Hlapljivi spojevi meda divlje trešnje

Grmuša, Luana

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:167:133153

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 DIVLJE TREŠNJE

ZAVRŠNI RAD

LUANA GRMUŠA

326

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA DIVLJE TREŠNJE

ZAVRŠNI RAD

LUANA GRMUŠA

326

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

VOLATILE COMPOUNDS OF WILD CHERRY HONEY

BACHELOR THESIS

LUANA GRMUŠA

326

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta.
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić
Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović**,** Edita Jelinčić, ing.

HLAPLJIVI SPOJEVI MEDA DIVLJE TREŠNJE

Luana Grmuša, 326

Sažetak:

U ovom završnom radu istražen je profil hlapljivih spojeva meda divlje trešnje, tj. određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je metoda ekstrakcije i to ultrazvučna ekstrakcija i kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće. U obje ekstrakcijske tehnike korišteno je isto otapalo, smjesa otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Analiza svih uzoraka je provedena plinskom kromatografijom–masenom spektrometrijom.

Glavni sastojci u uzorku hlapljivih spojeva meda iz Kutjeva dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom su derivati benzena, metil-siringat, benzojeva kiselina i 4-vinilfenol, diterpenski alkohol izofitol i C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on. Glavni spoj među hlapljivim spojevima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom (med iz Voćina) je diterpenski alkohol izofitol, a kvantitativno značajni sastojci su C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on (12,3 %), terpenski spoj kar-3-en-2,5-dion i derivat benzena 2-feniloctena kiselina.

Derivati benzena su glavni sastojci u uzorku hlapljivih spojeva izoliranih ekstrakcijom tekuće-tekuće meda iz Kutjeva, a najzastupljeniji su 2-feniloctena kiselina i dibenzil. U istom tipu ekstrakta dobivenom iz meda iz Voćina dominantan spoj je C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on, a slijedi diterpenski alkohol izofitol.

Ključne riječi: med divlje trešnje, hlapljivi spojevi, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija tekuće-tekuće, GC-MS

Rad sadrži:

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane:

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
Chemistry

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XIX.
Mentor: Ani Radonić, PhD, associate professor
Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD, assistant professor, Edita Jelinčić, ing.

VOLATILE COMPOUNDS OF WILD CHERRY HONEY

Luana Grmuša, 326

Abstract:

In this bachelor thesis, the chemical profile *i.e.* composition and content of two samples of wild cherry honey volatiles was investigated. Wild cherry honey volatiles were isolated by two extraction methods, ultrasound assisted solvent extraction (USE) and continuous liquid-liquid extraction. In both cases, the organic solvent was a mixture of pentane:diethyl ether 1:2 v/v. Following the isolation, all the extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The main components of wild cherry honey volatiles (sample from Kutjevo) isolated by USE are benzene derivatives methyl syringate, benzoic acid and 4-vinylphenol, diterpene alcohol isophytol and C_{13}-norisoprenoid 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)cyclohex-2-en-1-one. In the ultrasound solvent extract of wild cherry honey from Voćin diterpene alcohol isophytol is the main compound, followed by 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)cyclohex-2-en-1-one, terpene compound car-3-en-2,5-dione and benzene derivative 2-phenylacetic acid.

Benzene derivatives are the dominant compounds among volatiles obtained by liquid-liquid extraction of honey from Kutjevo, with 2-phenylacetic acid and dibenzyl as the main components. The same type of extract made from Voćin honey is characterized by high content of C_{13}-norisoprenoid 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)cyclohex-2-en-1-one followed by diterpene alcohol isophytol.

Key words: wild cherry honey, volatile compounds**,** ultrasound assisted solvent extraction, liquid-liquid extraction, GC-MS

Thesis contains:

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date:

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 organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od lipnja do rujna 2019. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na pristupačnosti, susretljivosti, svim savjetima, uputama i stručnoj pomoći koji su mi olakšali izradu završnog rada.

Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću i ing. Editi Jelinčić na pomoći i strpljenju pri izvedbi eksperimentalnog dijela završnog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na potpori koju su mi pružali tijekom svog mog školovanja i uvijek bili spremni pomoći, dati mi savjet i motivirati me.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Izolirati hlapljive spojeve meda divlje trešnje dvjema metodama, ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom i kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće koristeći isto otapalo, smjesu pentan:dietil-eter 1:2 v/v te odrediti profil hlapljivih spojeva analizom plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa.

SAŽETAK

U ovom završnom radu istražen je profil hlapljivih spojeva meda divlje trešnje, tj. određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je metoda ekstrakcije i to ultrazvučna ekstrakcija i kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće. U obje ekstrakcijske tehnike korišteno je isto otapalo, smjesa otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Analiza svih uzoraka je provedena plinskom kromatografijom–masenom spektrometrijom.

Glavni sastojci u uzorku hlapljivih spojeva meda iz Kutjeva dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom su derivati benzena, metil-siringat, benzojeva kiselina i 4-vinilfenol, diterpenski alkohol izofitol i C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on. Glavni spoj među hlapljivim spojevima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom (med iz Voćina) je diterpenski alkohol izofitol, a kvantitativno značajni sastojci su C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on (12,3 %), terpenski spoj kar-3-en-2,5-dion i derivat benzena 2-feniloctena kiselina.

Derivati benzena su glavni sastojci u uzorku hlapljivih spojeva izoliranih ekstrakcijom tekuće-tekuće meda iz Kutjeva, a najzastupljeniji su 2-feniloctena kiselina i dibenzil. U istom tipu ekstrakta dobivenom iz meda iz Voćina dominantan spoj je C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on, a slijedi diterpenski alkohol izofitol.

Ključne riječi: med divlje trešnje, hlapljivi spojevi, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija tekuće-tekuće, GC-MS

SUMMARY

In this bachelor thesis, the chemical profile *i.e.* composition and content of two samples of wild cherry honey volatiles was investigated. Wild cherry honey volatiles were isolated by two extraction methods, ultrasound assisted solvent extraction (USE) and continuous liquid-liquid extraction. In both cases, the organic solvent was a mixture of pentane:diethyl ether 1:2 v/v. Following the isolation, all the extracts were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The main components of wild cherry honey volatiles (sample from Kutjevo) isolated by USE are benzene derivatives methyl syringate, benzoic acid and 4-vinylphenol, diterpene alcohol isophytol and C_{13}-norisoprenoid 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)cyclohex-2-en-1-one. In the ultrasound solvent extract of wild cherry honey from Voćin diterpene alcohol isophytol is the main compound, followed by 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)cyclohex-2-en-1-one, terpene compound car-3-en-2,5-dione and benzene derivative 2-phenylacetic acid.

