Izolacija hlapljivih spojeva meda od ružmarina ultrazvučnom ekstrakcijom prije i nakon zagrijavanja

Uidl, Dora

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:167:256879

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

IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA MEDA OD RUŽMARINA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM PRIJE I NAKON ZAGRIJAVANJA

ZAVRŠNI RAD

DORA UIDL

Matični broj 23

Split, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA MEDA OD RUŽMARINA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM PRIJE I NAKON ZAGRIJAVANJA

ZAVRŠNI RAD

DORA UIDL

Matični broj: 23

Split, srpanj 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

ISOLATION OF VOLATILE COMPOUNDS OF ROSEMARY HONEY BY ULTRASONIC EXTRACTION BEFORE AND AFTER HEATING

BACHELOR THESIS

DORA UIDL
Parent number: 23

Split, July 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

IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA MEDA OD RUŽMARINA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM PRIJE I NAKON ZAGRIJAVANJA

Dora Uidl, 23

Sažetak:

Mnogi spojevi biološkog i botaničkog podrijetla u medu nisu stabilni, naročito hlapljive tvari, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom sazrijevanja meda, njegova skladištenja i zagrijavanja. U ovom radu se istraživao utjecaj zagrijavanja na sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u medu od ružmarina. Uzorak meda se zagrijavao na 60 ºC (2 sata) sa dodatkom vode. Hlapljivi spojevi ekstrahirani su pomoću pentan:dietil-etera = 1:2 (v/v) i diklormetanskog otapala postupkom ultrazvučne ekstrakcije (USE) pri sobnoj temperaturi. Ekstrakti su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Dominantni spoj identificiran u oba ekstrakta dobivena nakon zagrijavanja meda na 60 ºC je 5-hidroksimetilfurfural.

Ključne riječi: med od ružmarina, zagrijavanje, ultrazvučna ekstrakcija, GC-MS, hlapljivi spojevi

Rad sadrži: 35 stranica, 16 slika, 5 tablica, 45 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić	član
3. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član - mentor

Datum obrane: 11. srpnja 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. 19.
Mentor: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

TITLE

Dora Uidl, 23

Abstract:

Many compounds of biological and botanical origin in honey are not stable, particulary volatile substances, and their structures can be trandformed during honey maturation, storage and heating. In this paper the influence of heating on the composition and content of rosemary honey was investigated. The honey sample was heated up to 60 ^{o}C (2 hours) with the addition of water. Volatile compounds were extracted with pentane:diethyl ether = 1:2 (v/v) and dichloremethane using ultrasound assisted solvent extraction (USE) at room temperature. The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The dominant compounds identified in both extracts after heating them up to 60 ^{o}C was 5-hydroxymethylfurfural.

Keywords: rosemary honey, heating, USE, GC-MS, volatile compounds

Thesis contains: 35 pages, 16 figures, 5 tables, 45 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević, PhD, associate prof.
2. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant prof.
3. Zvonimir Marijanović, PhD, assistant prof.

Defence date: July 11th, 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 ožujka do svibnja 2019. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada te tijekom izrade i pisanja ovog završnog rada.

ZADATAK

Zadatak završnog rada bio je odrediti sadržaj hlapljivih spojeva iz uzorka meda od ružmarina.

U tu svrhu bilo je potrebno:

- Odrediti kemijski profil hlapljivih spojeva uzorka monoflornog meda od ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) prije i nakon zagrijavanja (60°C, 2 sata),

- Izolaciju hlapljivih spojeva izvršiti pomoću ultrazvučne ekstrakcije (USE) s organskim otapalima pentan:dietil-eter= 1:2 (v/v) i diklormetanom,

- Izolirane spojeve analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), te usporediti razliku u analizi prije i poslije zagrijavanja.

SAŽETAK

Mnogi spojevi biološkog i botaničkog podrijetla u medu nisu stabilni, naročito hlapljive tvari, a njihove se strukture mogu transformirati tijekom sazrijevanja meda, njegova skladištenja i zagrijavanja. U ovom radu se istraživao utjecaj zagrijavanja na sastav i sadržaj hlapljivih spojeva u medu od ružmarina. Uzorak meda se zagrijavao na 60°C (2 sata) sa dodatkom vode. Hlapljivi spojevi ekstrahirani su pomoću pentan:dietil-etera = 1:2 (v/v) i diklormetanskog otapala postupkom ultrazvučne ekstrakcije (USE) pri sobnoj temperaturi. Ekstrakti su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Dominantni spoj identificiran u oba ekstrakta dobiveni nakon zagrijavanja meda na 60°C je 5-hidroksimetilfurfural.

Ključne riječi: med od ružmarina, zagrijavanje, utrazvučna ekstrakcija, GC-MS, hlapljivi spojevi

SUMMARY

Many compounds of biological and botanical origin in honey are not stable, particulary volatile substances, and their structures can be trandformed during honey maturation, storage and heating. In this paper the influence of heating on the composition and content of rosemary honey was investigated. The honey sample was heated up to 60°C (2 hours) with the addition of water. Volatile compounds were extracted with pentane : diethyl ether = 1:2 (v/v) and dichloromethane using ultrasound assisted solvent extraction (USE) at room temperature. The extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The dominant compounds identified in both extracts after heating them up to 60°C was 5-hydroxymethylfurfural.

Keywords: rosemary honey, heating, ultrasound assisted solvent extraction, GC-MS volatile compounds

SADRŽAJ

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. MED 2
1.2. NASTAJANJE MEDA 3
1.3. KEMIJSKI SASTAV MEDA 3
1.4. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA 7
1.5. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA 8
1.6. STANDARDNE METODE ANALIZE MEDA 9
1.7. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA 10
1.8. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA 13

2. EKSPERIMENTALNI DIO 15

2.1. OPĆE KARAKTERISTIKE MEDA OD RUŽMARINA (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) 15
2.2. PRIPREMA UZORKA 16
2.3. KEMIKALIJE 16
2.4. APARATURE 17
2.5. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM ORGANSKIM OTAPALOM 17
2.6. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS) 18

3. REZULTATI 21

4. RASPRAVA 27

5. ZAKLJUČAK 31

6. LITERATURA 32

UVOD

Med je svima dobro poznat sladak, viskozni proizvod kojeg pčele proizvode od cvjetnog nektara. Osim što se koristi kao sladilo, koristi se i kao lijek, osobito kod sprječavanja upala te u kozmetičkoj industriji.

Povijest meda je starija od povijesti čovjeka. Med je jedna od najstarijih prirodnih namirnica poznatih ljudima. Od samih početaka čovječanstva, poznat je kao hrana i lijek. Stoljećima se smatrao i darom s neba za kojeg se vjerovalo da ima mnoge moći.

Zbog kompleksnog sastava, na svijetu ne postoje dva meda jednakog sastava. Pored visokog udjela šećera, med se sastoji još od vode, proteina, aminokiselina, vitamina, minerala, pigmenata i organskih kiselina čije komponente pridonose pozitivnom utjecaju na ljudsko zdravlje.

1. OPĆI DIO

1.1. Med

Med je viskozna slatka tekućina ili kristaliziran proizvod koji nastaje od nektara što ga medonosne pčele skupljaju na cvjetovima ili medonosnim biljkama. Prirodni je proizvod koji ima brojne pozitivne učinke na zdravlje ljudi, te jedna od najprobavljivijih i najiskoristivijih namirnica što je posljedica izuzetno složenog kemijskog sastava. Budući da u kemijskom sastavu prevladavaju fruktoza i glukoza, smatra se izuzetno energetski bogatom namirnicom.

Povijest meda je starija od povijesti čovječanstva. Od davnina je bio poznat kao hrana i lijek, ali i kao sredstvo plaćanja te plijen mnogih ratnih pohoda. Dugo se vjerovalo da je ova poslastica dar s neba, da ima mnoge moći, a u nekim kulturama se čak štovao kao simbol plodnosti i besmrtnosti. (1)



Slika 1. Vrcani med (2)

Med se može podijeliti na nekoliko osnovnih vrsta:

a) prema podrijetlu:

- cvjetni ili nektarni med koji se dobiva od nektara biljaka
- medljikovac ili medun koji se dobiva uglavnom od izlučevina kukaca koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka

b) prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja:

- med u saću
- med sa saćem
- cijeđeni med
- vrcani med koji se dobiva vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
- prešani med koji se dobiva prešanjem saća bez legla
- filtrirani med je med koji se dobiva postupkom odstranjivanja stranih organskih ili anorganskih tvari. (3)

1.2. Nastajanje meda

Med je jedna od rijetkih namirnica danas koja nastaje proizvodnjom bez ljudske pomoći. Skoro sve zasluge za proizvodnju ove slatke namirnice idu pčelama. Uz pčele kao glavne i vrlo važne proizvođače, važna sirovina je nektar. Nektar je slatka tekućina raspršena u vidu sitnih kapljica koja nastaje u žlijezdama biljaka. Kada slete na cvijet ili medonosnu biljku, pčele usišu nektar kojeg zatim skladište u mednom mjehuru. Ovdje započinje složeni proces, to jest cijepanje saharoze na glukozu i fruktozu. Po dolasku u košnicu, pčela odlaže med u košnicu te kako u ovoj fazi med ima preveliki udio vode, pčele krilima zajedno propuhuju košnicu kako bi višak vode isparilo. (4)

1.3. Kemijski sastav meda

Kemijski sastav uvelike ovisi o čimbenicima kao što su geografsko te botaničko podrijetlo pa tako u svijetu postoji jako veliki broj različitih vrsta meda. Geografski i botanički čimbenici daju dobru bazu za raznolikost meda u Hrvatskoj.

