatura, vrijeme izlaganja povišenoj temperaturi, uvjeti skladištenja te kiseli medij. (*17*)

HMF je prirodno prisutan u medu, no u malim količinama i iznosi ispod 1mg/kg. Međutim, taj udio raste ako je barem jedan faktor zadovoljen što najčešće bude povišena temperatura. Dopuštena vrijednost ovog spoja unutar meda je 40 mg/kg osim

za med koji se izvozi u zemlje tropskih klima pa u takvom medu udio HMF bude i do 80 mg/kg.



Slika 3. Struktura 5-hidroksimetilfurfurala (*18*)

1.4 FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA

Fizikalna svojstva meda su vrlo usko povezana sa samim kemijskim sastavom te stoga vrijednosti fizikalnih svojstava mogu imati specifične iznose za određene vrste meda. **Električna provodnost** je fizikalno svojstvo koje ovisi o udjelu minerala i kiselina u medu, što je udio veći, veća je i provodnost. Određivanje ovog svojstva omogućuje identifikaciju botaničkog podrijetla meda.

Osobinu meda da, ovisno o relativnoj vlažnosti zraka i udjelu vode u medu, na sebe privlači ili otpušta vodu zovemo **higroskopnost**. Kako bi izbjegli kvarenje meda uzrokovano višim udjelom vode od preporučene, poželjno je skladištiti med u suhim prostorijama te dobro zatvorenim u prikladnu ambalažu.

Iako **kristalizacija** neće uzrokovati gubitak kvalitetnih osobina meda, zbog odbojnosti potrošača prema medu koji je kristalizirao ona se nastoji izbjeći. Ovaj proces je izazvan prelaskom glukoze u kristalni oblik nakon što je otpustila vodu te je time ugrožena stabilnost meda prema fermentaciji i kvarenju zbog slobodne vode. Bagremov med je prepoznatljiv po nižem udjelu glukoze i samim time teško i sporo kristalizira.

Med posjeduje svojstvo skretanja ravnine polarizirane svjetlosti zbog različitog sastava ugljikohidrata pa tako fruktoza skreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, a glukoza i ostali ugljikohidrati udesno. **Optička aktivnost meda** nam omogućuje lakše određivanje botaničkog podrijetla meda. (*19*)

Osim ovih opisanih fizikalnih svojstava još se ističu **viskoznost**, **indeks refrakcije** i **specifična masa**.

1.5 KEMIJSKI SASTAV MALINE (*Rubus idaeus L.*)

Osim što sadrži veliki udio vode (veći od 70%), plodovi maline sadrže malo proteina (manje od 3,5%) i vrlo malo masti (manje od 0,5%). Plodovi maline su dobar izvor energije jer sadrže veliki udio ugljikohidrata koji su prisutni u obliku šećera (glukoze i fruktoze), probavljivog škroba, neprobavljive celuloze te vlakana. Malina ima visoku razinu fitokemikalija od kojih su većina fenolne molekule. Te fitokemikalije uključuju različite korisne spojeve, kao što su minerali, vitamini, masne kiseline te dijetalna vlakna.

Plodovi su važan izvor provitamina A, vitamina C te vitamina B kompleksa. Neki od poznatih kemoprevencijskih sredstava prisutni u malinama uključuju vitamine A, C i E te folnu kiselinu. Osim navedenih kemijskih tvari, malina je bogata karotenom, luteinom, fitosterolima poput sitosterola i stigmasterola, fenolnim molekulama kao što su antocijani, flavonoli, flavanoli, proantocijanidini i fenolne kiseline. (*20*)

Velika korist fenolnih spojeva omogućava obranu biljke od raznih parazita, ultraljubičastog zračenja i toksičnih metala. Sveukupni prikaz kemijskog sastava je predočen u tablici 3.

Tablica 3. Opći kemijski sastav maline u 100 g svježeg ploda

Voda (g)	85,8
Energetska vrijednost (kcal)	52
Proteini (g)	1,2
Ukupni lipidi (g)	0,65
Ugljikohidrati (g)	11,9
Ukupna vlakna (g)	6,5
Ukupni šećeri (g)	4,42

Malina ima specifičan kemijski sastav koji ovisi o velikom broju čimbenika poput vrste tla, načinu uzgoja te stupnju zrelosti u trenutku berbe.

1.6 METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

Istraživanje i razvoj metoda za određivanje hlapljivog profila započelo je u drugoj polovici prošlog stoljeća. Med ima specifični kemijski sastav čiji hlapljivi spojevi predstavljaju njegov „fingerprint“ i samim time pomažu u lakšem određivanju botaničkog i zemljopisnog porijekla. (*15*)

Hlapljivi spojevi imaju relativno male molekulske mase i prisutni su u izrazito niskim koncentracijama u medu. Svi ti hlapljivi spojevi u med mogu dospjeti na mnogo načina prilikom čega je dokazano da većina tih spojeva potječe od biljke koja stvara nektar. Neki od načina kako hlapljivi spojevi dospiju u med su:

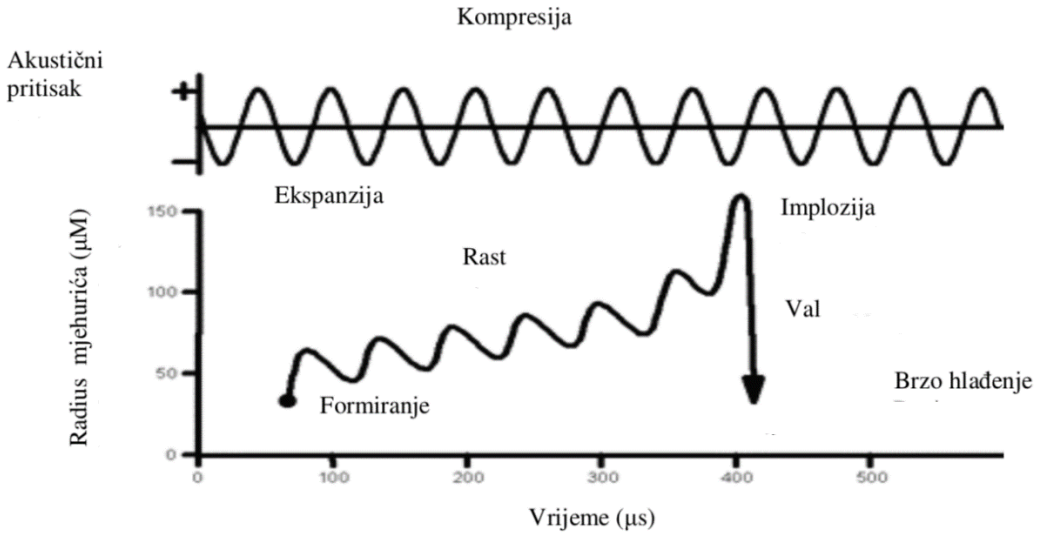
- dospijevaju u med direktno iz biljke
- nastaju u procesima pretvaranja nektara u med od strane pčela
- pretvorbama spojeva tokom zrenja meda
- dodatnim postupcima obrade.

1.6.1 Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE) - ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom priznata je kao učinkovita metoda za ekstrakciju spojeva te se njome znatno skraćuje vrijeme trajanja procesa. Ultrazvuk visoke snage omogućuje djelovanje kavitacije na staničnu stijenku te time veće i jače prodiranje otapala u materijal prilikom čega se povećava prijenos mase. Obzirom da dolazi do direktnog kontakta između unutarstaničnog sadržaja i samog otapala, vrijeme ekstrakcije se smanjuje a njena efikasnost povećava. (*21*)

Učinak ultrazvuka je puno korisniji ako koristimo niže frekvencije (18-40 kHz) jer kod takvih frekvencija dominiraju učinci fenomena kavitacije kao što je strujanje tekućine i turbulencija.

Prilikom širenja zvučnog vala kroz tekući medij dolazi do tvorbe longitudinalnih valova prilikom čega nastaju izmjenični ciklusi kontrakcije i ekspanzije kao i nastajanje ekspanzivnih vrtloga. U određenom trenutku kao što je prikazano na slici 4, mjehurić dosegne kritičnu veličinu te ne može više apsorbirati energiju. Obzirom da se šupljina ne može održati bez konstantne ulazne energije, dolazi do samourušavanja mjehurića.

Osim o frekvenciji i intenzitetu ultrazvuka, mogućnost nastanka kavitacije ovisi o svojstvima proizvoda poput viskoznosti, gustoći, površinskoj napetosti itd. (*22*)



Slika 4. Djelovanje kavitacije (*23*)

1.6.2 Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) - spada u vrlo jednostavnu i djelotvornu ekstrakcijsku metodu koja ne koristi otapalo u procesu. Otkrivena je od strane poljskog analitičara Janusza Pawliszynskog 1989. godine. Najčešće se koristi u kombinaciji s vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa i uspješno se primjenjuje na veliki broj hlapljivih spojeva.