Benzene derivatives are the dominant compounds among volatiles obtained by liquid-liquid extraction of honey from Kutjevo, with 2-phenylacetic acid and dibenzyl as the main components. The same type of extract made from Voćin honey is characterized by high content of C_{13}-norisoprenoid 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)cyclohex-2-en-1-one followed by diterpene alcohol isophytol.

Keywords: wild cherry honey, volatile compounds**,** ultrasound assisted solvent extraction, liquid-liquid extraction, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD ... 1

1. OPĆI DIO ... 2

1.1. MED ... 2

1.1.1. Vrste meda ... 3

1.1.2. Kemijski sastav meda ... 5

1.1.3. Fizikalna svojstva meda ... 7

1.1.4. Senzorska svojstva meda ... 9

1.1.5. Biološka svojstva meda ... 10

1.2. HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU ... 12

1.2.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva ... 13

1.2.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE) ... 14

1.2.1.2. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće ... 16

1.2.2. Analiza hlapljivih spojeva ... 17

1.2.2.1. Plinska kromatografija ... 17

2. EKSPERIMENTALNI DIO ... 20

2.1. DIVLJA TREŠNJA ... 20

2.2. KEMIKALIJE I APARATURA ... 21

2.3. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA ... 21

2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE) ... 22

2.3.2. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće ... 23

2.4. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA ... 24

3. REZULTATI ... 27

4. RASPRAVA ... 31

4.1. HLAPLJIVI SPOJEVI IZOLIRANI ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM ... 31

4.2. HLAPLJIVI SPOJEVI IZOLIRANI EKSTRAKCIJOM TEKUĆE-TEKUĆE ... 33

5. ZAKLJUČAK ... 35

6. LITERATURA ... 36

UVOD

Med je vrlo cijenjena hranjiva namirnica koja se koristi od davnina, a prvi slikovni zapisi o korištenju meda zabilježeni su još 7000 godina prije Krista. Med se spominje u drevnim tekstovima, u indijskoj Vedi, židovskoj Tori, Kuranu i kineskom Shi Jingu. Stari Grci su smatrali da med nije samo hrana, već i lijek. Grčki liječnik Hipokrat je pisao o ljekovitim svojstvima meda i njegovoj koristi, između ostalog smatrao je da povoljno djeluje na ten i kožu.

Med je najpoznatiji i najrasprostranjeniji pčelinji proizvod kojeg proizvode pčele medarice. Cvjetovi biljaka svojim žlijezdama nektarijama luče nektar koji pčele privlači na oprašivanje. Pčele taj nektar sakupljaju, u tijelu prerade i odlažu u stanice saća. Prema prirodnom izvoru iz kojeg pčele medarice proizvode med proizlazi glavna podjela meda na cvjetni ili nektarni med te med medljikovac ili, kraće, medljikovac.

Med je čudesan po tome što se nikad ne pokvari. Naime, zbog niskog udjela vode i relativno visoke kiselosti (pH 3,2-4,5) nepovoljan je za razvoj bakterija i drugih mikroorganizama. Med povećava otpornost organizma na infekcije i pomaže u borbi protiv bolesti, izvrsno je sredstvo za smirenje, povećanje energije, poticanje umne aktivnosti i poboljšanje duševnog zdravlja.

Med je, kemijski gledano, smjesa velikog broja spojeva, među kojima se nalaze i hlapljivi organski spojevi. Iako je udio hlapljivih spojeva u medu vrlo mali, oni su odgovorni za jedno od senzorskih svojstava meda - miris meda. Hlapljivi spojevi meda potječu prvenstveno iz biljke odnosno nektara. Jedan dio hlapljivih spojeva u medu dodaju pčele koje prerađuju biljne sastojke, a dio nastaje tijekom procesuiranja (npr. zagrijavanjem meda) i skladištenja meda. Određivanje profila hlapljivih spojeva meda može pomoći u određivanju njegovog botaničkog podrijetla i procjeni autentičnosti meda te u određivanju kvalitete meda.[1,2]

1. OPĆI DIO
1.1. MED

Prema Pravilniku o medu („Narodne novine“ broj 53/15 i 47/17) definicija meda je: ˝Med (slika 1) jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.[3]



Slika 1. Med

Med započinje svoj „život“ kao nektar koje pčele skupljaju sa cvijeća. Biljke proizvode nektar kako bi privukle insekte i ptice koji ih oprašuju. Nektar je slatka tekućina koja sadrži eterična ulja koje cvijeću daje miris. Pčele skupljaju nektar i spremaju ga u svoj medni želudac te ga prenose do košnice. Pčele radilice postupno pretvaraju nektar u med tako da pomoću enzima iz svoga tijela invertiraju veću količinu saharoze u glukozu i fruktozu, glavne sastojke meda. S obzirom da nektar sadrži oko 70% vode, a med samo 15 - 20% vode, suvišak vode iz nektara uklanjaju prenoseći nektar iz stanice u stanicu te prozračivanjem košnice. Zreli med u saću poklapaju tj. presvlače voštanim poklopcima, i tako ga čuvaju od upijanja vlage i kvarenja.

Gotov med je gust, slatkog okusa i ljepljiv. Od šećera najzastupljeniji su monosaharidi fruktoza i glukoza. Osim ugljikohidrata i vode, u medu se nalaze aminokiseline i proteini (uključujući enzime), minerali, organske kiseline kao što su

mravlja, limunska i octena, razni pigmenti, derivati klorofila, nešto voskova, vitamini, fenolni spojevi, inulin.

Aroma i boja meda ovise o cvjetovima iz kojeg su pčele skupljale nektar, odnosno o botaničkom porijeklu meda. Tako je med divlje trešnje svijetlo smeđe do crvenkaste boje i ima blagi miris trešnje.

Med ima antimikrobna svojstva. Jedan od enzima koji prelazi u med tijekom pretvorbe nektara u med je glukoza oksidaza. Kada pčele razrjeđuju med da bi nahranile svoje mlade, enzim glukoza oksidaza razgrađuje glukozu u vodikov peroksid koji je važan antimikrobni sastojak meda i sprječava njegovo kvarenje. Nadalje, med je blago kiseo, pH mu je između 3,5 i 4, što je također razlog odsustva bakterija u medu. Također je i higroskopan, što znači da veže vlagu iz okoline, a ima i visok osmotski tlak. Bakterije koje dođu u kontakt sa medom podliježu plazmolizi, gube vodu i ugibaju.

Da bi se ljekovita svojstva meda što bolje iskoristila preporuča se prilikom konzumacije med otopiti u tekućini (npr. čaju) ili u ustima. Ipak, potrebno ga je umjereno konzumirati zato što se njegovom prekomjernom uporabom podiže razina šećera u krvi čime se potiče gušterača na proizvodnju inzulina, a tijelo na skladištenje masti što dovodi do debljanja. Time se osoba izlaže opasnosti od razvoja srčanih bolesti ili bolesti jetre. [4-6]

1.1.1. Vrste meda

Med se dijeli na dva načina, prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje.[3]

Prema podrijetlu dijeli se na:

- Cvjetni ili nektarni med, odnosno med dobiven od nektara biljaka
- Medljikovac ili medun, odnosno med dobiven od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka.