Zajedničko svim vrstama meda u svijetu je dominacija ugljikohidrata u kemijskom sastavu. Osim ugljikohidrata, u medu postoji još oko 200 komponenti čiji udjeli svaki med čine jedinstvenim. Najznačajnije komponente, uz ugljikohidrate, su voda, proteini, aminokiseline, vitamini, minerali, pigmenti i organske kiseline. (5)

- **Ugljikohidrati**

Osnovnu karakteristiku medu daju ugljikohidrati. Zbog njihovog visokog sadržaja, u prosjeku 80-83 %, med je izvrstan izvor energije (304 kcal/100 g). Dnevna doza od 20 g meda pokriva oko 3 % potrebne dnevne energije. (6)
Najzastupljeniji šećeri u medu su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Šećeri u medu (6)

MONOSAHARIDI	DISAHARIDI	TRISAHARIDI	OLIGOSAHARIDI
Fruktoza	Saharoza	Rafinoza	Izomaltotetrioza
Glukoza	Izomaltoza	Maltotrioza	Izomaltopentaoza
Galaktoza	Maltoza	Panoza	
	Trehaloza	Izomaltotrioza	

- **Voda**

Sadržaj vode u medu je čimbenik kvalitete koji određuje sposobnost meda da ostane svjež i da se izbjegne njegovo kvarenje. Udio vode u medu ovisi o pasmini pčela, snazi pčelinje zajednice, klimatskim uvjetima, temperaturi i vlažnosti zraka u košnici, načinu čuvanja te o botaničkom podrijetlu meda. Iako ovisi o puno čimbenika, voda je drugi najzastupljeniji sastojak u svim vrstama meda, a zakonski udio vode u medu ovisi o vrsti te iznosi od 15 do 20 %.

- **Proteini i aminokiseline**

Proteini i aminokiseline u medu pripisuju se životinjskim i biljnim izvorima. Glavni izvor je pelud, a uz njega su česti tekućine i nektarske sekrecije žlijezda slinovnica i ždrijela pčela. (8)

Na aminokiseline otpada 1 % sastojaka meda, a njihovi relativni omjeri ovise o podrijetlu meda. Najbrojnija aminokiselina u medu i peludi je prolin. Osim prolina, druge aminokiseline prisutne u medu uključuju glutaminsku kiselinu, asparaginsku kiselinu, glutamin, histidin, glicin, treonin, β-alanin, arginin, tirozin, valin, metionin i cistein. (5)

- **Minerali**

Minerali, za razliku od vitamina i aminokiselina, ne podliježu degradaciji dok su izloženi toplini, svjetlu, oksidirajućim sredstvima, ekstremnim pH ili drugim čimbenicima koji utječu na organske hranjive tvari. (5)

U svjetlijim medovima minerali zauzimaju 0,1 % dok u tamnijim zauzimaju 0,2 % ukupnog sadržaja komponenata. Najčešći minerali u medu su kalij, kalcij, sumpor, natrij, klor, fosfor, aluminij i željezo. (7)

- **Enzimi**

Enzimi igraju vitalnu ulogu prilikom zrenja nektara u med. Enzimske reakcije u nektaru i tijekom zrenja meda rezultiraju širokom lepezom spojeva koji pridonose jedinstvenom karakteru i funkcionalnosti meda. Složeni ugljikohidratni profil meda djelomično je rezultat enzimatskog djelovanja. Od najveće važnosti u medu su enzimi invertaza, diastaza te β-D-glukoza (glukoza oksidaza). (9)

- **Vitamini**

Med sadrži male količine vitamina, uglavnom topljivih u vodi.
Vitamini koje nalazimo u medu su tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinska kiselina (B3), pantotenska kiselina (B5), piridoksin (B6), biotin (B8), folna kiselina (B9) te vitamin C. (5)

- **Organske kiseline**

Organske kiseline su prisutne u medu također u malim koncentracijama, ali značajno pridonose njegovim organoleptičkim i fizikalno-kemijskim svojstvima (kiselost, pH i električna vodljivost). Ove kiseline se dobivaju izravno iz nektara ili od šećera djelovanjem enzima koji luče pčele kada pretvaraju nektar u med. Mnogi su autori zabilježili povećanje kiselosti tijekom vremena, kao i tijekom fermentacije kao rezultat transformacije šećera meda i alkohola u kiseline djelovanjem kvasaca meda. U medu se mogu identificirati i do 32 organske kiseline, uključujući octenu, mravlju, oksalnu, sukcinsku i druge. (6)

- **Toksični spojevi**

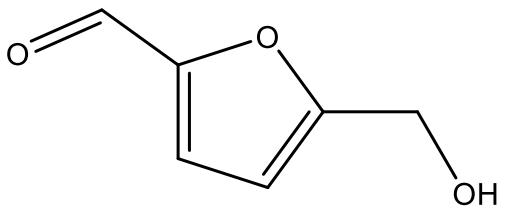
Uz nutritivnu vrijednost i sve pozitivne učinke na ljudski organizam, med svejedno može biti opasan po ljudsko zdravlje. Može biti napravljen od nektara koji je otrovan ili sadržavati spore bakterija što su razlozi da se med ne daje djeci starijoj od jedne godine. (10,11)

Glavni problem posljednjih godina bio je kontaminacija meda antibioticima koji se koriste protiv pčelinjeg oboljenja. U Europskoj Uniji antibiotici se ne smiju koristiti u tu svrhu, pa med koji sadrži antibiotike ne smije biti stavljeno na tržište. Poznato je da nekoliko biljaka čiju pelud pčele koriste za proizvodnju nektara, daju otrovan med. Najpoznatije su *Nerium oleander* L., *Rhododendron ponticum* L. i *Rhododendron luteum* L. (11)

- **Hidroksimetilfurfural**

HMF je heterociklički organski spoj sa 6 ugljikovih atoma koji sadrži aldehidnu i alkoholnu funkcionalnu skupinu. Čvrsta je tvar žute boje koja ima nisku točku taljenja, ali je lako topljiva u vodi. (10) Stvaranju HMF-a prethodi dehidracija heksoza kao što su fruktoza i glukoza u medu, pri niskoj pH vrijednosti. Faktori koji utječu na reakciju stvaranja istog su povišena temperatura, vrijeme izlaganja povišenoj temperaturi, nizak pH te uvjeti skladišta. Dakle, izlažemo li med povišenoj temperaturi dovoljno dugo, ubrzat će se reakcija te će med imati sve veću količinu HMF-a. Također, skladišti li se med dugo pri niskoj temperaturi, uz niski pH, količina istoga će rasti. (8)

Udio HMF-a će dakle u svježem prirodnom medu biti nizak, stoga se njegov udio koristi kao pokazatelj patvorenog meda koji se zagrijavao ili mu se dodavao šećerni sirup. (13)



Slika 2. Hidroksimetilfurfural

1.4. Fizikalna svojstva meda

Fizikalna svojstva meda usko su povezana s kemijskim sastavom istoga. (14) Kristalizacija meda i optička aktivnost ovise o omjeru ugljikohidrata, viskoznost o udjelu vode, a električna vodljivost o udjelu mineralnih tvari. (15)

- **Kristalizacija**

Kristalizacija u medu je pojava kristala glukoze zbog koje med mijenja svoju konzistenciju iz tekućeg u kruti. Sama pojava ne znači da je med loš ili patvoren. Med koji je prirodan i koji nije zagrijavan spontano će vremenom kristalizirati i to neće utjecati na njegovu aromu i kvalitetu. Faktori koji će pripomoći kristalizaciji su omjer šećera u medu, metode kojima je med obrađivan te uvjeti skladištenja. (16)

Med kristalizira jer je prezasićena otopina u kojoj ima u prosjeku 80 % šećera i 15 % vode. Ako je u medu udio glukoze veći od udjela fruktoze, kristalizacija će lako započeti. (17) Glukoza dehidrira pri čemu nastaje glukoza monohidrat. U tom procesu glukoza formira kristaliće dok fruktoza ostaje u primarnom stanju i tvori tanak sloj oko kristalića glukoze.

Iako je kristalizacija prirodna pojava, neki proizvođači ju ipak žele spriječiti. Razlog tomu je što tvorbom kristala glukoze, udio vode se povećava u drugim dijelovima meda. Povećani udio vode je faktor koji može pridonijeti fermentaciji meda. (18)

- **Optička aktivnost**

Optička aktivnost sposobnost je kiralnih molekula da zakreću polarizirano svjetlo. Kako se kiralnost u medu pripisuje ugljikohidratima, različite vrste medova imaju različitu optičku aktivnost. Kao rezultat, optička aktivnost se ponekad koristi kao parametar kod razlikovanja meda medljikovca i nektarnog meda. Med medljikovac u sebi sadrži ugljikohidrat melecitozu koji zakreće svjetlost udesno, dok nektarne sorte meda, zbog većeg sadržaja fruktoze, svjetlost zakreću ulijevo. (19)

- **Viskoznost**

Viskoznost je svojstvo fluida da se opire tečenju. U medu ona ovisi najviše o udjelu vodi, a zatim i o temperaturi okoline u kojoj se med nalazi. Dakle, što je manji udio vode u medu, to će on imati veću viskoznost. Povećanjem temperature, viskoznost meda će se smanjiti. (19)

- **Higroskopnost**

Med s većim udjelom vode lakše fermentira nego med s manjim udjelom vode. (20) Higroskopnost je sposobnost tvari da upijaju vlagu te je zbog toga vrlo bitno svojstvo. Med ima izraženo svojstvo higroskopnosti pri čemu upija vlagu iz zraka. Kao posljedica toga, dolazi do povećanja količine vode u površinskom sloju meda. Kako med ima izraženu viskoznost, gibanje apsorbirane vode s površine u unutrašnjost je jako spora pa apsorbirana voda ostaje na površini meda. Ovaj proces je uvjetovan velikim sadržajem ugljikohidrata fruktoze koji je izrazito higroskopan. (7)

1.5. Senzorska svojstva meda

- **Boja meda**

Boja meda ovisi o botaničkom podrijetlu pa tako bagremov med ima izrazito svijetlu boju dok kestenov med ima izrazito tamnosmeđu boju. Ostale vrste meda opisuju boje između te dvije nijanse.