Prednost ovakve metode ekstrakcije nalazi se u tome što su klasični koraci uobičajene ekstrakcije integrirani u jedan korak te samim time pojednostavljuju postupak izolacije. Aparatura za mikroekstrakciju na krutoj fazi je vrlo jednostavna, sastoji se od nosača, igle i optičkog vlakna te je prikazana na slici 5. (*24*)

Vlakno koje se koristi kod mikroekstrakcije je obavijeno tankim polimernim filmom koji apsorbira i koncentrira organske spojeve. Prije uporabe vlakno moramo kondicionirati, izložiti ga djelovanju visoke temperature tijekom 0,5-4 h.



Slika 5. Aparatura za mikroekstrakciju (*25*)

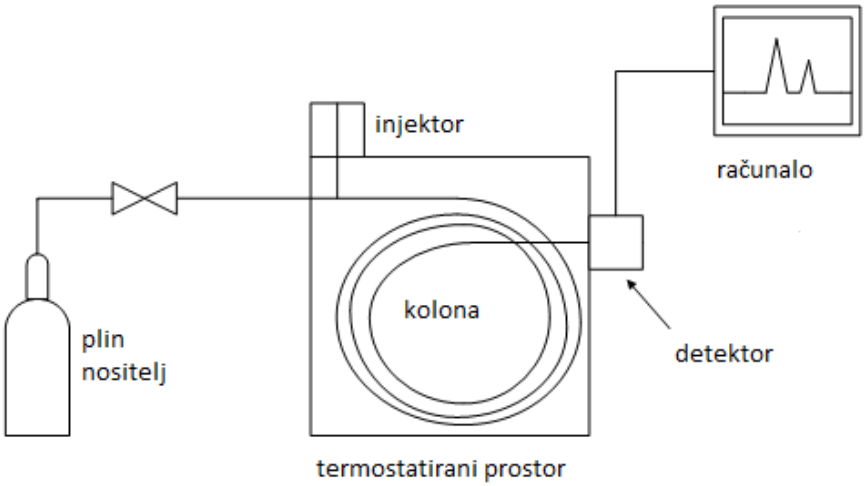
1.7 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza hlapljivih spojeva se pretežno provodi vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Pod analizom hlapljivih spojeva podrazumijeva se identifikacija pojedinih sastojaka smjese, odnosno kvalitativna analiza te određivanje udjela identificiranih sastojaka u smjesi, odnosno kvantitativna analiza.

1.7.1 Plinska kromatografija (GC) – jedna od najčešće korištenih metoda kod odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva. Plinski kromatograf se sastoji od injekcijskog bloka, kromatografske kolone, detektora i pisača (slika 6).

Prilikom rada plinskog kromatografa dolazi do brzog i potpunog isparivanja uzorka u injektoru. Mobilna faza je plin nosioc, obično inertni plin (He, Ar, N_2) koji ne utječe na proces odjeljivanja sastojaka smjese. Stacionarna faza je najčešće mikroskopski sloj tekućine nanesen na inertnu krutu podlogu unutar metalne kapilare nazvane kapilarna kolona. (*26*)

Zbog različite hlapljivosti i polarnosti, pojedine komponente smjese imaju različiti koeficijent razdvajanja, pa različitim brzinama putuju kolonom te na kraju izlaze iz nje kao čiste komponente. Obzirom da je kolona vezana za detektor i pisač dolazi do bilježenja promjena na osnovu promjene vodljivosti plina koji nosi komponentu.



Slika 6. Shema uređaja za plinsku kromatografiju (*27*)

Komponente koje su odijeljene na kromatografskoj koloni te iznesene plinom nositeljem, moraju se registrirati tj. detektirati, a neki od najčešćih detektora su:

- plamenoionizacijski detektor (engl. „*Flame Ionization Detector*“, FID)
- fotoionizacijski detektor (engl. „*Photo-ionization Detector*“, PID)
- detektor toplinske vodljivosti (engl. „*Thermal Conductivity Detector*“, FPD)
- detektor apsorpcije elektrona (engl. „*Electron Capture Detector*“, ECD)

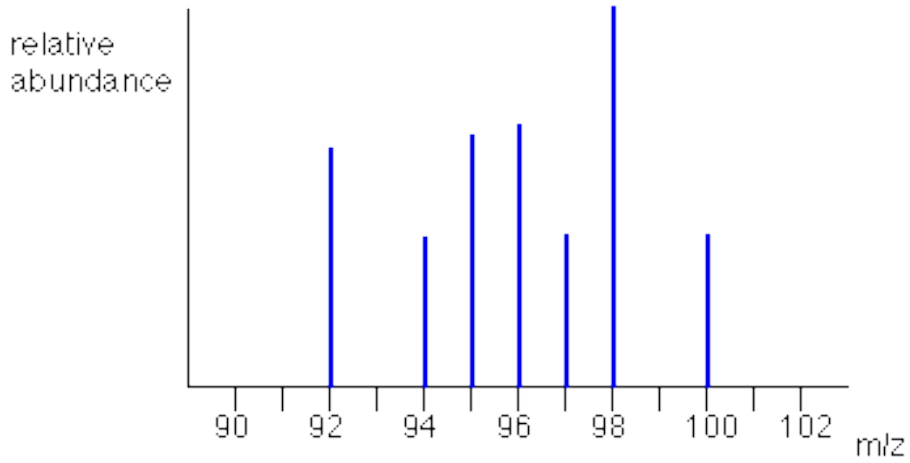
1.7.2 Spektrometrija masa - spada u analitičke tehnike u kojoj se molekule ioniziraju, a zatim se nastali ioni razdvajaju prema njihovoj masi. U izvoru iona dolazi do bombardiranja spoja s elektronima velike energije prilikom čega dolazi do ionizacije molekula uzorka. Ova metoda uključuje dva važna postupka, a to su ionizacija uzorka te razdvajanje i određivanje iona. (*4*)

Kako bi izveli proces moramo u komoru za bombardiranje uvesti malu količinu uzorka u plinovitom stanju uz uvjet da je komora pod vakuumom što olakšava ionima put od izvora do senzora bez da se sudare s ostalim molekulama. Prilikom bombardiranja s elektronima nastaje pozitivni ion M^+ koji se fragmentira prema sljedećoj jednadžbi:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$

$$M^+ \rightarrow M_1^+ + M_2^+ + M_3^+ \ldots$$

Na prikazan način nastaju različiti fragmenti koji se kasnijom analizom mogu identificirati i na taj način omogućiti određivanje kompletne kemijske strukture dotičnog spoja te vrijednost njegove molekulske mase. Nastali ioni se razvrstavaju u analizatoru prema intenzitetu i veličini *m*/*z*. Obzirom da se ioni na analizatoru registriraju kao električni signal, nastaje spektar masa prikazan kao linijski dijagram s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja fragmenata (*m*/*z*), (slika 7). (*24*)



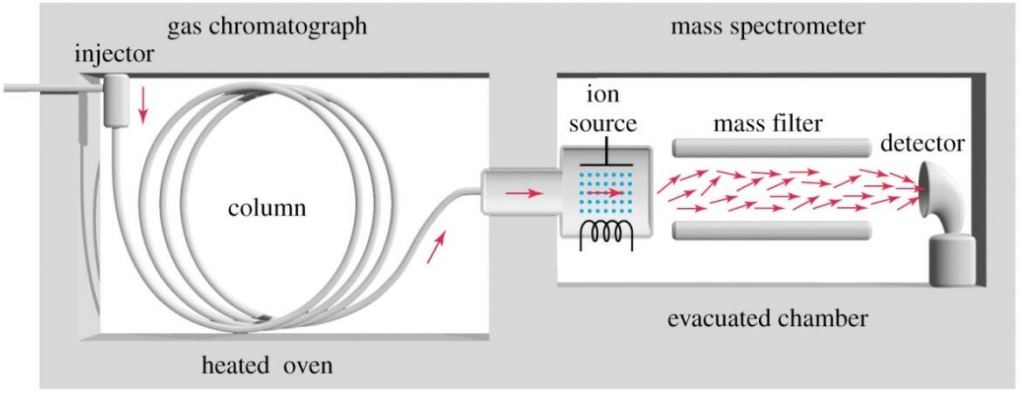
Slika 7. Spektar masa (*28*)