Prema načinu proizvodnje med se dijeli na:

- Med u saću
- Med sa saćem ili med sa dijelovima saća
- Cijeđeni med
- Vrcani med
- Prešani med
- Filtrirani med

Također je kvantitativnim istraživanjima utvrđeno da se med može svrstati u pet kategorija prema omjeru biljnih čestica:

- **1. kategorija**: Peludom siromašan med. Pod ovu kategoriju spada lavandin, narančin i lipov med.
- **2. kategorija**: Med koji sadrži srednju količinu biljnih čestica. U tu kategoriju spada većina vrsta vrcanog meda raznih cvjetnih pčelinjih paša, ali i većina meda od medljike. Med ove kategorije sadrži 20 000 – 100 000 biljnih čestica na 10 grama meda.
- **3. kategorija**: Vrste meda ekstremno bogate biljnim česticama gdje na 10 grama meda ima 100 000 - 500 000 biljnih čestica.
- **4. kategorija**: Vrste sa 500 000 – 1 000 000 biljnih čestica na 10 grama meda. Primjer je kestenov med, neke vrste šumskog meda i sl. U ovoj kategoriji je količina peludnih zrnaca određene vrste 90% ili više.
- **5. kategorija**: Ekstremno bogati medovi koji se dobivaju postupkom prešanja.[3,7]

Nektarni med

Nektarni med potječe od medonosnih biljaka (kadulja, lipa, bagrem, itd.) te se dijeli na monoflorni i poliflorni.[8]

Nektarni med se dobiva sakupljanjem sokova nektarija biljaka. Pčele se, kada skupljaju nektar, u pravilu drže jedne vrste biljke. Tamo gdje određene medonosne biljke koja dobro medi ima u izobilju, pčele će sakupljati nektar prvenstveno s te biljne vrste i tako se dobije monoflorni med. No, da bi dobio taj naziv, med treba proći ispitivanje broja peludnih zrnaca i taj broj treba biti viši od 45%. Kada pčele

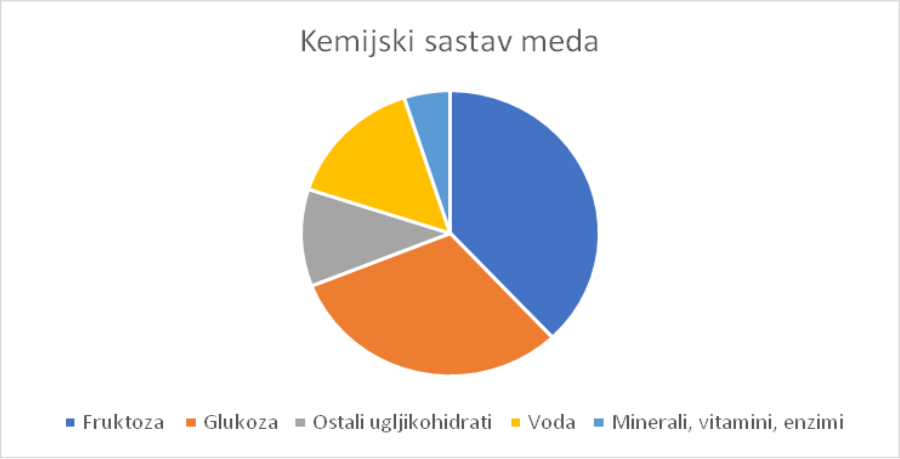
skupljaju nektar s različitih vrsta biljaka, tada govorimo o poliflornom cvjetnom medu.[9]

Med medljikovac

Med medljikovac nastaje od medljike, slatke tekućine koju proizvode kukci za vrijeme hranjenja sokom biljke na kojoj se nalaze. Tu tekućinu pčele sakupljaju i pohranjuju u saće. Postoji više vrsta medljikovca, ovisno o biljci s koje potječe medljika (hrastov, bukov, itd.). Taj med je lošije kvalitete, brzo kristalizira, ali je bogatiji mineralnim tvarima. Medljikovac sadrži mnoštvo antioksidansa, aminokiselina, mineralnih tvari i željeza. Boja mu je izrazito tamna, a koristi se kod anemija i oslabljenog imuniteta.[9,10]

1.1.2. Kemijski sastav meda

Glavni sastojci meda su ugljikohidrati koji čine 95-99% suhe tvari. Ugljikohidrati u medu su uglavnom monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi. Od monosaharida su najzastupljeniji fruktoza i glukoza, od disaharida maltoza, saharoza, izomaltoza, glutiloza i sl. Od oligosaharida možemo naći panozu, maltotriozu, kestozu i sl. (slika 2).



Slika 2. Kemijski sastav meda

Drugi značajni sastojak meda je voda. Sadržaj vode u medu ne smije biti veći od 15 do 20%, a količina vode u medu utječe na viskoznost, gustoću i kristalizaciju meda. Što je u medu više vode, teže će se kristalizirati.

U medu se nalazi niz organskih kiselina, kao što su mravlja, oksalna, limunska, maleinska, benzojeva i sl.

Proteini prelaze u med iz pčelinjih žlijezda slinovnica kada se u pčelinjem mednom želucu prerađuju nektar i medljika. Najznačajniji su albumin i globulin. Najvažniji enzim u medu je invertaza koja je ključna u sazrijevanju meda. Također med sadrži i dijastazu, glukoza oksidazu, lipazu, katalazu i dr.

Vitamini se u medu nalaze u vrlo malim količinama, nedovoljnim za potrebe ljudskog organizma. To su vitamin C i vitamini B kompleksa, niacin (vitamin B_3), pantotenska kiselina (vitamin B_5), biotin (vitamin B_7) i folna kiselina (vitamin B_9). Količina vitamina C ovisi o cvijeću iz kojeg pčele prikupljaju nektar, zrelosti meda i načinu čuvanja.

Od mineralnih tvari u medu se nalaze silicij, aluminij, željezo, magnezij, natrij, kalij, kalcij itd., a njihova količina ovisi o vrsti meda i njegovom podrijetlu.

Od fenolnih spojeva u medu se nalaze flavonoidi i fenolne kiseline. Iz skupine flavonoidi u medu se nalaze krizin, pinocembrin, pinobanksin, kvercetin, kempferol, luteolin, galangin, apigenin, hesperitin, miricetin. Fenolne kiseline u medu su kafeinska, kumarinska, ferulinska, elaginska, klorogenska i galna kiselina.