Također je dokazano da boja ovisi o udjelu karotenoida (žuta boja- karoten i ksantofil), klorofila, antocijana (ružičasta boja) te tanina (tamna boja). Posljedica Maillardove reakcije u kojoj dolazi do kondenzacije proteina ili aminokiselina s reducirajućim ugljikohidratima, također utječe na boju tako da ona postaje tamnija. (21)



Slika 3. Nijanse meda (22)

- **Arome meda**

Hlapljivi spojevi u medu dobivaju se različitim biosintetskim putevima i ekstrahiraju se pomoću različitih metoda s različitim stupnjevima selektivnosti i učinkovitosti. Ovi spojevi su grupirani u kemijske kategorije kao što su aldehidi, ketoni, kiseline, alkoholi, ugljikovodici, terpeni i benzenski spojevi i njihovi derivati, furanski i piranski. Oni predstavljaju profil specifičnog meda i stoga se mogu koristiti za razlikovanje monoflornih medova čime se dobivaju vrijedne informacije o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu meda. (23)

1.6. Standardne metode analize meda

Fizikalne i kemijske metode analize meda postoje kako bi se ispitali i utvrdili temeljeni zahtjevi kakvoće koje med i proizvodi od meda moraju ispunjavati. Zahtjevi kakvoće koji se ovim metodama određuju ovise o botaničkom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, načinima prerade te uvjetima i duljini skladišta.
Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda iz Narodnih novina, standardne metode su: (3)

- priprema uzorka za analizu,
- određivanje reducirajućih ugljikohidrata,
- određivanje saharoze,
- određivanje vode u medu,
- određivanje tvari netopivih u vodi,
- određivanje pepela,
- određivanje kiselosti,
- određivanje aktivnosti dijastaze,
- određivanje hidroksimetilfurfurala,
- peludna analiza.

1.7. Metode izolacije hlapljivih spojeva

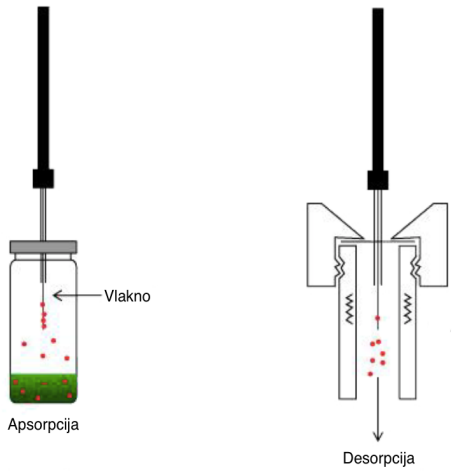
Izoliranje hlapljivih spojeva iz meda kao vrlo kompleksne namirnice može biti komplicirano. Razlog tome je što različite metode izolacije pokazuju različite stupnjeve selektivnosti i učinkovitosti. (23)

Nadalje, želi li se dobiti ispravni profil hlapljivih spojeva nekog meda, takozvani "fingerprint", moraju se odabrati metode izolacije koje će biti prikladne određenom medu. (25)

- **Mikroekstrakcija na krutoj fazi**

Mikroekstrakcija na krutoj fazi (engl. Solid-phase microextraction, SPME) jednostavna je i djelotvorna tehnika pri kojoj se ne koristi otapalo. Vrlo je jednostavna kako su svi uobičajeni koraci tekuće-tekuće ekstrakcije (ekstrakcija, koncentriranje i prijenos do plinskog kromatografa) kod SPME tehnike integrirane u jedan korak. (24)

Proces prikazan na slici 4 obuhvaća dva osnovna koraka: prvi, koji započinje s apsorpcijom analita iz uzorka na vlakno, dok se u drugom koraku odvija desorpcija analita koncentriranih na vlaknu do analitičkog instrumenta. Glavne prednosti ove tehnike su kratko vrijeme pripreme te mali volumen potrebnog uzorka**.** (27,28) SPME se rutinski koristi u kombinaciji s plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS) koja se uspješno primjenjuje za ekstrakciju širokog raspona spojeva, posebno za ekstrakciju hlapljivih i organskih spojeva u složenim namirnicama. (24)

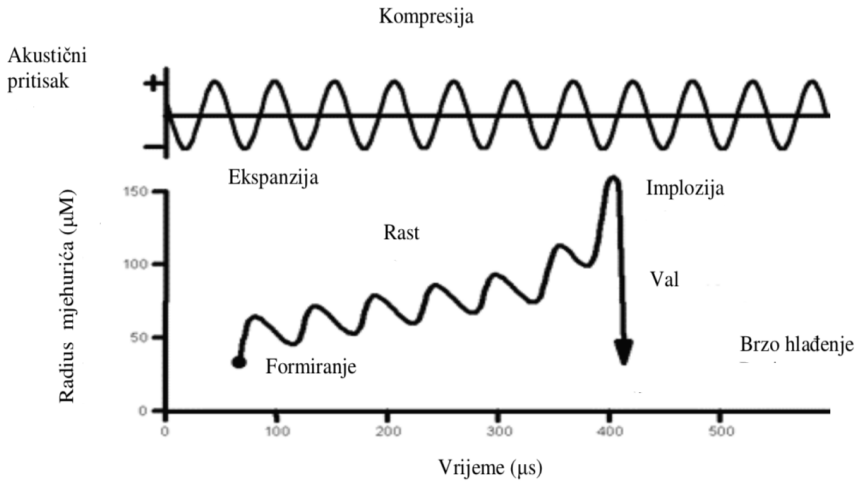


Slika 4. Apsorpcija i desorpcija analita (29)

- **Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvučna ekstrakcija otapalom je jedna od metoda izdvajanja komponenti na osnovi njihove različite topljivosti u različitim otapalima. Koliko vremena treba da se sve željene komponente izdvoje, ovisiti će o viskoznosti otapala, volumnom protoku otapala, topljivosti komponente u toj otopini, temperaturi ekstrakcije te o površini namirnice izloženoj otapalu.

Kavitacija je fenomen pri kojem prilikom prolaska ultrazvučnog vala kroz neki tekući medij nastaju longitudinalni valovi zbog kojih dolazi do kontinuiranih izmjena kontrakcije i ekspanzije.



Slika 5. Kavitacija (26)

U fazi ekspanzije, mjehurići uvijek malo više narastu nego se smanje pri kompresiji kao rezultat oscilacija tlaka. (30)

Kao posljedica povećanja mjehurića, u jednom trenutku mjehurić dostigne kritičnu veličinu te više ne može apsorbirati energiju. Bez ulazne energije, šupljina se više ne može održavati te se mjehurić zbog toga urušava sam u sebe. Ovakve kontinuirane promjene tlaka dovode do velikog broja udubljenja koji nastaju zbog povećane difuzije plina u mjehuriću tijekom ekspanzije istog. Do kondenzacije dolazi kada energija ultrazvuka više nije dovoljna da se zadrži plinska faza u mjehuriću. Kondenzirane molekule se zatim sudaraju velikom brzinom pri čemu nastaju udarni valovi. (31)

Korištenjem ultrazvuka pospješuje se ekstrakcija te se time smanjuje vrijeme ekstrakcije u odnosu na tradicionalne metode. Također, kavitacija uzrokovana

ultrazvukom omogućuju prodiranje otapala u uzorak iz kojeg se izdvajaju željene komponente. (26)

Uz navedene dvije metode postoje još mnoge metode izolacija hlapljivih spojeva. Neke od najpoznatijih metoda, uz dvije navedene, su:

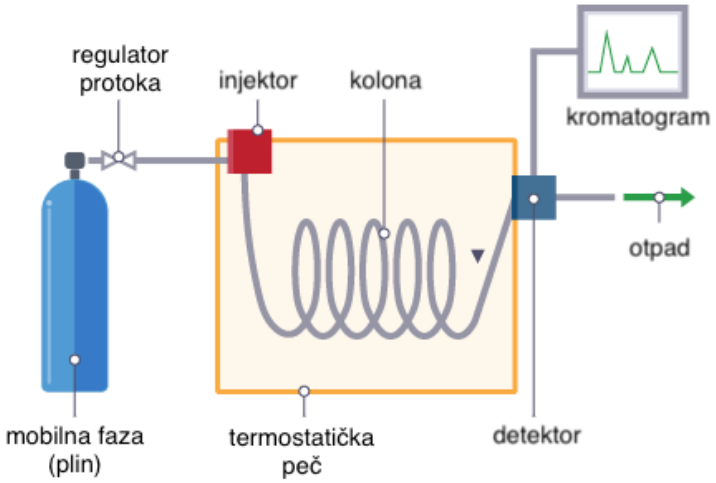
- ekstrakcija vršnih para,
- hidrodestilacija,
- simultana destilacija-ekstrakcija u aparaturi po Likens-Nickersonu,
- analiza hlapljivih spojeva elektronskim nosom. (32)

1.8. Analiza hlapljivih spojeva

Analiza hlapljivih spojeva koji se izoliraju, pretežno se provodi vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa. (GC-MS) (33)

- **Plinska kromatografija**

Kromatografija je metoda razdvajanja smjese na osnovu različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze, dakle plinska kromatografija je separacija hlapljivih komponenti iz smjese na temelju hlapljivosti i interakcije sa stacionarnom fazom. (34) Sastoji se od injekcijskog bloka, kromatografske kolone, detektora i pisača.