1.7.3 Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS) – vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je instrumentalna tehnika koja omogućava dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka. Spektrometar masa djeluje kao vrlo osjetljiv detektor za plinsku kromatografiju i može djelovati tako što će detektirati sve fragmente u zadanom intervalu ili će djelovati selektivno i detektirati samo određene fragmente. (*29*)

Uz pomoć plinskog kromatografa postižemo vrhunsku separaciju i kvantizaciju, ali nije dovoljno dobra za kvalitativno određivanje, gdje je spektrometrija masa gotovo savršena. Kombinacijom ovih dviju metoda možemo postići veliku brzinu i visoku osjetljivost unatoč velikom broju hlapljivih komponenti. (*30*)

Uzorak se prvo odjeljuje u termostatiranoj koloni plinskog kromatografa te dobivene komponente odlaze plinom nositeljem u detektor tj. spektrometar masa (slika 8). Nakon

što se dobije spektar masa, računalo vrši usporedbu s bazom podataka svih spektara masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega možemo identificirati spoj. (*15*)



Slika 8. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS (*31*)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 UZORAK MEDA S DODATKOM SOKA OD MALINE

Sastojci:

- med bagrem – 93%
- koncentrirani voćni sok maline – 7%

Zemlja porijekla: Hrvatska

Čuvati na sobnoj temperaturi.

Rok upotrebe otisnut na ambalaži.

Neto: 450 g



Slika 9. Uzorak meda koji je analiziran

Prosječna hranjiva vrijednost u 100 g proizvoda:

- energetska vrijednost – 1252 kJ / 299 Kcal
- masti – 0,0 g ; od toga zasićene masne kiseline 0,0 g
- ukupni ugljikohidrati – 79,8 g ; od toga šećeri 79,5 g
- vlakna – 0,3 g
- bjelančevine – 0,5 g
- sol – 0,0 g

Proizvodi: Pčelarstvo Daruvar d.o.o., 43500 Daruvar

Karakteristike meda:

- **boja** – tamno crvena boja s upečatljivim tonom boje ploda maline
- **miris** – karakterističan, s voćnom nijansom ploda maline
- **okus** – blago kiselkast, osjeti se karakterističan okus maline

2.2 APARATURE

Prilikom izvođenja ovog eksperimentalnog rada korištene su slijedeće aparature:

- Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju organskim otapalom:
    - tehnička vaga - Kern 572
    - ultrazvučna kupelj - Transsonic Typ 310/H, Njemačka
    - centrifuga - Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- Aparatura za jednostavnu frakcijsku destilaciju s Vigreauxovom kolonom
- Aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)
    - vodena kupelj s termostatom - Heidolph EKT 3001, Njemačka
    - držač za mikroekstrakciju - Supelco Co., SAD
    - sivo vlakno dužine 5 cm s ovojnicom divinilbenzen/ karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) (Supelco Co., SAD)
- Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC-MS)
    - GC 7820A, Agilent Technologies, SAD
    - MSD 5977E, Agilent Technologies, SAD
    - GC kapilarna kolona HP-SMS, J&W, SAD; Stacionarna faza: 5% difenil, 95% dimetilpolisilksan

2.3 KEMIKALIJE

Naziv:	**Proizvođač**:
CH_2Cl_2 (diklormetan)	Kemika, Zagreb
C_5H_{12} (pentan)	Kemika, Zagreb
$(C_2H_5)_2O$ (dietil-eter)	Kemika, Zagreb
$MgSO_4$ (magnezijev sulfat)	Fluka Chemie, p.a, Švicarska

2.4 IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Postupci izolacije hlapljivih i poluhlapljivih spojeva uključuju ultrazvučnu ekstrakciju organskim otapalima te mikroekstrakciju vršnih para na krutoj fazi. Nakon što smo proveli izolaciju na slijedeće načine, vršimo analizu izoliranih spojeva uz pomoć vezanog sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa.

2.4.1 Izolacija hlapljivih spojeva ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) - ova metoda se izvodila uz pomoć ultrazvučne kupelji uz djelovanje indirektne sonifikacije pri frekvenciji 35 kHz i temperaturi 25±3 °C. Ultrazvučna ekstrakcija (USE) se provodila s organskim otapalima pentan : dietil-eterom= 1:2 (v/v) te diklormetanom.

U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL s brušenim čepom se odvaže 40 g meda uz dodatak destilirane vode u količini od 22 mL. Zatim se odvaže 1,5 g MgSO4 i postepeno dodaje u otopinu uz intenzivno miješanje. Uzorak je ekstrahiran tri puta s pentan : dietil-eterom (1:2 v/v) te tri puta s diklormetanom i to na sljedeći način.

Pripremljenoj homogenoj smjesi meda doda se 20 mL otapala te se tako pripremljena tikvica uroni u ultrazvučnu kupelj i spoji s povratnim hladilom kao što je prikazano na slici 10.



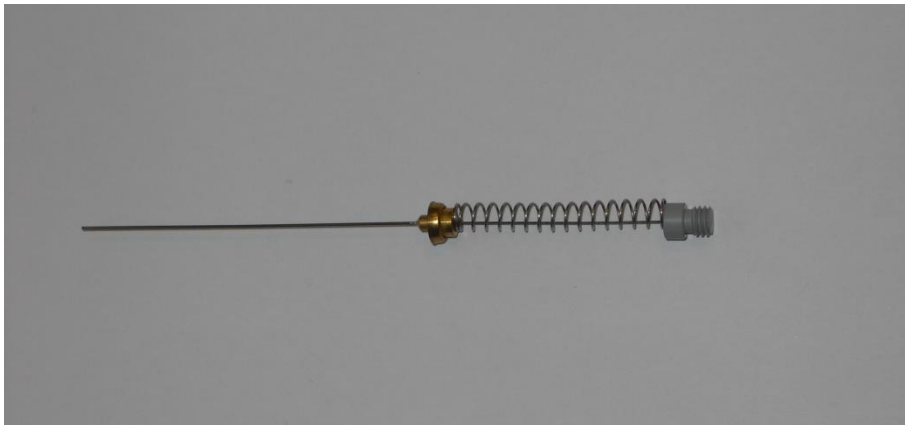
Slika 10. Ultrazvučna ekstrakcija

Vrijeme sonifikacije je 30 minuta na temperaturi 25 °C uz odstupanja do 3 °C. Nakon što završi ekstrakcija na opisan način, provodi se odjeljivanje organskog sloja uz pomoć kapaljke uz mogućnost da se prvo slojevi odjele pomoću centrifuge (4000 o/min). Kapaljkom se uzima organski sloj te suši filtriranjem preko lijevka s bezvodnim $MgSO_4$. Nadalje, dodaje se novih 20 mL otapala i nastavlja se proces sonifikacije idućih

30 minuta. Organski ekstrakt se odijeli, suši preko lijevka s $MgSO_4$ i pridruži prvom organskom ekstraktu. Otopina meda se i treći put ekstrahira uz dodavanje otapala, a daljnji postupak odjeljivanja je identičan prethodno opisanom.

Združeni organski ekstrakti se koncentriraju frakcijskom destilacijom (Vigreaux-ova kolona) do 1 mL te se čuvaju u zatvorenim posudama na -20 °C sve do analize vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Prije analiziranja uzorci se koncentriraju opreznim uparavanjem do volumena 0,2 mL, a 1 μL se koristi za analizu vezanim sustavom GC-MS.

2.4.2 Izolacija hlapljivih spojeva mikroekstrakcijom vršnih para (HS-SPME) - uz pomoć dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da je najpogodnije vlakno, obzirom na ukupan broj identificiranih spojeva, za apsorpciju vršnih para meda od bagrema „sivo vlakno“ s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) dužine 5 cm (Supelco Co., SAD), slika 11. (*32*)



Slika 11. Sivo vlakno s ovojnicom DVB/CAR/PDMS (*24*)

Mikroekstakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) provedena je u sljedeća četiri koraka:

- **kondicioniranje vlakna** – SPME igla se postavi u GC injektor te ostavi 60 minuta na temperaturi od 270 °C. Nakon kondicioniranja, vlakno se može koristiti za apsorpciju hlapljivih komponenti vršnih para.
- **priprema uzorka** – 5 mL zasićene vodene otopine meda stavi se u staklenu bočicu od 15 mL. Posuda se hermetički zatvori teflonskim PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj na 60 °C, a sadržaj se u njoj miješa

upotrebom magnetske miješalice (Heidolph MR Her-Standard (1000 o/min), slika 12.