U medu se, u vrlo niskim koncentracijama, nalaze i hlapljivi spojevi koji su nositelji mirisa meda i na taj način doprinose aromi meda.[11]

Tablica 1. Sastav meda

SASTOJCI	**KEMIJSKA SKUPINA**	**KEMIJSKI SPOJ**
Ugljikohidrati	Monosaharidi	fruktoza, glukoza
	Disaharidi	saharoza, maltoza, izomaltoza, furanoza, palatinoza, nigeroza, turanoza, kojibioza

	Oligosaharidi	Malecitoza, erloza, rafinoza, 1-kestoza, maltotrioza, izomaltotrioza, panoza, izomaltotetroza, izomaltopentoza
Kiseline		glukonska, octena, maslačna, limunska, mravlja, mliječna, maleinska, oksalna, jabučna, sukcinska, fumarna, tartarna, α-ketoglutarna
Enzimi		katalaza, glukoza oksidaza, dijastaza, invertaza, laktaza, proteaza, lipaza, esteraza
Aminokiseline i proteini		albumin, globulin, prolin, lizin, histidin, arginin, glicin, treonin, serin, alanin, cistein, valin, aspartat, glutamat, metionin, izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin, triptofan
Mineralne tvari		kalij, natrij, magnezij, kalcij, željezo, bakar, mangan, klor, fosfor, krom, aluminij, kobalt, cink, olovo, kositar, sumpor
Vitamini		askorbinska kiselina, riboflavin, niacin, pantotenska kiselina, tiamin, biotin, folna kiselina

1.1.3. Fizikalna svojstva meda

U fizikalna svojstva meda spadaju viskoznost, kristalizacija, gustoća, specifična masa, optička svojstva, higroskopnost i fermentacija, temperatura i kiselo-bazna svojstva. Na fizikalna svojstva utječe sastav meda, odnosno prisustvo ili odsustvo pojedinih sastojaka meda. Tako su optička svojstva povezana sa sastavom i udjelom pojedinih ugljikohidrata, o udjelu vode ovise viskoznost, indeks refrakcije i specifična masa, a o udjelu mineralnih tvari ovisi električna vodljivost.[12]

Viskoznost

Na viskoznost utječe sastav meda, odnosno udio vode u medu, temperatura, broj i veličina kristala u medu te medonosno bilje od kojeg potječe nektar. Što je udio vode u medu veći, viskoznost je manja. Također povećanjem temperature pri

konstantnom udjelu vode, viskoznost se smanjuje. Osim vode, na viskoznost utječe sastav ugljikohidrata, odnosno veći udio disaharida i trisaharida pridonosi većoj viskoznosti.[13]

Kristalizacija

Kristalizacija je prirodno svojstvo meda. Med je prezasićena otopina glukoze koja prelazi spontano u stanje ravnoteže kristalizacijom suvišne količine glukoze u otopini. Glukoza gubi vodu, prelazi u kristalni oblik, a voda postaje slobodna te se povećava njen sadržaj u nekristaliziranim dijelovima meda. Iz tog razloga dolazi i do fermentacije i kvarenja meda. Za razliku od glukoze, fruktoza ostaje u tekućem stanju, ne kristalizira se i čini tanki sloj oko kristala glukoze. Kristalizacijom med mijenja boju, okus i miris, ali mu se kvaliteta ne mijenja.

Brzina kristalizacije ovisi o omjeru glukoze i fruktoze, ali i o drugim čimbenicima, poput udjela organskih kiselina, minerala, vitamina i dr. Kada i medu prevladava glukoza, uz smanjenje udjela vode, proces kristalizacije se ubrzava. Med sporije kristalizira ako ima veću količinu fruktoze u odnosu na glukozu. Kristalizaciju potiču umjerene temperature, između 10 i 21 ºC, dok temperature između 21 i 27 ºC produžuju proces kristalizacije. Iznad 27 ºC med se počinje kvariti i fermentirati.[13,14]

Specifična masa

Specifična masa je odnos mase meda prema masi iste količine vode i ovisi o udjelu vode u medu. 1 litra meda teži više od 1 kg, zato što sadrži i šećer. Što je med rjeđi, to je litra meda lakša i obrnuto. Također na specifičnu masu, odnosno gustoću, može i utjecati medonosno bilje od koje med potječe.[15]

Optička svojstva

Vodena otopina meda ima sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, a to znači da je optički aktivna. Optička svojstva su funkcija udjela pojedinih ugljikohidrata u medu. Fruktoza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, dok glukoza, disaharidi, trisaharidi i ostali oligosaharidi zakreću udesno. Nektarni med pokazuje negativnu optičku aktivnost jer zbog veće količine fruktoze svjetlost

zakreće ulijevo. Medljikovac pokazuje pozitivnu optičku aktivnost zato što sadrži veću količinu oligosaharida te zakreće svjetlost udesno.[15]

Higroskopnost

Higroskopnost je svojstvo meda da upija vlagu iz zraka te time dolazi do povećanja količine vode u površinskom sloju meda. Pošto med ima veliku viskoznost, gibanje apsorbirane vode s površinskih slojeva je sporo i promjene koje se događaju zbog higroskopnosti se očituju uglavnom na površini. Fruktoza je higroskopnija od glukoze pa visoki udio fruktoze čini med higroskopnim.[15]

1.1.4. Senzorska svojstva meda

U senzorska svojstva meda spadaju boja, okus i miris. Ona ovise o botaničkom podrijetlu meda i o uvjetima tijekom skladištenja i prerade. Senzorska analiza je važna za definiranje kvalitete meda i ona može ukazati na razna krivotvorenja meda, kao što je dodavanje šećera, dobivanje meda hranjenjem pčela šećerom ili nepravilno deklariranje meda.

Boja meda ovisi o botaničkom podrijetlu te može varirati od svijetložute do tamnosmeđe (slika 3). Boja meda ovisi i o kemijskom sastavu meda, posebno o udjelu karotenoida, flavonoida, klorofila, antocijanina, tanina i šećera. Med mijenja boju nakon procesa kristalizacije, odnosno boja postaje bljeđa zbog bijelih kristala glukoze.

Okus i miris su usko povezana senzorska svojstva koja zajedno čine aromu hrane i prehrambenih proizvoda pa tako i meda. Slatkoća meda ovisi o omjeru glukoze i fruktoze, prisustvu aminokiselina, eteričnih ulja, hlapljivih i nehlapljivih organskih kiselina. Miris meda uglavnom ovisi o biljci od koje med potječe. Svježi med je općenito aromatičniji jer su mirisni spojevi lako hlapljivi pa se čuvanjem i, posebno, zagrijavanjem meda gube i miris meda slabi. Također, svježi med je aromatičniji od kristaliziranog meda jer se hlapljivi spojevi uklapaju u kristale.