Slika 6. Plinska kromatografija (36)

Uzorci koji se analiziraju pomoću plinske kromatografije moraju biti hlapljivi te stabilni na temperaturi zagrijavanja. Stacionarna je faza najčešće tekućina vezana za stjenke kapilare ili nanesena na kruti adsorbens. Mobilna faza je inertni plin koji ne stupa u reakciju sa sastojcima smjese.

Analizirani uzorak u injektoru brzo i potpuno ishlapi nakon čega se isti inertnim plinom prenese do injekcijskog bloka preko kolone se vrši odjeljivanje hlapljivih spojeva do detektora. (31)

- **Spektrometrija masa**

Spektrometrija masa temelji se na ionizaciji hlapljivih spojeva. Nakon što su ionizirani, ioni se razdvajaju i potom im se mjeri masa kako bi se odredilo koji su.
U komoru za bombardiranje unosi se mala količina uzorka u plinovitom stanju. Da bi se osigurao ionima put od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama, to jest neutralizacija, unutrašnjost spektrometra je pod vakuumom.
Uzorak se bombardira elektronima visoke energije pri čemu se molekule ioniziraju. Ioniziranjem nastaje pozitivni M^+ ion koji se fragmentira:

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

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

Raznim fragmentima je moguće analizom utvrditi kemijsku strukturu kao i molekulsku masu.
Na osjetljivom dijelu analizatora, ioni se očitavaju kao električni signal koji se elektronskim sustavom bilježi u memoriji računalom. Ovako se dobiva spektar mase koji se prikazuje kao linijski dijagram s odnosom mjera masa, relativnog intenziteta te naboja fragmenta (m/z). (35)

- **Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)**

GC-MS metoda analize omogućuje dobivanje velikog broja podataka uz korištenje male količine uzorka.

Hlapljive komponente iz smjese se odjeljuju u termostatskoj koloni plinskog kromatografa nakon čega odijeljene komponente plinom nositeljem odlaze u detektor, to jest spektrometar masa. Dobiven rezultat, spektar masa, uspoređuje se s bazom spektara masa i određuje se postotak slaganja na temelju čega se identificira spoj.

Uz spektar masa, za identifikaciju spoja također služi podatak vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na koloni, to jest retencijsko vrijeme (Rt).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Opće karakteristike meda od ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ovaj "princ aromatičnih biljaka", kako su ga u starom vijeku zvali, imao je veliki značaj još od najstarijih vremena kada su ga koristili su kao lijek, vjerski simbol, ukras te kao hranu.

Ružmarin, *Rosmarinus officinalis* L., višegodišnja je zimzelena aromatična biljka s malim igličastim listovima intenzivnog mirisa. (37) Sam naziv ružmarin, koji potječe od latinskog *ros* (rosa) i *marinus* (more), odaje povoljnu lokaciju njegovog rasta, uz more s kojeg će vjetar donositi vlagu. Dakle rasprostranjen je po sunčanim i kamenitim krajevima hrvatskog priobalja te na čitavom priobalnom području Mediterana.

Danas se koristi u ishrani kako daje ugodnu aromu povrću i masnim jelima. Također, kako potiče cirkulaciju krvi, koristi se za olakšavanje bolova poboljšavajući dotok krvi. (38)

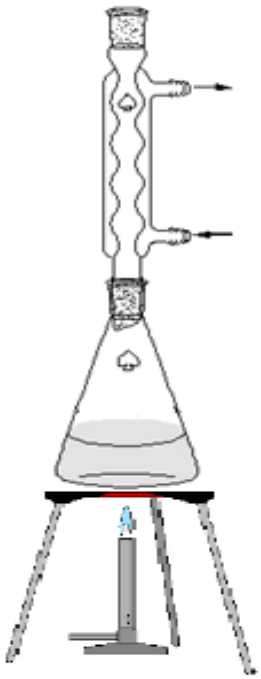
Med od ružmarina mora sadržavati minimalno 20 % peludnih zrnaca biljke *Rosmarinus officinalis*. Svijetao je, bistar i proziran, blagog i ugodnog okusa te blagog mirisa. Nakon vrcanja, med od ružmarin se pretvara u sitne fine kristaliće, a kristalizacijom postaje potpuno bijel. Ima vrlo pozitivno djelovanje na ljudski organizam svojim antiseptičkim djelovanjem, uklanjanjem stresa, poboljšavanjem funkcije jetre, povoljnim djelovanjem po bolesti krvnih žila te srčanih bolesti. (32)



Slika 7. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis*) i med od ružmarina (38)

2.2. Priprema uzorka

U ovom radu korišten je jedan med od ružmarina s otoka Visa iz 2015. godine. Monoflornost uzorka meda od ružmarina dokazana je peludnom analizom na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za analizu hlapljivih spojeva med je izoliran ultrazvučnom ekstrakcijom prije zagrijavanja i nakon zagrijavanja. Med je zagrijavan pod refluksom uz dodatak vode (slika 8). U tikvicu se dodao med te se zagrijavao na 60°C tijekom 2 sata. Nakon što je med ohlađen na sobnu temperaturu, hlapljivi spojevi su se izdvojili pomoću USE.



Slika 8. Zagrijavanje meda

2.3. Kemikalije

Naziv:	Proizvođač:
diklormetan	Kemika, Zagreb
pentan	Kemika, Zagreb
dietil-eter	Kemika, Zagreb
$MgSO_4$ (magnezijev sulfat)	Fluka Chemie, p.a, Švicarska

2.4. Aparature

- aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju organskim otapalom:
  - ultrazvučna kupelj: Transsonic Typ 310/H, Njemačka
- centrifuga:
  - Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- 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

2.5. Izolacija hlapljivih spojeva ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom

Izolacija hlapljivih spojeva provela se u ultrazvučnoj kupelji metodom indirektne sonifikacije pri frekvenciji 35 kHz i temperaturi 25±3°C. Dva uzorka od 40 g meda se odvagažu u dvije tikvice od 100 mL i razrijede s 22 mL destilirane vode. Zatim se doda 1,5 g bezvodnog $MgSO_4$ uz intenzivno miješanje. Ova ultrazvučna ekstrakcija se provela s organskim otapalima pentan : dietil eterom= 1:2 (v/v) i diklormetanom koji su izolirali hlapljive i poluhlapljive spojeve meda koji su se kasnije analizirali.

Uzorak meda (40 g) i 22 mL destilirane vode stavljen je u tikvicu s ravnim dnom od 100 mL. Zatim se odvaže 1,5 g $MgSO_4$ i postepeno dodaje u otopinu uz intenzivno miješanje. Svaki uzorak ekstrahiran je tri puta na sljedeći način. Pripremljenoj homogenoj smjesi meda doda s 20 mL otapala za ekstrakciju. Erlenmayer-ova tikvica s medom uroni se u ultrazvučnu kupelj i spoji s povratnim hladilom. Sonifikacija se provodi tijekom 30 minuta. Ukoliko je odjeljivanje slojeva otežano, koristi se centrifuga (4000 okretaja/min), a zatim se organski sloj odijeli kapalicom i suši filtriranjem preko lijevka s bezvodnim $MgSO_4$. Postupak ekstrakcije i odjeljivanja slojeva ponovi se još dva puta na prethodno opisan način. Združeni organski ekstrakti se koncentriraju frakcijskom destilacijom (uz Vigreaux-ovu kolonu) do 1 mL, te se čuvaju u zatvorenim posudama na -20°C do analize spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Prije

analiziranju uzorci se koncentriraju opreznim uparavanjem do volumena 0,2 mL, a 1 μL su korištena za GC-MS analizu.



Slika 9. Ultrazvučna ekstrakcija (USE)

2.6. Analiza hlapljivih spojeva sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Analiza izoliranih hlapljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf (slika 10). Analize su izvršene na HP-5MS ((5 % fenil)-metilpolisiloksan) koloni.



Slika 10. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Karakteristike kolone HP-5MS:

- Stacionarna faza: (5 % fenil)-metilpolisiloksan
- Duljina: 30 m
- Promjer: 0,25 mm
- Debljina sloja stacionarne faze: 0,20 μm
- Mobilna faza i plin nositelj: helij

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

- temperatura izvođenja plinske kromatografije je programirana 2 minute na 70 °C, a zatim je rasla 3ºC po minuti dok nije postignuta temperatura 200 °C
- "solvent delay" bio je 3 minute (vrijeme u kojem se ne snima spektar jer u tom vremenu otapalo izlazi)
- temperatura injektora je bila 250 °C
- količina injektiranog uzorka je bila 1 μL
- protok plina nositelja (helij) je bio 1 mL/min

Uvjeti rada spektrometra masa:

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

Uzorak je dodan odjednom tako da trenutno ispari. Spektrometar masa korišten je kao detektor. Reproducibilnost je osigurana kada su uspostavljeni stacionarni uvjeti, stabilizirani protoci i temperatura.