- **adsorpcija hlapljivih spojeva iz uzorka** – nakon kondicioniranja uzorka, SPME igla se postavi u bočicu s uzorkom te se provodi ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 minuta, uz konstantno miješanje otopine uzorka meda.
- **desorpcija i analiza** – nakon uzorkovanja, SPME vlakno se vrati u iglu i izvuče iz posude te odmah bude postavljeno u GC injektor (250 °C, 7 min), gdje se provodi toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC koloni. Svaki uzorak je ekstrahiran tri puta. Injektiranje uzoraka je provedeno ručno pomoću držača za HS-SPME.



Slika 12. Aparatura za pripremu uzorka za HS-SPME (*32*)

2.5 ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Analiza hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf Agilent Technologies (model 7820A, SAD) u kombinaciji s masenim spektrometrom Agilent Technologies (model 5977E, SAD), spojenim na računalo, slika 13. Analize su izvršene na HP-5MS nepolarnoj kapilarnoj koloni.

Karakteristike kolone HP-5MS:

- stacionarna faza – (5% fenil)-metilpolisiloksan
- promjer – 0,25 mm
- duljina – 30 m
- debljina sloja stacionarne faze – 0,20 μm

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC):

- temperatura izvođenja plinske kromatografije je programirana 2 minute na 70 °C, a zatim je rasla 3 °C po minuti dok nije postignuta temperatura 200 °C.
- temperatura injektora je bila 250°C
- „*solvent delay*“ bio je 3 minute (vrijeme u kojem se ne snima spektar jer u tom vremenu otapalo izlazi)
- količina injektiranog uzorka bila je 1 μL
- mobilna faza (plin nositelj) – helij protoka 1 mL/min

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije – 70 eV
- temperatura detektora – 280 °C
- interval snimanja spektra – 30-300 masenih jedinica

Uzorak se dodao odjednom kako bi trenutno ispario. Spektrometar masa je korišten kao detektor, a reproducibilnost je osigurana kada su uspostavljeni stacionarni uvjeti, stabilizirani protoci i temperatura.

Za svaki analizirani uzorak kao rezultat vezanog sustava plinske kromatografije – spektrometrije masa (GC-MS) dobivaju se sljedeći podatci:

- kromatogram ukupne ionske struje
- udio pojedine komponente izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini kromatograma)
- vrijeme zadržavanja svake komponente (pik na kromatogramu)
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektra najsličniji spektru nepoznate komponente (sličnosti izražene u postotcima)

Identifikacija dobivenih pojedinačnih komponenti provedena je usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz komercijalne biblioteke masenih spektara (Wiley 9 MS library i NIST14) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Računanje retencijskog indeksa (RI) – retencijski indeks ili indeks zadržavanja neke komponente X je logaritam vremena zadržavanja (tR) interpoliran na homologni niz n-alkana. Prilagođeno vrijeme zadržavanja je vrijeme potrebno razmatranoj komponenti za dolazak do detektora na kraju kolone, a nakon što je nezadržani sastojak pristigao na detektor. Razlika između ukupnog vremena zadržavanja (tR) i zadržanog vremena (tM) naziva se prilagođeno vrijeme zadržavanja. (*33*)

$t`R = tR - tM$

Gdje je:

tM = vrijeme potrebno nezadržanoj komponenti za prolazak kroz kolonu

Indeks zadržavanja nekog sastojka X računa se prema formuli:

$RI(X) = 100 \times logt`R(X) - logt`R(N) / logt`R(N+1) - logt`R(N) + 100 \times N$

Gdje je:

X = nepoznati sastojak

N i $(N+1)_n$ = alkani

(N+1) C = alkan.



Slika 13. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

3. REZULTATI

Rezultati dobiveni analizom ekstrakata hlapljivih spojeva pomoću vezanog sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa, prikazani su tablično i u obliku kromatograma.

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva meda s dodatkom maline izoliranih HS-SPME metodom (vlakno s DVB/CAR/PDMS ovojnicom)

Red. br.	**RI[1]**	**Naziv spoja**	**Udio (%)**
1.	<900	dimetil-sulfid	9,3
2.	<900	2-furankarboksaldehid (furfural)	16,3
3.	965	benzaldehid	7,0
4.	994	6-metilhept-5-en-2-ol	2,0
5.	1076	*trans*-linalool oksid	13,9
6.	1087	1-(furan-2-il)-2-hidroksietanon*	2,1
7.	1091	*cis*-linalool oksid	1,3
8.	1101	linalol	1,9
9.	1105	nonanal	0,8
10.	1106	hotrienol	4,8
11.	1116	2-feniletanol	3,3
12.	1154	aldehid jorgovana	7,6
13.	1166	pinokarvon	1,7
14.	1193	nonan-1-ol	1,7
15.	1196	etil-heksadekanoat	2,2
16.	1336	3,4,5-trimetilfenol*	12,2
17.	1385	tetradec-1en*	1,2
18.	1388	*trans*-*β*-damascenon	3,3
Ukupno identificirano			***92,6***

[1] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS

* = točan izomer nije identificiran

** = spoj uvjetno identificiran samo analizom preko spektara masa

[a] = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva meda s dodatkom maline izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) koristeći otapalo pentan : dietil-eter (1 : 2 v/v)

Red. br.	**RI[1]**	**Naziv spoja**	**Udio (%)**
1.	<900	1,4-dimetilbenzen*	1,2
2.	<900	stiren	1,6
3.	942	α-pinen	0,8
4.	1000	dekan[a]	0,5
5.	1035	limonen	tr.
6.	1039	1,8-cineol	tr.
7.	1040	benzil-alkohol	1,6
8.	1076	*trans*-linalool oksid	tr.
9.	1084	metil-2-furoat*	1,4
10.	1101	linalol	tr.
11.	1111	*α*-tujon	0,7
12.	1116	2-feniletanol	1,2
13.	1162	benzojeva kiselina	8,6
14.	1221	4-vinilfenol**	9,2
15.	1230	5-hidroksimetifurfural	21,9
16.	1300	tridekan[a]	0,9
17.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	7,2
18.	1369	neril-acetat	0,2
19.	1376	farnezan	0,7
20.	1400	tetradekan[a]	1,3
21.	1429	4-hidroksifeniletanol	0,1
22.	1483	γ-kurkumen	1,0
23.	1500	pentadekan[a]	1,3
24.	1513	2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol	2,2
25.	1573	4-vinilsiringol**	6,5
26.	1661	4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid (siringil-aldehid)	1,8
27.	1774	metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat)[a]	6,4
28.	1790	4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)cikloheks-2-en-1-on**	3,5
29.	1867	3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-prop-2-enska kiselina (ferulična kiselina)	0,3

30.	1963	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	3,1
31.	2084	oktadekan-1-ol	2,3
32.	2181	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	1,1
33.	2300	trikosan	3,6
Ukupno identificirano			***92,6***

[1] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS

* = točan izomer nije identificiran

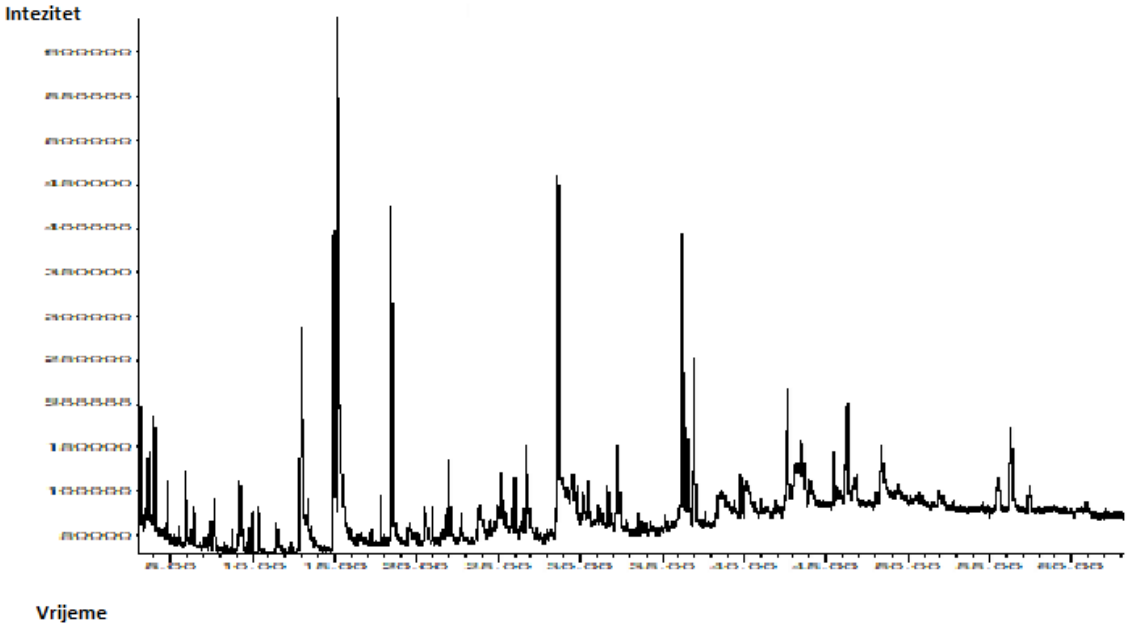
** = spoj uvjetno identificiran samo analizom preko spektara masa