Mirisni spojevi meda najčešće se svrstavaju u tri skupine: karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni), alkoholi i esteri.[13,15]



Slika 3. Različite boje meda

1.1.5. Biološka svojstva meda

Med je veoma ljekovita namirnica, a liječenje medom se naziva apiterapija. Apiterapija nudi tretmane na bazi meda i drugih pčelinjih proizvoda u svrhu liječenja bolesti, uglavnom bakterijskih infekcija. Med djeluje i kao antiseptik pa je idealan za tretiranje rana gdje, između ostalog, ublažava bol te izvlači otrove iz rana od uboda ili ugriza.

Med olakšava simptome gripe i prehlade, ali i bolesti respiratornog sustava poput bronhitisa i upale grla i sinusa.[16]

Antibakterijsko djelovanje meda

Med je higroskopan, što znači da izvlači vlagu iz okoliša i može dehidrirati mikroorganizme te oni ugibaju. Visoki udio šećera i niska pH vrijednost također sprječavaju rast mikroorganizama.

Med manuke (*Leptospermum scoparium*) je najpoznatiji med koji ima inhibitorni učinak na preko 60 vrsta bakterija: aerobne, anaerobne, Gram pozitivne i Gram

negativne. Manuka med djeluje protiv nekoliko ljudskih patogena, poput *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella tymphimurium* i mnogih drugih.

Laboratorijska istraživanja su pokazala da je med učinkovit i kod meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (*MRSA*), *β*-hemolitičkih streptokoka i enterokoka rezistentnih na vankomicin (VRE).

Antibakterijska svojstva meda posljedica su visokog osmotskog tlaka, kiselosti (nizak pH) i sadržaja vodikovog peroksida (H_2O_2) te prisutnosti fitokemijskih sastojaka poput metilglikosala (MGO). Jedan od najznačajnijih antimikrobnih sastojaka u medu je vodikov peroksid (H_2O_2), čija koncentracija ovisi o relativnoj razini enzima glukoza oksidaze sintetizirane u pčelinjaku i katalaze koja potječe iz cvjetne peludi. Vodikov peroksid nastaje kada se med razrijedi, zato što se aktivira enzim glukoza oksidaza koji oksidira glukozu u glukonsku kiselinu ($C_6H_{12}O_7$) i H_2O_2. Aktivnost vodikovog peroksida u medu se može uništiti toplinom ili prisutnošću katalaze.

Med je kiseo, pH vrijednost mu je između 3,2 i 4,5 što je dovoljno nisko da inhibira rast bakterijskih patogena. Minimalne pH vrijednosti za inhibiciju rasta uobičajenih bakterijskih patogena su: *E. coli* 4,5, *Salmonella spp*. 4,0, *P. aeruginosa* 4,4, *S. pyogenes* 4,5.

Fenolni spojevi koji potječu iz biljnog nektara su važni čimbenici za antibakterijsko djelovanje meda. Nekoliko antibakterijskih fenolnih spojeva identificirano je u medu, ali je njihov doprinos ukupnoj antibakterijskoj aktivnosti meda još uvijek nepoznat. Razlog tome je što je koncentracija pojedinačnih fenola izoliranih iz meda previše niska da bi mogla pridonijeti antibakterijskom djelovanju.[17,18]

Antioksidacijsko djelovanje meda

Antioksidansi se jednostavno definiraju kao bilo koje tvari, koje prisutne u maloj koncentraciji u odnosu na supstrat koji se oksidira, značajno usporava ili potpuno sprječava oksidaciju supstrata. Oni su "čistači" slobodnih radikala i na taj način sprječavaju i popravljaju štetu koju su nanijeli slobodni radikali. Postoje dva izvora

antioksidansa: antioksidansi iz hrane i antioksidansi koje naše tijelo proizvodi pomoću minerala i vitamina. Antioksidansi iz hrane imaju veliku važnost u zaštiti ljudskog organizma, prevenciji mnogih bolesti, ali i u cjelokupnom zdravlju čovjeka.

U medu postoji velika količina sastojaka koji pokazuju antioksidacijsku aktivnost, a najpoznatiji su:

- Flavonoidi (krizin, pinocembrin, pinobanksin, kvercetin, kempferol, luteolin, galangin, apigenin, hesperitin, miricetin)
- Fenolne kiseline (kafeinska, kumarinska, ferulinska, elaginska, klorogenska, galna)
- Askorbinska kiselina
- Enzimi (glukoza oksidaze, katalaze, peroksidaze)
- Karotenoidi
- Produkti Millardovih reakcija.

Količina i vrsta antioksidansa u medu ovise o botaničkom i geografskom podrijetlu meda, dok proizvodnja, rukovanje i skladištenje meda nemaju veliki utjecaj.

Med je odličan prirodni izvor antioksidansa prvenstveno zbog prisustva fenolnih spojeva i to flavonoida i fenolnih kiselina. Fenolni spojevi određuju boju, ali i aromu meda. Antioksidacijska aktivnost meda u korelaciji je sa sadržajem ukupnih fenola i bojom meda. Tamniji med sadrži više ukupnih fenola i ima veću antioksidacijsku aktivnost, dok svjetliji med ima manji sadržaj fenola i manju antioksidacijsku aktivnost. Različite vrste meda imaju različiti profil flavonoida i fenolnih kiselina ovisno o biljci koja je glavni izvor nektara. Osim antioksidacijskih svojstva, flavonoidi imaju i protuupalno, antibakterijsko, antialergijsko i antitumorsko djelovanje.[19,20]

1.2. HLAPLJIVI SPOJEVI U MEDU

Hlapljivi spojevi prisutni u medu odgovorni su miris meda. Porijeklo hlapljivih spojeva u medu je različito. Oni mogu potjecati od biljaka s kojih pčele skupljaju

nektar ili mogu nastati pretvorbom biljnih sastojaka od strane pčela. Nadalje, hlapljivi spojevi mogu nastati za vrijeme prerade meda (npr. zagrijavanjem meda) ili tijekom skladištenja meda.