Sljedeći rezultati su dobiveni za svaki uzorak analiziran sustavom GC-MS:

- kromatogram ukupne ionske struje
- udio pojedine komponente izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini kromatograma)
- vrijeme zadržavanja pojedinih komponenti (pik na kromatogramu)
- naziv spojeva čiji spektri najsličniji spektru nepoznate izolirane komponente (sličnosti izražene u postotcima)

Identifikacija dobivenih pojedinačnih spojeva 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 nekog spoja 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. (39)

$$t'R = tR - tM \quad (1)$$

Gdje je:

tM = vrijeme potrebno nezadržanoj komponenti za prolazak kroz kolonu

Indeks zadržavanja nekog sastojka X računa se prema formuli:

$$RI(X) = 100 \times \log t'R(X) - \log t'R(N) \,/\, \log t'R(N+1) - \log t'R(N) + 100 \times N \quad (2)$$

Gdje je:

X = nepoznati sastojak

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

(N+1) C = alkan.

3. REZULTATI

Rezultati dobiveni analizom ekstrakata hlapljivih spojeva, provedena vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa, prikazani su tablično i u obliku kromatograma.

Tablica 2. Hlapljivi spojevi meda od ružmarina, nakon ekstrakcije s diklormetanom prije zagrijavanja.

Red. br.	**RI**	**Naziv spoja**	**Udio (%)**
1.	914	1-(2-furanil)-etanon (2-acetilfuran)	0,7
2.	1048	fenilacetaldehid	0,3
3.	1080	2-furankarboksilna kiselina	1,4
4.	1087	1-(furan-2-il)-2-hidroksietanon	4,8
5.	1116	2-feniletanol	1,1
6.	1147	4-ketoizoforon	0,6
7.	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	59,2
8.	1269	2-feniloctena kiselina	0,7
9.	1397	etil-dekanoat	1,1
10.	1514	4-metil-2,6-bis(1,1-dimetiletil)fenol	0,7
11.	1593	etil-dodekanoat	0,4
12.	1600	heksadekan	0,6
13.	1774	metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil-siringat)	1,5
14.	1793	oktadec-1-en	3,0
15.	1882	heksadekan-1-ol	4,5
16.	1963	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	1,9
17.	1992	etil-heksadekanost (etil-palmitat)	1,3
18.	2059	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	0,7
19.	2100	heneikosan	0,8
20.	2147	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	0,9
21.	2300	trikosan	1,4
Ukupno identificirano			***87,6***

Tablica 3. Hlapljivi spojevi meda od ružmarina, nakon ekstrakcije s diklormetanom poslije zagrijavanja

Red. br.	**RI**	**Naziv spoja**	**Udio (%)**
1.	<900	2-furankarboksialdehid (furfural)	0,8
2.	914	1-(2-furanil)-etanon (2-acetilfuran)	3,0
3.	965	benzaldehid	0,3
4.	1037	benzil-alkohol	0,4
5.	1048	fenilacetaldehid	0,6
6.	1084	metil-2-furoat*	7,6
7.	1106	hotrienol	6,4
8.	1116	2-feniletanol	1,8
9.	1147	4-ketoizoforon	0,5
10.	1162	benzojeva kiselina	0,1
11.	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	60,1
12.	1269	2-feniloctena kiselina	1,5
13.	1299	1-metoksi-4-propilbenzen (4-propilanisol)	1,5
14.	1317	3,4,5-trimetilfenol	0,5
15.	1451	4-metoksibenzojeva kiselina	0,5
16.	1479	dodekan-1-ol	0,3
17.	1600	heksadekan	0,7
18.	1700	heptadekan	0,5
19.	1774	metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil-siringat)	0,3
20.	1780	pentadekan-1-ol	1,8
21.	1800	oktadekan	1,7
22.	1882	heksadekan-1-ol	3,4
23.	1938	metil-heksadekanoat	0,5
24.	1963	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	1,4
25.	2100	heneikosan	0,8
Ukupno identificirano			***97,0***

RI-retencijski indeks na HP-5MS koloni;
*-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektara masa);

Tablica 4. Hlapljivi spojevi meda u uzorku, nakon ekstrakcije s pentan : dietil-eter 1:2 (v/v) prije zagrijavanja

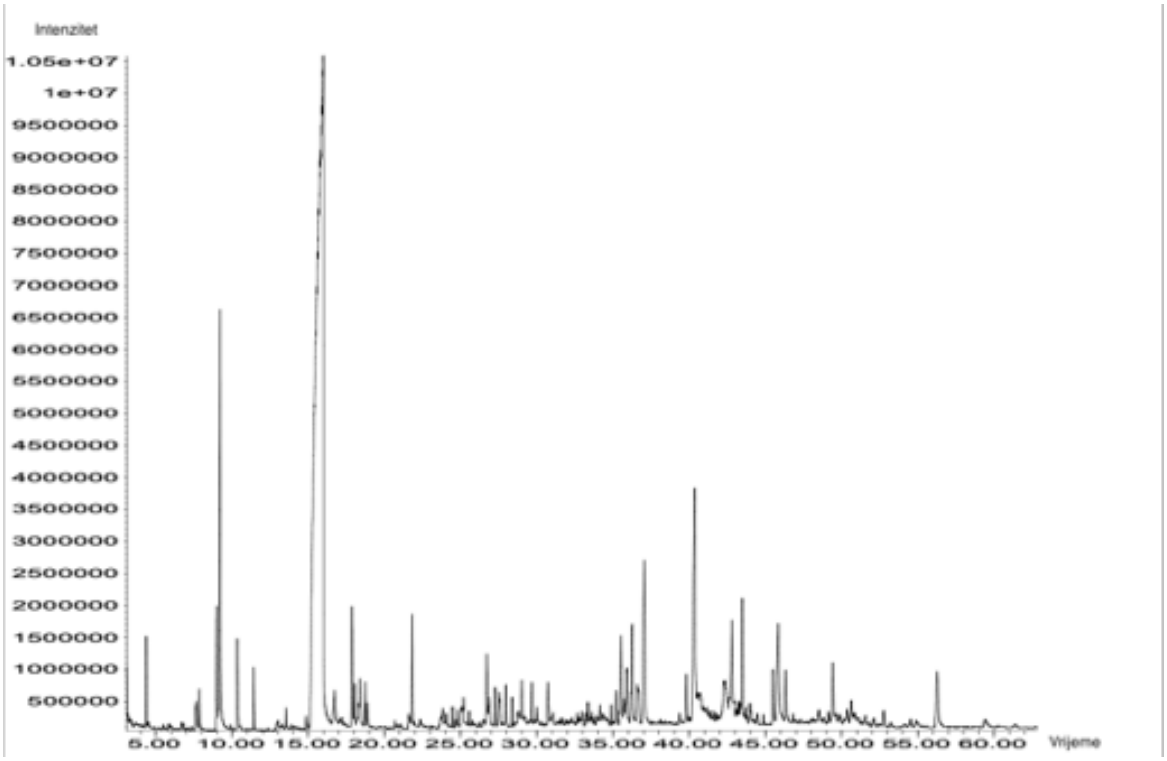
Red. br.	**RI**	**Naziv spoja**	**Udio (%)**
1.	<900	benzil-alkohol	2,4
2.	<900	2-furankarboksialdehid (furfural)	5,1
3.	1080	2-furankarboksilna kiselina	7,1
4.	1116	2-feniletanol	2,9
5.	1119	2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on*	2,1
6.	1162	benzojeva kiselina	1,7
7.	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	14,1
8.	1283	feniloctena kiselina	2,8
9.	1299	1-metoksi-4-propilbenzen (4-propilanisol)	3,0
10.	1317	3,4,5-trimetilfenol	2,0
11.	1451	4-metoksibenzojeva kiselina	3,0
12.	1478	dodekan-1-ol	2,4
13.	1542	4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*-salicilna kiselina)	1,3
14.	1700	heptadekan	1,5
15.	1766	tetradekanska kiselina	1,5
16.	1774	metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil-siringat)	7,2
17.	1802	6-hidroksi-3-okso-α-ionol (vomifoliol)	4,5
18.	1882	heksadekan-1-ol	7,1
19.	1960	dibutil-ftalat	1,5
20.	1963	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	8,1
21.	2059	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2,1
22.	2084	oktadekan-1-ol	12,2
Ukupno identificirano			***95,6***

RI-retencijski indeks na HP-5MS koloni;
*-spoj uvjetno identificiran (samo analizom spektara masa);