[a] = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja

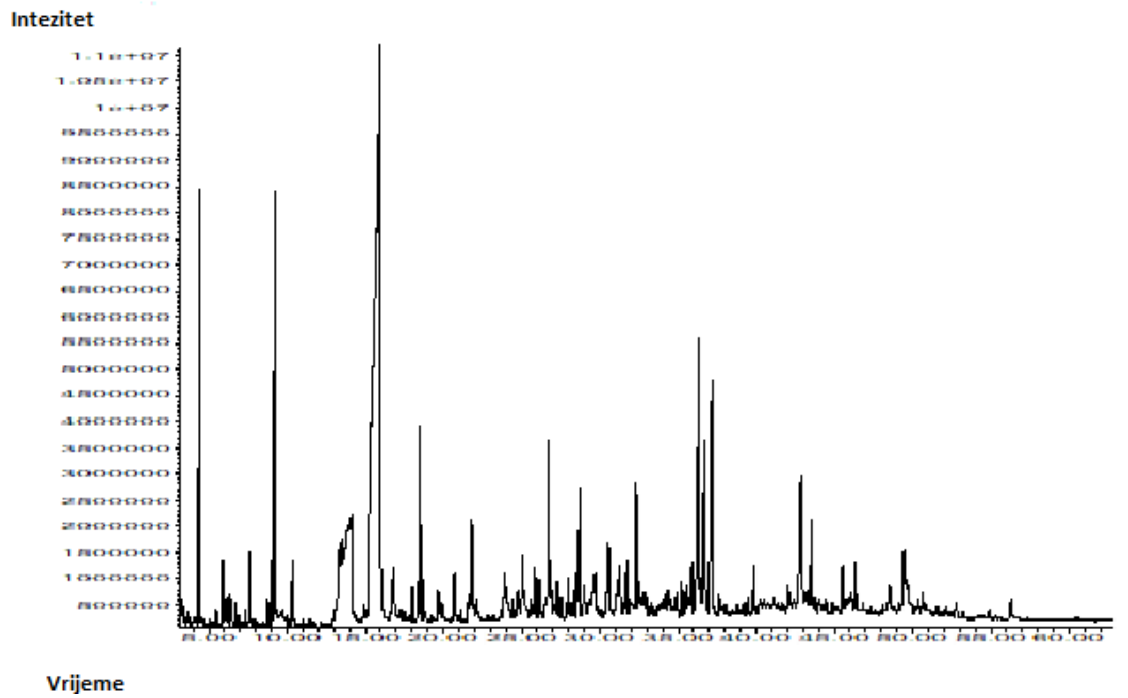
Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva meda s dodatkom maline izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) koristeći otapalo diklormetan

Red. br.	RI[1]	Naziv spoja	Udio (%)
1.	914	1-(2-furanil)etanon	3,1
2.	1040	benzil-alkohol	0,7
3.	1076	*trans*-linalool oksid	tr.
4.	1084	metil-2-furoat*	5,1
5.	1116	2-feniletanol	0,9
6.	1162	benzojeva kiselina	1,0
7.	1230	5-hidroksimetifurfural	43,9
8.	1269	2-feniloctena kiselina	1,5
9.	1314	4-vinil-2-metoksifenol	2,2
10.	1367	(*E*)-8-hidroksilinalol**	0,8
11.	1397	etil-dekanoat	1,1
12.	1429	4-hidroksifeniletanol	0,5
13.	1496	tetrahidro-6-pentil-2*H*-piran-2-on	0,5
14.	1513	2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol	2,2
15.	1565	4-(4hidroksifenil)buta-2-on	0,7
16.	1573	4-vinilsiringol**	1,5
17.	1593	etil-dodekanoat	0,5
18.	1617	3-hidroksi-*β*-damaskon	1,9
19.	1645	4-(4-hidroksifenil)butan-2-on (malina keton)	0,9
20.	1661	4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid (siringil-aldehid)	1,8
21.	1774	metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat)[a]	4,9
22.	1789	3-(4-hidroksifenil)-prop-2-enska kiselina (4-hidroksicimetna kiselina)	3,7
23.	1800	oktadekan	5,9
24.	1882	heksadekan-1-ol	0,6
25.	1963	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	3,6
26.	1992	etil-heksadekanoat (etil-palmitat)	1,0
27.	2100	heneikosan**	0,6
28.	2162	etil-oktadekanoat (etil-oleat)	0,5
Ukupno identificirano			***90,6***

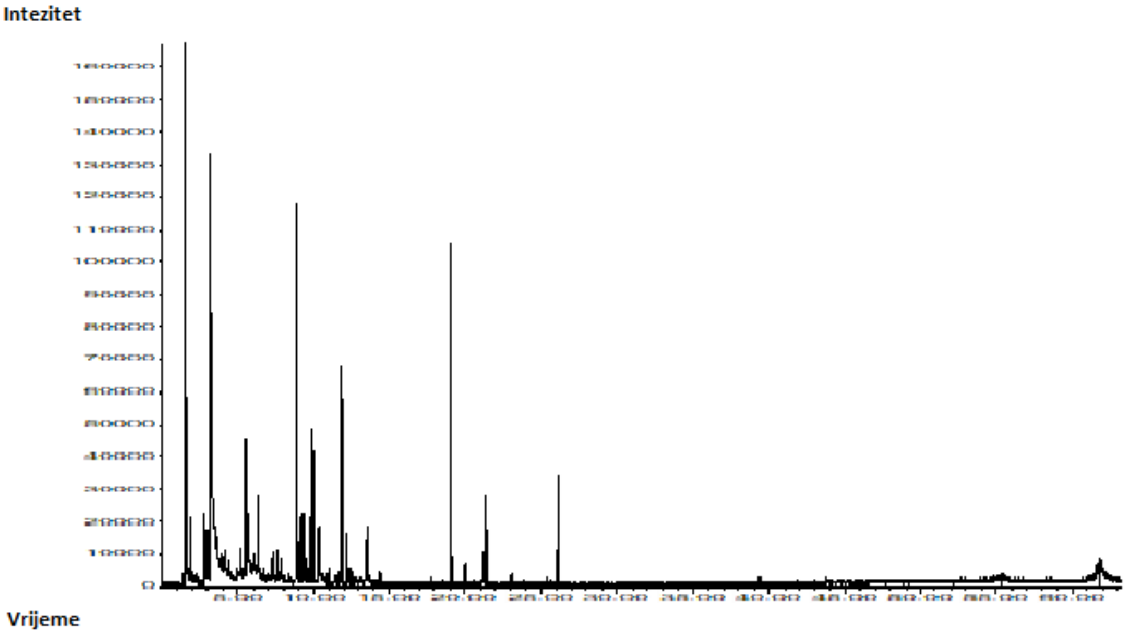
[1] RI = retencijski indeks na koloni HP-5MS
* = točan izomer nije identificiran
** = spoj uvjetno identificiran samo analizom preko spektara masa
a = identifikacija potvrđena pomoću referentnog spoja



Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda s dodatkom maline izoliranih pomoću USE ekstrakcije s organskim otapalom pentan : dietil-eter (1:2 v/v)



Slika 15. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda s dodatkom maline izoliranih pomoću ultrazvučne ekstrakcije s organskim otapalom diklormetan