Hlapljivi spojevi koji se nalaze u medu su različitog biosintetskog porijekla, odnosno nastaju različitim biosintetskim putevima. Ti spojevi pripadaju različitim skupinama organskih spojeva kao što su: alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, terpenoidi, norizoprenoidi, derivati benzena, derivati furana i pirana. Međutim, glavni hlapljivi spojevi identificirani u različitim vrstama meda pripadaju u tri skupine organskih spojeva: terpenoidi, norizoprenoidi i derivati benzena.[21]

1.2.1. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Med je složen supstrat za analizu. Hlapljivi sastojci meda imaju različite kemijske strukture i prisutni su u vrlo niskim koncentracijama u matrici šećera. Iz složenog matriksa izoliraju se korištenjem različitih metoda koje se razlikuju po učinkovitosti i selektivnosti. Najčešće su to različite tehnike ekstrakcije kao što su ekstrakcija tekuće-tekuće, ultrazvučna ekstrakcija (engl. *ultrasound assisted solvent extraction*, USE) i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME). Destilacijske tehnike poput hidrodestilacije (HD) i istodobne destilacije-ekstrakcije (SDE) nisu pogodne metode za izolaciju hlapljivih spojeva meda jer uključuju zagrijavanje. Toplinska obrada meda može dovesti do nastanka toplinskih artefakata, derivata furana i pirana, zbog utjecaja topline na ugljikohidrate ili aminokiseline.

Analiza hlapljivih spojeva provodi se plinskom kromatografijom u kombinaciji s spektrometrijom masa (vezani sustav plinska kromatografija- spektrometrija masa, GC-MS).[22]

1.2.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE)

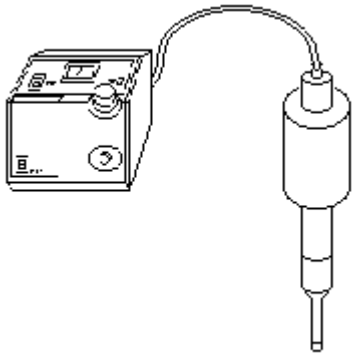
Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (od engl. *ultrasound-assisted solvent extraction*, USE) je veoma jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama. USE je oblik ekstrakcije kod koje se koristi ultrazvuk frekvencije između 20 i 2000 kHz. Tijekom ultrazvučne ekstrakcije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

Prilikom primjene ove metode važno je odabrati odgovarajuće otapalo, optimizirati temperaturu procesa i snagu ultrazvuka. Ovisno o frekvenciji razlikujemo ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više, dok ultrazvuk niskog intenziteta djeluje u frekvencijskom rasponu od 20 do 100 MHz. Ultrazvuk niskog intenziteta ne uzrokuje nikakve kemijske ni fizičke promjene u mediju na koji se primjenjuje, stoga se koristi kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, za mjerenje teksture, sastava, viskoznosti, brzine protjecanja, koncentracije tvari u hrani i sl. Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje kemijske i/ili fizičke promjene pa se iz tog razloga primjenjuje za procese sušenja, za otplinjavanje i homogenizaciju tekućina, destilaciju, sterilizaciju itd.[29] Pravilan izbor organskog otapala je važan jer organska otapala mogu ekstrahirati i nehlapljive sastojke iz uzorka što smeta u GC-MS analizi. Naime, nehlapljivi spojevi kontaminiraju kolonu plinske kromatografije. Također, neki spojevi se mogu maskirati otapalom ili se mogu izgubiti tijekom uklanjanja (otparavanja) otapala čime se smanjuje učinkovitost analize. Otapala koja se najčešće koriste su heksan, aceton, kloroform, diklormetan, dietil-eter, metanol, pentan, smjesa pentana i dietil-etera (1:2 v/v). Iako se ova metoda ekstrakcije provodi pri relativno niskim temperaturama (oko 25 °C) za toplinski nestabilne temperatura se može i sniziti.

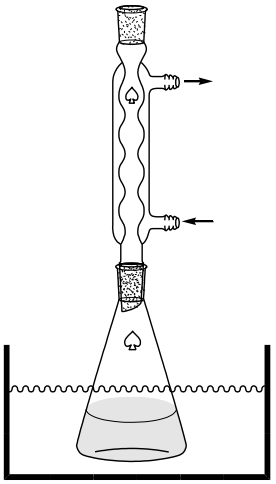
Ovom ekstrakcijskom tehnikom može se povećati učinkovitost ekstrakcije određenih komponenti iz uzorka, kao što su polifenoli, antocijani, aromatske tvari, polisaharidi, ulja i funkcionalni spojevi i sl. [21-23]

Postoje dvije vrste sustava za ultrazvučnu ekstrakciju:

1) **Izravna ultrazvučna ekstrakcija** koja koristi ultrazvučne sonde (slika 4) koje se postavljaju u otopinu s uzorkom
2) **Neizravna ultrazvučna ekstrakcija** koja koristi ultrazvučnu kupelj (slika 5).



Slika 4. Ultrazvučna sonda

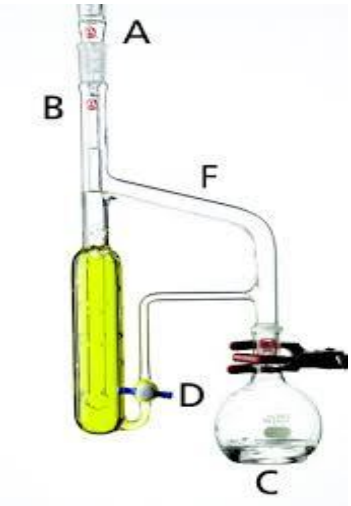


Slika 5. Ultrazvučna kupelj s uzorkom u tikvici

1.2.1.2. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće–tekuće (ekstrakcija iz tekućeg uzorka) temelji se na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se ne miješaju. Pritom dolazi do razdjeljenja tvari između dva otapala. Najčešće se radi o vodenoj otopini tvari koje se žele izolirati ekstrakcijom korištenjem pogodnog organskog otapala. Kao i kod prethodno opisane ultrazvučne ekstrakcije, izbor organska otapala je veoma važan i vrijedi sve što je navedeno za USE (poglavlje 1.2.1.1.). Ekstrakcija tekuće-tekuće najjednostavnije se provodi u lijevku za odjeljivanje (diskontinuirano) ili u komercijalno dostupnim ekstraktorima (kontinuirano).

Komercijalni ekstraktori za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće razlikuju se po izvedbi ovisno o tome jesu li namijenjeni za korištenje otapala lakših ili težih od vode. Za otapala lakša od vode (slika 6), u ekstraktor (B) je potrebno umetnuti adapter koji omogućava da otapalo koje se zagrijava u tikvici (C) i isparava pa potom kondenzira u hladilu (A) kroz cijev adaptera dolazi do dna ekstraktora odakle difundira kroz vodeni sloj. Zbog manje gustoće otapala od vode, ono se uzdiže kroz vodeni sloj i pritom ekstrahira željene tvari. Ekstrakcijsko otapalo reciklira se preko bočne cijevi (F) natrag u tikvicu (C). Za vrijeme ekstrakcije pipac (D) mora biti zatvoren.



Slika 6. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće; izvedba za otapala lakša od vode

Kada se za ekstrakciju koriste otapala teža od vode adapter nije potreban. Otapalo za ekstrakciju kondenzira se u hladilu i prolazi kroz vodenu fazu (gornji sloj) u ekstraktoru. Otapalo se skuplja na dnu ekstraktora i zakonom spojenih posuda automatski se prelijeva u tikvicu (pipac mora biti otvoren).