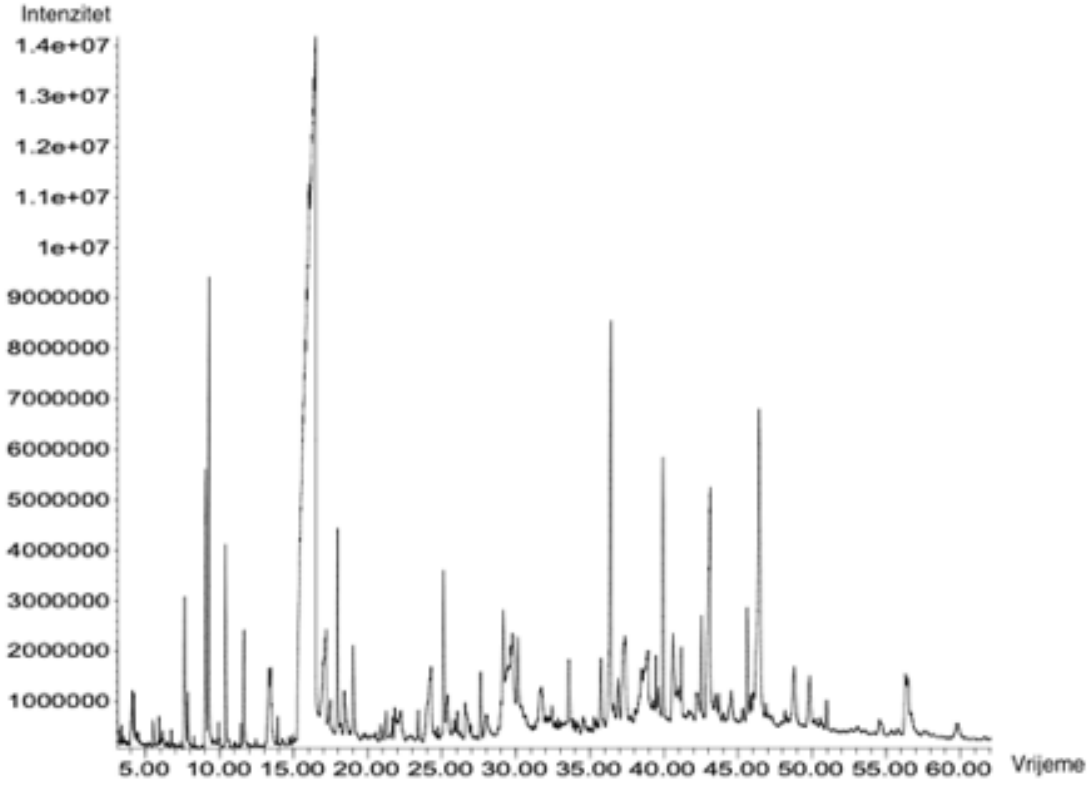
Tablica 5. Hlapljivi spojevi meda u uzorku, nakon ekstrakcije s pentan : dietil-eter 1:2 (v/v) poslije zagrijavanja.

Red. br.	**RI**	**Naziv spoja**	**Udio (%)**
1.	<900	1,3-dimetilbenzen	0,4
2.	1048	fenilacetaldehid	0,3
3.	1080	2-furankarboksilna kiselina	0,4
4.	1087	1-(furan-2-il)-2-hidroksietanon	1,3
5.	1116	2-feniletanol	1,0
6.	1230	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	20,7
7.	1299	1-metoksi-4-propilbenzen (4-propilanisol)	2,2
8.	1397	etil-dekanoat	0,8
9.	1400	tetradekan	1,5
10.	1500	pentadekan	1,0
11.	1514	4-metil-2,6-bis(1,1-dimetiletil)fenol	1,5
12.	1517	4-hidroksibenzojeva kiselina	3,9
13.	1593	etil-dodekanoat	0,4
14.	1600	heksadekan	0,6
15.	1700	heptadekan	0,7
16.	1766	tetradekanska kiselina	0,4
17.	1774	metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil-siringat)	5,1
18.	1882	heksadekan-1-ol	8,1
19.	1963	heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina)	6,1
20.	1992	etil-heksadekanost (etil-palmitat)	1,4
21.	2000	eikosan	1,3
22.	2059	(*Z*)-oktadec-9-en-1-ol	2,6
23.	2100	heneikosan	12,3
24.	2147	(*Z*)-oktadec-9-enska kiselina	4,7
25.	2300	trikosan	7,7
Ukupno identificirano			***86,4***

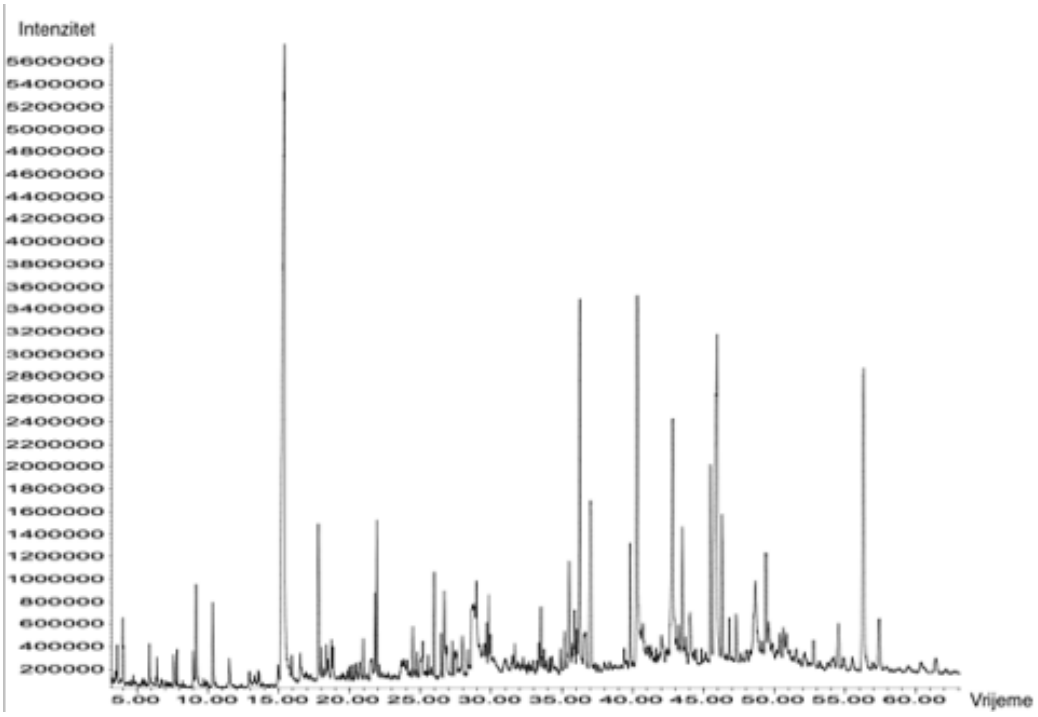
RI-retencijski indeks na HP-5MS koloni;



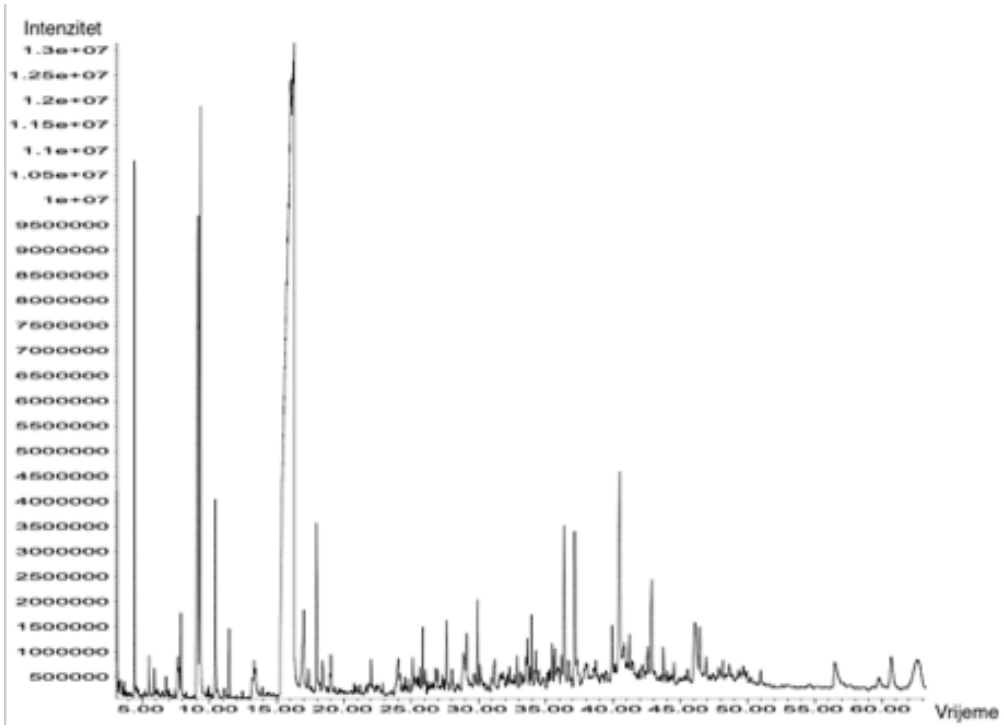
Slika 11. Kromatogram ukupne ionske struje prije zagrijavanja meda od ružmarina izoliran pomoću USE ekstrakcije s organskim otapalom diklormetanom



Slika 12. Kromatogram ukupne ionske struje nakon zagrijavanja (60 °C, 2 sata) meda od ružmarina izoliran pomoću USE ekstrakcije s organskim otapalom diklormetanom



Slika 13. Kromatogram ukupne ionske struje prije zagrijavanja meda od ružmarina izoliran pomoću USE ekstrakcije s organskim otapalom pentan : dietil eterom = 1:2 (v/v)



Slika 14. Kromatogram ukupne ionske struje nakon zagrijavanja (60 ^{o}C, 2 sata) meda od ružmarina izoliran pomoću USE ekstrakcije s organskim otapalom pentan : dietil-eterom = 1:2 (v/v)

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj zagrijavanja na kemijski sastav hlapljivih spojeva meda od ružmarina. Najprije su izolirani hlapljivi spojevi bez zagrijavanja ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) s organskim otapalima pentan : dietil-eter = 1:2 (v/v) i diklormetanom.