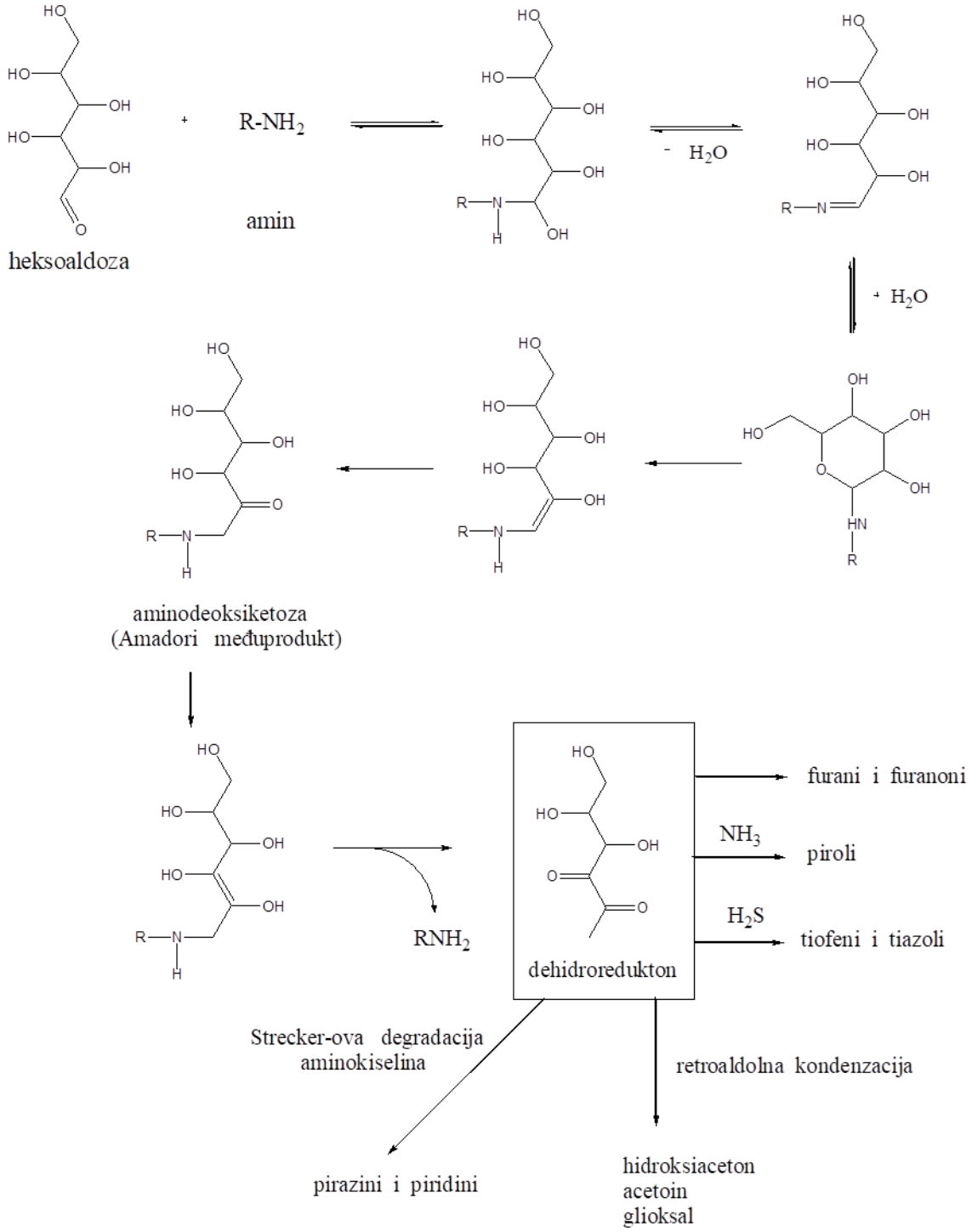
Slika 16. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivih spojeva meda s dodatkom maline izoliranih pomoću HS-SPME sa sivim vlaknom

4. RASPRAVA

Posebne odlike prehrambenih proizvoda proizlaze iz vrijednosti njihovih sastojaka, načinu proizvodnje te podneblju iz kojeg dolaze. U ovom radu su analizirani hlapljivi i poluhlapljivi spojevi meda bagrema s dodatkom soka od maline s ciljem određivanja reprezentativnog kemijskog sastava te identifikacija potencijalnih biomarkera ove vrste meda korištenog u proizvodnji kao i dodataka medu.

Neki od procesa dobivanja ovakve vrste proizvoda uključuju tretman visokom temperaturom, što potiče mnoge kemijske reakcije te time znatno djeluje na kemijski sastav gotovog proizvoda. Zagrijavanjem meda (iznad 50 °C) transformiraju se postojeći ili dolazi do tvorbe novih spojeva koji uzrokuju promjene u okusu, mirisu, aromi i boji meda. Spojevi koji nastaju djelovanjem visokih temperatura uglavnom su produkti Maillard-ovih reakcija (slika 17) i reakcija Strecker-ove degradacije aminokiselina (slika 18). Nastajanje ovih spojeva uvelike ovisi o temperaturi i duljini zagrijavanja kao i o pH vrijednosti meda te prirodi reaktanata.

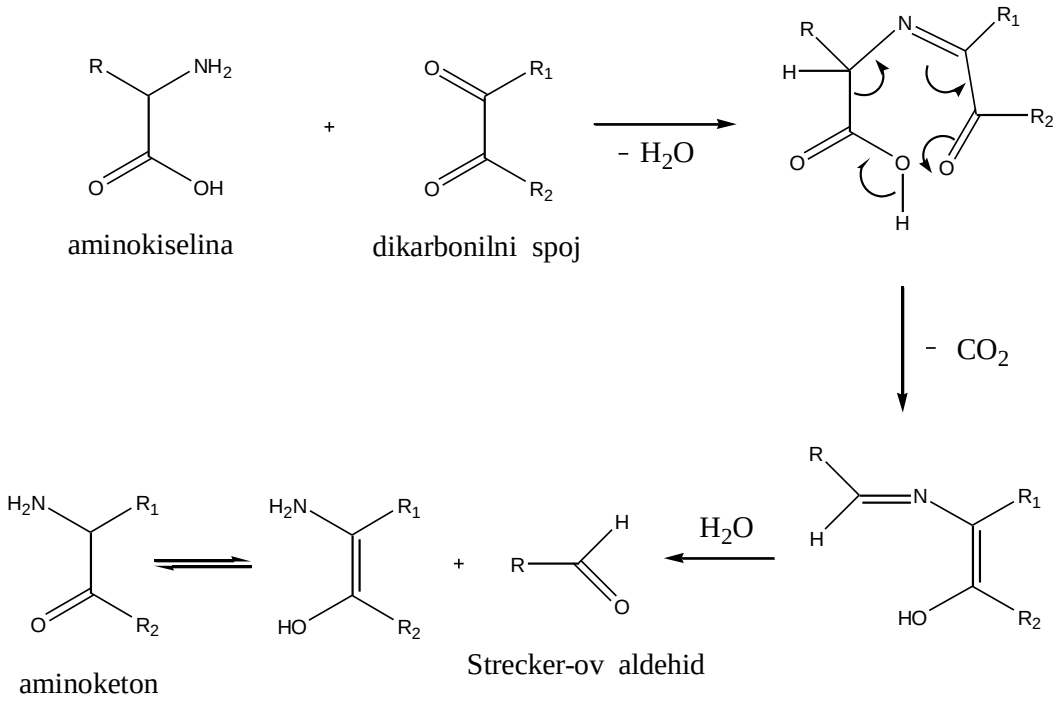
Maillard-ove reakcije temelje se na kondenzaciji karbonilne skupine uglavnom reducirajućih ugljikohidrata s α-amino skupinom slobodnih aminokiselina pri čemu nastaju toplinski nestabilni međuprodukti aminodeoksiketoze. Međuprodukti se dalje dehidratiziraju i deaminiraju dajući različite reaktivne produkte kao što su hidroksiketoni, dikarbonilni spojevi, derivati furfurala i furanona i drugo, a koji mogu kao reaktanti sudjelovati u reakcijama Strecker-ove degradacije aminokiselina. (*34*)



Slika 17. Opća shema Maillard-ove reakcije (*32*)

Strecker-ova degradacija aminokiselina se temelji na dekarboksilaciji i deaminaciji aminokiselina uz prisustvo dikarbonilnih spojeva koji uglavnom nastaju unutar Maillard-ovih reakcija. Prilikom Strecker-ove degradacije nastaje Strecker-ov aldehid i aminoketon. Strecker-ov aldehid može sudjelovati kao reaktivni karbonilni

spoj u Maillard-ovim reakcijama, dok aminoketoni sudjeluju u reakcijama ciklizacije kod tvorbe heterocikličkih spojeva (npr. pirazini). (*34*)



Slika 18. Opća shema Strecker-ove degradacije aminokiselina (*32*)