Odjeljivanje organskog od vodenog sloja može biti složeno zbog nastajanje emulzija te se u tom slučaju koristi centrifugiranje za razbijanje emulzije i bolje odjeljivanje slojeva. Nastanak emulzije se može spriječiti dodavanjem zasićene vodene otopine NaCl umjesto destilirane vode.[23]

1.2.2. Analiza hlapljivih spojeva

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

1.2.2.1. Plinska kromatografija

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

Plinska kromatografija je instrumentna metoda odjeljivanja smjesa hlapljivih organskih spojeva. Kod plinske kromatografije dolazi do raspodjele plinskog uzorka između inertnog plina kao mobilne faze i tekuće ili čvrste stacionarne faze. Uređaj za plinsku kromatografiju se naziva plinski kromatograf.

Postoje 2 vrste plinske kromatografije:

- **adsorpcijska**, gdje je pokretna faza plin, a nepokretna krutina
- **razdjelna** gdje je pokretna faza plin, a nepokretna faza nehlapljiva tekućina.

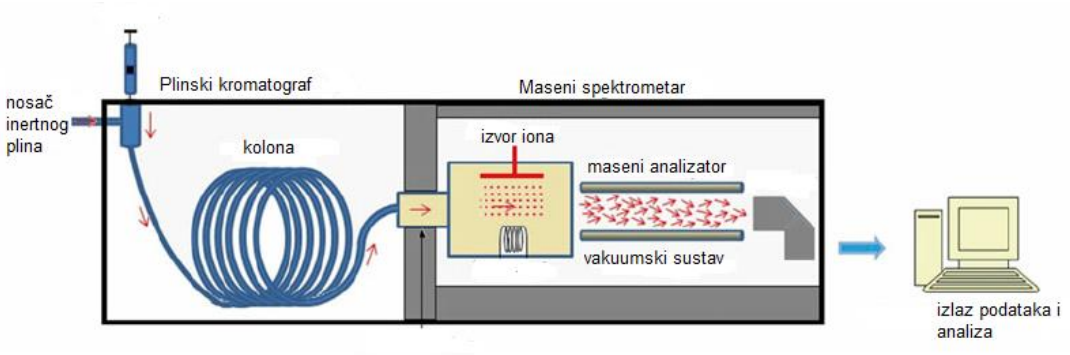
Uzorak kod plinske kromatografije mora biti preveden u plinovito stanje. Kao pokretna faza koristi se kemijski inertan plin, kao šta je argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid. Mjesto za injektiranje uzorka i detektor su zagrijani na višu temperaturu nego sama kromatografska kolona kako bi osiguralo prevođenje tekućeg uzorka u plinovito stanje pri injektiranju te spriječila kondenzacija odijeljenih sastojaka koji ulaze u detektor. Komponente uzorka koje se eluiraju s kolone u detektoru se registriraju na temelju neke fizikalne ili kemijske promjene. Na temelju zapisa detektora moguće je kvalitativno i kvantitativno odrediti eluirane komponente uzorka.[24]

Primarni cilj GC analize je određivanje količine tvari u smjesi (kvantitativna analiza). S obzirom da svaka vrsta ima drugačiju brzinu napredovanja, različite komponente smjese se odvajaju dok prolaze duž kolone i dostižu kraj kolone u različito vrijeme, što se naziva vrijeme zadržavanja, odnosno retencijsko vrijeme, t_R. Vrijeme zadržavanja je vrijeme između injektiranja uzorka i odziva detektora, tj. pojave signala na detektoru. Ono ovisi o prirodi eluiranog sastojka i vrsti stacionarne faze, ali i o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i dr.

Najčešći detektori u plinskoj kromatografiji su plameno ionizacijski detektor, detektor toplinske vodljivosti i detektor apsorpcije elektrona. Međutim, puno bolja kvalitativna analiza hlapljivih smjesa dobiva se vezivanjem plinske kromatografije s nekom od spektroskopskih metodama kao što su masena spektroskopija, infracrvena spektroskopija i nuklearna magnetska rezonancija. Tako nastaju kombinirane (vezane, spregnute) tehnike koje spajaju sposobnost odjeljivanja kromatografije s mogućnošću kvalitativne i kvantitativne analize koje imaju spektroskopske metode.

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je metoda strukturne analize, tj. metoda identifikacije ispitivane tvari. Spektar masa je karakterističan za pojedinu

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



Slika 7. Shematski prikaz veznog sustava plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su idealne za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju (slika 7). Plinska kromatografija vrlo je uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa vrlo pogodna za kvalitativnu analizu pa služi kao vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf.

Prednosti vezanog sustava GC-MS su:

- Velika učinkovitost odvajanja
- Visoka osjetljivost
- Velika selektivnost
- Obnovljivost masenih spektra
- Jednostavnost
- Niski troškovi.[25-27]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. DIVLJA TREŠNJA

Divlja trešnja ili rašeljka je biljka iz roda *Prunus*. Naziv rodu dao je 1737. godine otac taksonomije Carl Linnaeus. Botanički biljke, *Prunus mahaleb*, dolazi od grčke riječi 'proumnon' što označava stablo šljive, te mahaleb (hebrejska riječ za mlijeko), vjerojatno zbog bijelih cvjetova.

Nalazi se kao samonikla voćna vrsta na velikom dijelu mediteranske obale, centralne Europe, Azije i dijela Afrike. U Hrvatskoj je rasprostranjena duž jadranske obale i dalmatinskog zaleđa. Može rasti i u duboko kontinentalnim predjelima, i to samo na južnim, osunčanim obroncima. Živi na terenima i do 1500 do 1600 m nadmorske visine. To ukazuje na njenu sposobnost prilagodbe na različite ekološke uvjete.

Rašeljka, *Prunus mahaleb* (slika 8), je razgranata grmolika biljka ili niže stablo. Raste na stjenovitim obroncima, po šikarama, među živicom i uz rub putova, a pogoduje joj vapnenasto tlo. Cvate od travnja do svibnja kada izbijaju bijeli cvjetovi. Plodovi veličine graška dozrijevaju od srpnja do kolovoza i uglavnom se ne upotrebljavaju svježi. Sadrže organske kiseline, fruktozu i C vitamin, a njihov se sok koristi za bojanje vina i drugih napitaka. Plodovi imaju veliki potencijal u industrijskoj proizvodnji, kao izvor prirodnih bojila, antioksidansa, fenola, šećera, ulja iz sjemenki.