Da bi se istražio utjecaj zagrijavanja na kemijski sastav meda od ružmarina, med je zagrijavan pri 60 °C s dodatkom vode u vremenu od 2 sata nakon čega su se izolirali hlapljivi spojevi (vidjeti poglavlje 2.5.) i analizirali vezanim sustavom plinska kromatografija-spektometrija masa.

Kemijski sastav hlapljivih spojeva meda od ružmarina prije zagrijavanja prikazan je u tablici 2 i u tablici 4. U uzorku prije zagrijavanja, nakon ekstrakcije s organskim otapalom diklormetanom (tablica 2), identificiran je 21 spoj, a u uzorku prije zagrijavanja, nakon ekstrakcije s organskim otapalom pentan : dietil-eter = 1:2 (v/v) (tablica 4), identificirano je 25 spojeva.

U diklormetanskom ekstraktu, prije zagrijavanja, glavni spoj je bio 5-hidroksimetilfurfural (59,2 %) čiji se veliki udio može prepisati starosti meda koji je iz 2015. godine. Uz HMF, spojevi koji prevladavaju su 1-(furan-2-il)-2-hidroksietanon (4,8 %), heksadekan-1-ol (4,5 %), oktadec-1-en (3,0 %), i heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina) (1,9 %). Spojevi u ovom uzorku koji nisu pronađeni u ostalim uzorcima su oktadec-1-en (3,0 %) te 4-metil-2,6-bis(1,1-dimetiletil)fenol (0,7 %).

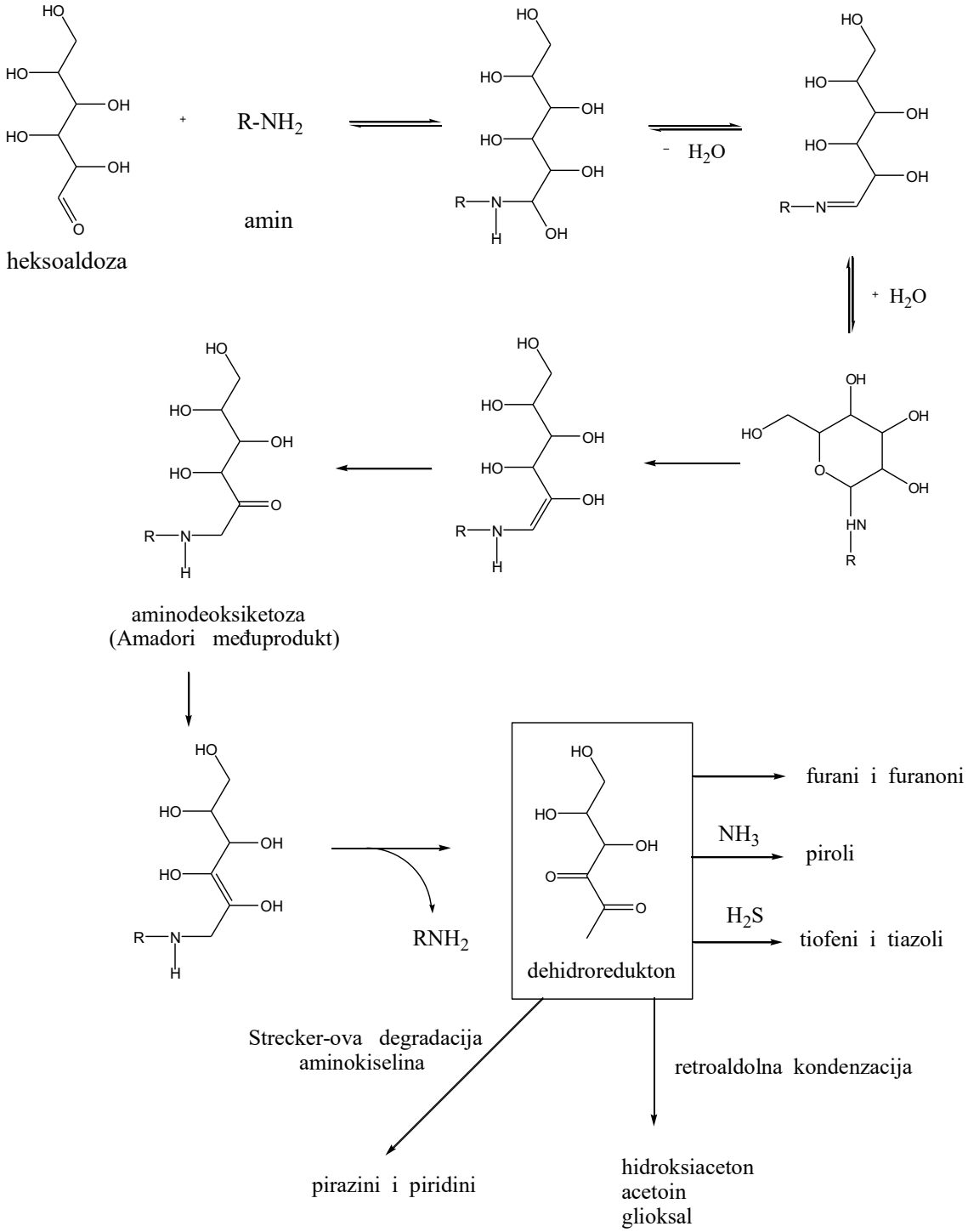
U dietilskom ekstraktu, prije zagrijavanja, glavni spojevi su 5-hidroksimetilfurfural (14,1 %), oktadekan-1-ol (12,2 %), heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina) (8,1 %), metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil-siringat) (7,2 %), heksadekan-1-ol (7,1 %), 2-furankarboksilna kiselina (7,1 %), 2-furankarboksialdehid (furfural) (5,1 %), 6-hidroksi-3-okso-α-ionol (vomifoliol) (4,5 %), 4-metoksibenzojeva kiselina (3,0 %), 1-metoksi-4-propilbenzen (4-propilanisol), 2-feniletanol (2,9 %) i feniloctena kiselina (2,8 %). Spojevi identificirani samo u ovom uzorku su oktadekan-1-ol (12,2 %),6-hidroksi-3-okso-α-ionol (vomifoliol) (4,5 %), feniloctena kiselina (2,8 %), 2,3-hidroksi-3,5-dihidroksi-6-metil-4*H*-piran-4-on (2,1 %) te 4-hidroksibenzojeva kiselina (*p*-salicilna kiselina) (1,3 %).

Kemijski sastav hlapljivih spojeva meda od ružmarina poslije zagrijavanja prikazan je u tablici 3 i u tablici 5. U uzorku poslije zagrijavanja, nakon ekstrakcije s organskim otapalom diklormetanom (tablica 3), identificirano je 25 spojeva, a u uzorku poslije zagrijavanja, nakon ekstrakcije s organskim otapalom pentan : dietil-eter = 1:2 (v/v) (tablica 5), identificirano je također 25 spojeva.

U diklormetanskom ekstraktu, nakon zagrijavanja, glavni spoj bio je 5-hidroksimetilfurfural (60,1 %) čijem je povećanju udjela doprinijelo zagrijavanje uzorka meda. Uz HMF, glavni spojevi su metil-2-furoat (7,6 %), hotrienol (6,4 %), heksadekan-1-ol (3,4 %) te 1-(2-furanil)-etanon (2-acetilfuran). Spojevi koji su identificirani samo u ovom uzorku su metil-2-furoat (7,6 %), hotrienol (6,4 %), pentadekan-1-ol (1,8 %), oktadekan (1,7 %), metil-heksadekanoat (0,5 %) te benzaldehid (0,3 %).

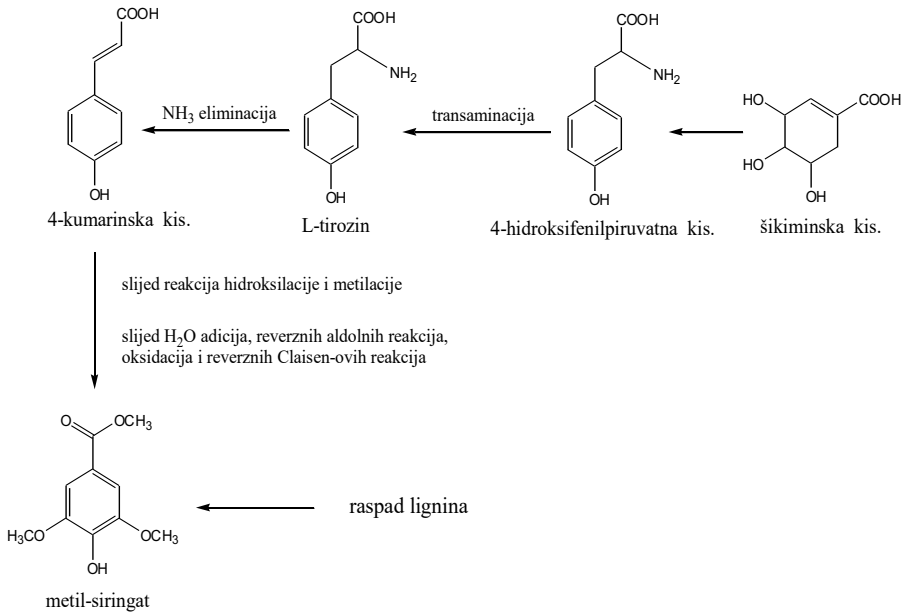
U dietil-eterskom ekstraktu, nakon zagrijavanja, glavni spojevi su 5-hidroksimetilfurfural (20,7 %), heneikosan (12,3 %), heksadekan-1-ol (8,1 %), trikosan (7,7 %), heksadekanska kiselina (palmitinska kiselina) (6,1 %), metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil siringat) (5,1 %), (*Z*)-oktadec-9-enska kiselina (4,7 %), 4-hidroksibenzojeva kiselina (3,9 %) te (*Z*)-oktadec-9-en-1-ol (2,6 %). Spojevi u dietilskom ekstraktu koji nisu identificirani u ostalim uzorcima su heneikosan (12,3 %), heksadekan-1-ol (8,1 %), 4-hidroksibenzojeva kiselina (3,9 %), 4-metil-2,6-bis(1,1-dimetiletil)fenol (1,5 %), tetradekan (1,5 %), eikosan (1,3 %), pentadekan (1,0 %), 2-furankarboksilna kiselina (0,4 %) te 1,3-dimetilbenzen (0,4 %).