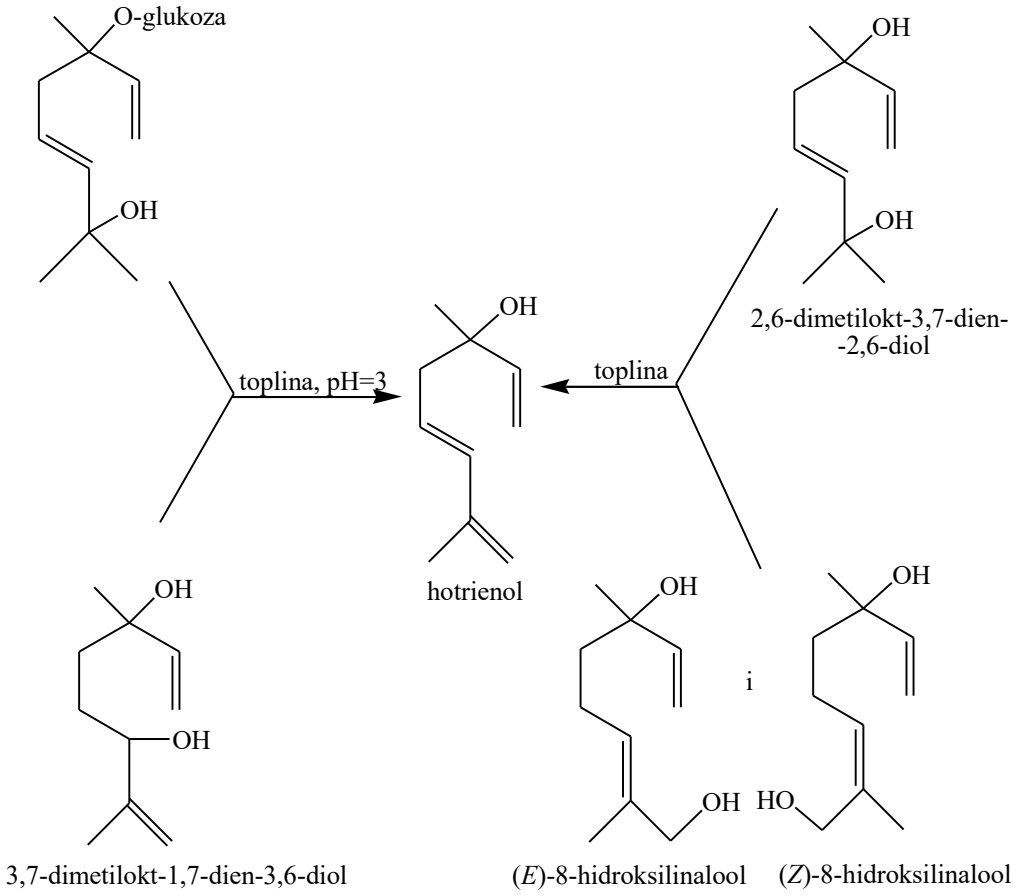
Za izolaciju hlapljivih i poluhlapljivih spojeva, korištene su metode ultrazvučne ekstrakcije organskim otapalom (USE) te mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME). Izolirani spojevi su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

4.1 HLAPLJIVI SPOJEVI UZORKA IZOLIRANI HS-SPME METODOM

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je provedena na temperaturi koja ne prelazi 60°C omogućavajući izolaciju hlapljivih i poluhlapljivih spojeva bez stvaranja termičkih artefakata što je bitno za dobivanje pouzdanih rezultata.

Izolirano je ukupno 18 spojeva, a kao najzastupljeniji spoj identificiran je 2-furankarboksaldehid (furfural; 16,3%). Derivati benzena su najzastupljenije

komponente vršnih para osobito 3,4,5-trimetilfenol (12,2%), benzaldehid (7,0%), 2-feniletanol (3,3%) i dr. Terpeni su druga grupa spojeva sa najvećim udjelom, osobito *trans*-linalol oksid (13,9%), linalol (1,9%) i *cis*-linalol oksid (1,3%). Iako ovom tehnikom med nije termički tretiran, izoliran je poznati termički artefakt hotrienol (4,8%). Identificirani hotrienol nastaje utjecajem topline no obzirom da tehnika HS-SPME ne koristi termičku obradu, pretpostavlja se da je hotrienol nastao tijekom proizvodnje ili tijekom zrenja meda.



Slika 19. Nastajanje hotrienola (*35*)

Izoliran je i aldehid jorgovana (7,6%), a biogenetska istraživanja su pokazala da aldehidi jorgovana nastaju iz linaloola, preko (E)-8-hidroksilinaloola koji se pretvara u alkohol jorgovana koji dalje oksidira u aldehid jorgovana. (*36*)

Identificiran je i dimetil-sulfid (9,3%) čija prisutnost vjerojatno ukazuje da su u procesu proizvodnje korišteni sumporni derivati u svrhu konzerviranja koncentriranog soka od maline.

4.2 HLAPLJIVI SPOJEVI UZORKA IZOLIRANI USE METODOM

Izolacija hlapljivih i poluhlapljivih spojeva uzorka mednoga proizvoda provedena je ultrazvučnom ekstrakcijom s dva otapala različite polarnosti (pentan : dietil-eter (1:2 v/v) i diklormetan).

4.2.1 Ekstrakcija pentan : dietil-eterom (1:2 v/v) – analizom je identificirano ukupno 33 spoja (tablica 4) od kojih je najzastupljeniji 5-hidroksimetilfurfural (21,9 %) čija prisutnost ukazuje na korištenje toplinskog tretmana prilikom proizvodnje ili uslijed neadekvatnog skladištenja proizvoda. Od karboksilnih kiselina i estera identificirani su derivati šikiminske kiseline kao što je metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat; 6,4%), benzojeva kiselina (8,6%), ferulična kiselina (0,3%) i dr. Ovi spojevi uglavnom potječu iz nektara i pronalazimo ih i u drugim vrstama meda. Ipak se može istaknuti veći postotak benzojeve kiseline.

Kao glavni predstavnik derivata benzena identificiran je 4-vinilfenol (9,2%) uz ostale derivate: 4-vinil-2-metoksifenol (7,2%), 4-vinilsiringol (6,5%), 2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol (2,2%), 1,4-dimetilbenzen (1,2%) te 2-feniletanol (1,2%). Od ostalih spojeva identificirani su: trikosan (3,6%), heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina; 3,1%), oktadekan-1-ol (2,3%), 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid (siringil-aldehid; 1,8%), benzil-alkohol (1,6%), stiren (1,6%), metil-2-furoat (1,4%), tetradekan (1,3%) te pentadekan (1,3%).

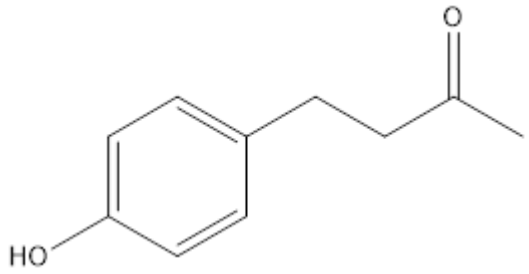
4.2.2 Ekstrakcija diklormetanom – analizom je identificirano ukupno 28 spojeva (tablica 5) od kojih je najzastupljeniji 5-hidroksimetilfurfural (43,9%) koji je karakterističan spoj za svaku vrstu meda i njegov udio raste starenjem meda. Od ostalih derivata furana najzastupljeniji je metil-2-furoat (5,1%).

Osim derivata furana, veliki udio imaju metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat; 4,9%) te oktadekan (5,9%). Kao glavni predstavnici derivata benzena identificirani su: 4-vinil-2-metoksifenol (2,2%), 2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol (2,2%), 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid (siringil-aldehid; 1,8%) te 4-vinilsiringol (1,5%).

Glavni predstavnik viših masnih kiselina je heksadekanska kiselina (palimitinska kiselina; 3,6%). Od ostalih spojeva najznačajniji su: 3-(4-hidroksifenil)prop-2-enska

kiselina (4-hidroksicimetna kiselina; 3,7%), 1-(2-furanil)etanon (3,1%), 3-hidroksi-β-damaskon (1,9%), 2-feniloctena kiselina (1,5%) i dr.

Specifični spoj koji je pronađen korištenjem diklormetana kao organskog otapala je 4-(4-hidroksifenil)-butan-2-on (0,9%). To je tzv. malina keton koji nam ukazuje na prisutnost ploda maline unutar ovog mednog proizvoda (slika 20). Malina keton se pojavljuje u različitim plodovima, a najviše ga ima u bobičastom voću. Nastaje biosintezom iz kumoroil-CoA.



Slika 20. Strukturna formula 4-(4-hidroksifenil)butan-2-on (malina keton)

Iz rezultata istraživanja hlapljivog profila uzorka mednog proizvoda „med s koncentriranim voćnim sokom od maline“ mogu se dobiti različite informacije o načinu proizvodnje ovog proizvoda kao i korištenju uniflornih vrsta meda u proizvodnji . Osim potencijalnih biomarkera za bagremov med, nađeni su i spojevi koji se nalaze u amorfinom medu (bagremovac) (*36*). Malina keton se može smatrati ključnim hlapljivim spojem kojim se može odrediti dodatak maline u proizvodnji ovog proizvoda.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata analize kemijskog sastava hlapljivih spojeva proizvoda od meda može se zaključiti sljedeće:

- Dobiveni rezultati pokazuju veliku raznolikost identificiranih hlapljivih i poluhlapljivih spojeva ovisno o korištenim metodama izolacije spojeva.
- Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) omogućava izolaciju najhlapljivijih spojeva u uzorku, spojeva male molekulske mase.
- Ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) se izoliraju hlapljivi i poluhlapljivi spojevi.
- Od sveukupnog broja identificiranih spojeva izoliranih iz uzorka, 18 ih je identificirano u vršnim parama mikroekstrakcijom na krutoj fazi (HS-SPME), a najzastupljeniji su: 2-furankarboksaldehid (furfural; 16,3%), 3,4,5-trimetilfenol (12,2%), dimetil-sulfid (9,3%), benzaldehid (7,0%), aldehid jorgovana (7,6%) i dr. Navedeni spojevi ne mogu se smatrati specifičnim jer se nalaze i u drugim vrstama meda. Za razliku od rezultata ultrazvučne ekstrakcije, mikroeksrakcijom je izolirana velika količina terpena, a neki od glavnih su: *trans*-linalool oksid (13,9%), linalol (1,9%) i *cis*-linalool oksid (1,3%). Izoliran je i hotrienol (4,8%).
- Ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) koristeći smjesu pentan : dietil-eter (1:2 v/v) je identificirano ukupno 33 spoja od kojih su najzastupljeniji: 5-hidroksimetilfurfural (21,9%), 4-vinilfenol (9,2%), 4-vinil-2-metoksifenol (7,2%) i 4-vinilsiringol (6,5%). Za razliku od HS-SPME izolirani su derivati šikiminske kiseline: benzojeva kiselina (8,6%), metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat; 6,4%) te ferulična kiselina (0,3%).
- Ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) koristeći diklormetan identificirano je ukupno 28 spojeva od kojih su najzastupljeniji: 5-hidroksimetilfurfural (43,9%), oktadekan (5,9%), metil-2-furoat (5,1%), metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoat (metil-siringat; 4,9%) te heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina; 3,6%). Specifičan spoj izoliran ultrazvučnom ekstrakcijom je 4-(4-hidroksifenil)butan-2-on (0,9%) tzv. malina keton koji ukazuje na prisustvo ploda maline.
- Pregledom rezultata dobivenih metodama izolacije spojeva vjerojatno se unutar uzorka nalazi i amorfin med (bagremovac) (Amorpha fructicosa L.).

6. LITERATURA

1. Ministarstvo poljoprivrede. Narodne novine d.d. [Mrežno] 15. Svibanj 2015. [Citirano: 15. Lipanj 2019.] https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html.

2. Christy E.Manyi-Loh, Roland N.Ndip i Anna M.Clarke. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *Molecular Sciences.* 2011., 12.

3. The Honey Association. *British honey importers and packers association.* [Mrežno] [Citirano: 21. Srpanj 2019.] http://www.honeyassociation.com/about-honey/history.

4. I., Drnasin. Profil isparljivih spojeva medakrkavine (Rhamnus spp.). *Diplomski rad.* Split : an., 2013.

5. S., Vidaković. Kemijska analiza bagremovog meda. *Završni rad.* Zagreb : an., 2016.

6. Pčelarstvo Krizmanić. *Domaći med.* [Mrežno] [Citirano: 16. Kolovoz 2019.] http://www.pcelarstvo-krizmanic.hr/domaci-med-cimet.php.

7. Honey Traveler. [Mrežno] [Citirano: 20. Kolovoz 2019.] https://www.honeytraveler.com/single-flower-honey/black-locust-acacia-honey/.

8. [Mrežno] [Citirano: 1. Rujan 2019.] https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/91P2H2nSXPL._SL1500_.jpg.

9. Batinić K, Palinić D. *Priručnik o medu.* Mostar : Federalni agromediteranski zavod Mostar, 2014.

10. Šarić G., Matković D., Hruškar M. i Vahčić N. Characterisation and Classification of Croatian Honey by Physicochemical Parameters. *Faculty of Food Technology and Biotechnology.* 2008.

11. Petra, Petričko. Fizikalno-kemijski parametri cvjetnog meda kontinentalne Hrvatske. *Završni rad.* Karlovac : Veleučilište u Karlovcu, 2015.

12. Danijel, Matulić. Ribarstvo, lovstvo i pčelarstvo. [aut. knjige] Međunarodni simpozij agronoma. *Zbornik radova.* Zagreb : Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 2019.

13. [Mrežno] [Citirano: 5. Rujan 2019.] https://dietetyczny.blog.polityka.pl/wp-content/uploads/2017/02/cukry.png.

14. Danica, Špoljar. Kvaliteta bagremovog meda Krapinsko-Zagorske županije. *Završni rad.* Karlovac : Veleučilište u Karlovcu, 2015.

15. Margarita, Markusović. Isparljivi spojevi meda Galactites tomentosa Moench. *Završni rad.* Split : Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011.

16. Magdalena, Crmarić. Utjecaj kratke toplinske obrade na hlapljive spojeve narančinog meda. *Završn rad.* Knin : Veleučilište "Marko Marulić" Knin, 2016.

17. J., Chem Cent. US National Library of Medicine. [Mrežno] 4. Travanj 2018. [Citirano: 5. Rujan 2019.] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884753/.

18. [Mrežno] [Citirano: 6. Rujan 2019.] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Hydroxymethylfurfural.png.

19. D., Vahčić N. i Matković. Multi Language Documents. [Mrežno] 18. Kolovoz 2009. [Citirano: 7. Rujan 2019.] https://documents.tips/documents/kemijske-fizikalne-i-senzorske-karakteristike-meda.html.

20. B., Vočević. *Jagoda, malina, kupina.* Bjelovar : NERON d.o.o., 2005. ISBN 953-6698-21-8.

21. Matija, Gretić. Ultrazvučna, mikrovalna i tlačna ekstrakcija otapalom. s.l. : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2016.

22. Drmić H., Jambrak Anet R. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. 2, 2010., Svez. II.

23. [Mrežno] [Citirano: 8. Rujan 2019.] https://www.semanticscholar.org/paper/Ultrazvu%C4%8Dna-ekstrakcija-bioaktivnih-spojeva-Drmi%C4%87-Jambrak/7c996973f5fa32878009ec42d4280f1ba2389542/figure/2.

24. Ljubica, Čikeš Marija. Profil hlapljivih spojeva začina origana prije i nakon zagrijavanja. *Završni rad.* Split : Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.

25. [Mrežno] [Citirano: 10. Rujan 2019.] https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/ay/c4ay01151a#!divAbstract.

26. Kobis, ovlašteni distributer za Thermo Scientific. [Mrežno] [Citirano: 10. Rujan 2019.] https://www.kobis.hr/prodajni-program/kromatografija/plinska-kromatografija/.

27. [Mrežno] [Citirano: 10. Rujan 2019.] https://petraratajc.com/2017/03/18/gcms/.

28. [Mrežno] [Citirano: 11. Rujan 2019.] https://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html.

29. D., Ivanov. Tehnologija hrane. [Mrežno] 8. Veljača 2008. [Citirano: 11. Rujan 2019.] https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/gasna-hromatografija-masena-spektrometrija-gc-ms.

30. Paul, Gates. University of Bristol. [Mrežno] [Citirano: 12. Rujan 2019.] http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html.

31. [Mrežno] [Citirano: 12. Rujan 2019.] https://orgspectroscopyint.blogspot.com/2014/11/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc.html.

32. Zvonimir, Marijanović. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. *Doktorski rad.* Osijek : Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2014.

33. Radić Nj., Kukoč Modun L.,. *Uvod u analitičku kemiju.* Zagreb : Školska knjiga, 2016.

34. Ana, Kasum. Karakterizacija mednoga proizvoda "abbamele" i sastav isparljivih spojeva tipičnih uniflornih medova sardinije. *Doktorski rad.* Zagreb : Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2011.

35. Alissandrakis E., Tarantilis PA, Harizanis PC, Polissiou M. Aroma investigation of Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. s.l. : Food Chemistry, 2007. 100, 396-404.

36. Merlina, Šola. Isparljivi spojevi meda amorfe. *Završni rad.* Split : Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2009.