Tipičan spoj koji nastaje zagrijavanjem meda, 5-hidroksimetilfurfural, nađen je i kod različitih vrsta meda koji su zagrijavani iznad 50°C i/ili dugo skladišteni gdje dolazi do stvaranja novih spojeva ili transformiranja postojećih (40). Novonastali spojevi uzrokuju promjenu boje i arome meda (41), a uglavnom su produkti Maillard-ovih reakcija (slika 15) i Strecker-ovih degradacija. Maillard-ove reakcije se temelje na kondenzaciji uglavnom reducirajućih ugljikohidrata s α-amino skupinom slobodnih aminokiselina pri čemu nastaju nestabilne aminodekstroze.



Slika 15. Opća shema Maillard-ove reakcije (42)

Metil-siringat (slika 16) je identificiran u ekstraktima meda od ružmarina, ali je prisutan i u drugim vrstama meda (43). Samo se u medu od čepljeza (*Asphodelus microcarpus*) može smatrati potencijalnim markerom zbog velikog udjela (44, 45). U usporedbi s drugim vrstama meda nijedan od spojeva u ekstraktima ružmarinog meda se ne može istaknuti kao potencijalni specifični biomarker.



Slika 16. Biosinteza metil-siringata (43)

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog završnog rada bio je istražiti utjecaj topline na med od ružmarina, što je i postignuto. Eksperimentom su utvrđene razlike u sastavima hlapljivih komponenti prije i nakon zagrijavanja.

Dobiveni kemijski profili meda od ružmarina prije zagrijavanja odgovaraju kemijskim profilima meda od ružmarina koji su dobiveni u prethodnim istraživanjima.

U sva četiri ekstrakta (diklormetanski prije zagrijavanja, dietil-eterski prije zagrijavanja, diklormetanski nakon zagrijavanja, dietil-eterski nakon zagrijavanja), identificirani su furanski i piranski derivati 5-hidroksimetilfurfural te metil-4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzoat (metil-siringat). Udjeli ovih derivata porasli su kvantitativno nakon zagrijavanja.

6. LITERATURA

1. Divković I. Kemijski sastav i svojstva meda i propolisa. Završni rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Osijek 2009.
2. https://freshpress.info/magazin/8-stvari-koje-ce-se-dogoditi-tvom-tijelu-ako-jedes-med-svaki-dan/ (pristupljeno 26. listopada 2018.)
3. Pravilnik o medu, *Narodne novine* br. 53/2015
4. https://blog.dnevnik.hr/apikultura/2013/02/1631512524/kako-pcele-proizvode-med.html
5. Da Silva PM , Gauche C, Gonzaga LV, Oliveira Costa AC, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chem. 2015;196:4-13.
6. Santos-Buelga C, Gonzalez-Paramas AM. Chemical Composition of Honey. In: Alvarez-Suarez JM, editor. Bee Products - Chemical and Biological Properties. Salamanca, Spain; 2017. str. 43-73.
7. Poljanec A. Kemijska analiza bagremovog i šumskog meda. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, Zagreb 2017; 6
8. https://zir.nsk.hr/islandora/object/pfos:348/preview (pristupljeno 20.03.2019.)
9. https://pdfs.semanticscholar.org/341d/7a055c89f6d3306cff274cf1896a0a34ba33.pdf (pristupljeno 22,03.2019.)
10. Eadsworth Ball D. The Chemical Composition of Honey. J. Chem. Educ. 2007; 84:1643-1645.
11. Bogdanov S, Jurendić T, Sieber R, Gallmann P. Honey for Nutrition and Health: A Review. J Am Coll Nutr. 2009;27:677-689.
12. Shapla UM, Solaymanm M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. Chem Cent J 2018:12;1-2.
13. Crnoja AM. Kemijska, fizikalna i antioksidativna svojstva meda. Diplomski rad. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek 2018., 13
14. Škendrov S, Ivanov C, editors. Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje. Beograd, Srbija: Nolit, Beograd; 1986.
15. Lazaridou A, Biliaderis CG, Bacandritsos N, Sabatini AG. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek Honeys.J Food Eng. 2004;64:9-21.
16. http://countryrubes.com/template/images/Honey_Crystallization.pdf (pristupljeno 28.03.2019.)

17. https://www.bjcp.org/mead/crystal.pdf (pristupljeno 28.03.2019.)
18. http://justmanhoney.com/wp-content/uploads/2015/03/Honey-Crystallization-3.20.15.pdf (pristupljeno 29.03.2019.)
19. Kezić N, Bubalo D, Grgić Z, Dražić M, Barišić D, Filipi J, Ševar M. Konvencionalno i ekološko pčelarenje. Interna skripta, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, str. 130-157.
20. Martin EC. The Hygroscopic Properties of Honey. J Econ Entomol. 1939;32:660-663.
21. http://www.zzjzpgz.hr/obavijesti/natjecaj2008/Vahcic.pdf (pristupljeno 02.04.2019.)
22. https://www.hangowin.com/honey-facts (pristupljeno 03.06.2019.)
23. Many-Loh CE, Ndip RN, Clarke AM. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. Int J Mol Sci. 2011;12:9514-9532.
24. Markusović M. Isparljivi spojevi meda (*Galactites tomentosa* Moench.). Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Split. Split. 2011; str 14-17.
25. Marijanović Z. Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Osijek. 2014
26. Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croat. J. Food Sci. Technol. 2010;2:22-33.
27. Alissanrakis E, Tarantilis PA, Harizanis PC, Polissiou M. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. J Sci Food Agric. 2005;85,91-97.
28. Risticevic S, Niri VH, Vuckovic D, Pawliszyn J. Recent developments in solid-phase microextraction. Anal. Bioanal. Chem. 2009;393:781-795.
29. http://2014.igem.org/Team:Valencia_UPV/Project/modules/methodology/sample_preparation (pristupljeno 01.05.2019.)
30. Zhang Z, Yang MJ, Pawliszyn J. Solid-Phase Microextraction. Anal. Chem. 1994;66:844-853.
31. Suslick KS. Sonochemistry. AAAS. 1990;247:1439-1445.
32. Zagorac V. Izolacija i identifikacija hlapljivih spojeva komercijalnih medova ružmarina i vriska. Diplomski rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split, 2007.

33. Vlaić I. Hlapljivi spojevi meda od facelije prije i poslije zagrijavanja. Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split, 2018.
34. AL-Bukhaiti WQ, Noman A, Qasim AS, AL-Farga A. Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. Int. J. agric. Res. Innov. Technol. 2017;6:123-128.
35. Šola M. Isparljivi spojevi meda amorfe (Amorphia fruticosa L.). Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split, 2018.
36. http://delloyd.50megs.com/moreinfo/gaschrom.html (pristupljeno 05.06.2019.)
37. Erjavec F. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis L.)* u alginatne nosače s dodatkom kakaovog praha i rogača. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, Zagreb, 2017.
38. https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/ruzmarin-276/ (pristupljeno 01.06.2019.)
39. Radić NJ, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Školska knjiga, Zagreb, 2016.
40. Escriche I, Visquert M, Juan-Borrás M, Fito P. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. Food Chem. 2009;112:329-338.
41. Martins SIFS, Jongen WMF, Van Boeckel MAJS. A review of Maillard reactions in food and implications to kinetic modelling. Trends Food SciTechnol. 2001;11:364-373.
42. O'Hare WT, Grigor J. *Flavor generation in food. In: Rowe DJ, editor. Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2009.
43. Joerg E, Sontag G. Multichannel coulometric detection coupled with liquid chromatography for determination of phenolic esters in honey. J Chromatogr Sep Tech. 1993*;*635:137-142.
44. Jerković I, Tuberoso CIG, Kasum A, Marijanović Z. Volatile Compounds of *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. Honey Obtained by HS-SPME and USE Analyzed by GC/MS. Chem Biodiver. *2011;*8:587-598.
45. Tuberoso CIG, Bifulco E, Jerković I, Caboni P, Cabras P, Floris I. Methyl syringate: A chemical marker of asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv.) monofloral honey. J Agric Food Chem. 2009;57:3895-3900.