Iako rašeljka obilno cvate, daje malo meda koji je vrhunske kakvoće.[28]



Slika 8. Divlja trešnja u cvatu

2.2. KEMIKALIJE I APARATURA

Kemikalije:

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

Aparatura:

- tehnička vaga, Kern 572, Velika Britanija
- ultrazvučna kupelj, Elma D – 78224, Njemačka
- aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- magnetska miješalica, Heidolph MR her-Standard s termostatom Heidolph EKT 3001, Njemačka
- centrifuga, Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- vezani sustav plinska kromatografija–spektometrija masa, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD:
  - plinski kromotograf model 7820A
  - spektrometar masa model 5977E.

2.3. IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

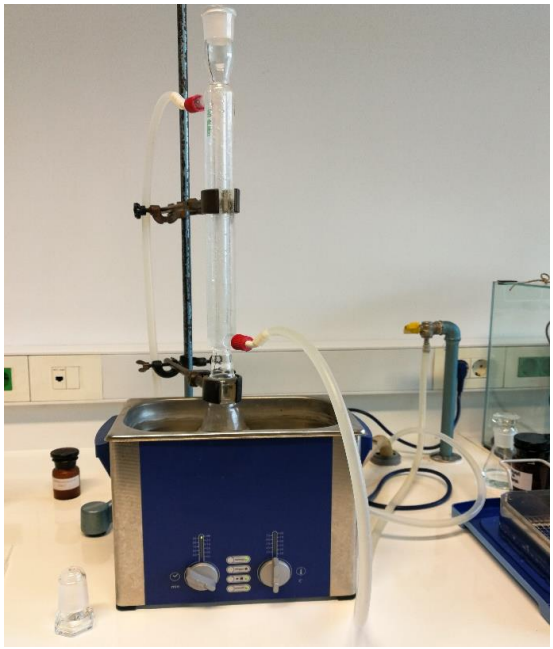
Uzorci meda divlje trešnje dobiveni su od pčelara iz Kutjeva (Požeško-slavonska županija) i Voćina (Virovitičko-podravska županija). Hlapljivi spojevi meda divlje trešnje izolirani su dvjema metodama, ultrazvučnom ekstrakcijom (USE) i ekstrakcijom tekuće-tekuće.

2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom (USE)

Ultrazvučna ekstrakcija je postupak kojim se uzorak ekstrahira pomoću ultrazvučnih valova. Hlapljivi spojevi meda divlje trešnje izolirani su ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom, smjesom pentan : dietil-eter = 1:2, v/v. Aparatura za USE sastojala se od Erlenmeyerove tikvice, Liebigovog hladila i ultrazvučne kupelji (slika 9).

U Erlenmeyerovu tikvicu je odvagano 40 g meda i dodano 22 ml destilirane vode. Zatim je odvagano 1,5 g bezvodnog natrijevog sulfata (Na_2SO_4) koji je postepeno dodavan u tikvicu uz intenzivno miješanje. U tako pripremljenu otopinu dodano je 20 ml otapala za ekstrakciju, smjese pentan : dietil-eter. Erlenmeyerova tikvica, na koju je postavljeno Liebigovo hladilo, uronjena je u ultrazvučnu kupelj i započeta je ekstrakcija. Sonifikacija je vršena 30 minuta pri temperaturi 25 ± 3 ºC i frekvenciji 35 kHz. Nakon završetka sonifikacije i hlađenja, iz uzorka je odijeljen gornji, organski sloj pomoću kapaljke i osušen filtriranjem preko lijevka u kojem se nalazila pamučna vata, a iznad nje bezvodni Na_2SO_4.

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



Slika 9. Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju

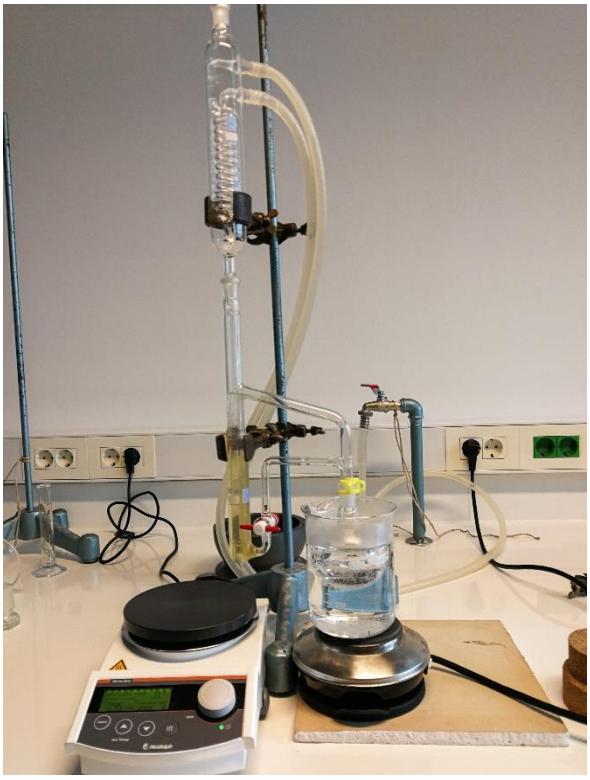
2.3.2. Kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće provedena je u komercijalnom ekstraktoru, a kao otapalo korištena je smjesa pentan : dietileter 1:2, v/v. Aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće sastojala se od ekstraktora s hladilom po Allihnu i tikvice s okruglim dnom od 100 mL, vodene kupelji, električnog kuhala i magnetske miješalice (slika 10).

U Erlenmeyerovu tikvicu odvagano je 20 g meda i dodano 20 ml destilirane vode te je smjesa miješana snažnim potresivanjem kako bi se med otopio. Nakon sastavljanja aparature, u ekstraktor je uliven uzorak, med otopljen u vodi, i umetnut je adapter (uska cjevčicu sa malim otvorom na dnu). Potom je dodano otapalo za ekstrakciju, smjesa pentan : dietil-eter 1:2, v/v. Ekstrakcija se kontinuirano odvijala 3 sata.

Nakon završetka ekstrakcije, čitava smjesa (uzorak i organsko otapalo) je ulivena u lijevak za odjeljivanje, kapaljkom je odijeljen gornji organski sloj i filtriran preko staklenog lijevka s pamukom (vatom) i bezvodnim Na_2SO_4. Na ovaj način nije bilo

moguće u potpunosti odijeliti organski od vodenog sloja. Zato je ostatak iz lijevka za odjeljivanje centrifugiran. Nakon centrifugiranja, gornji, organski sloj je odijeljen kapaljkom, filtriran na prethodno opisan način i pridružen tikvicu u kojoj se nalazila većina organskog ekstrakta. Organski ekstrakt je koncentriran, odnosno uklonjeno je organsko otapalo frakcijskom destilacijom uz zagrijavanje tikvice s uzorkom preko vodene kupelji. Tako je dobiven uzorak za GC-MS analizu koji je čuvan u zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku do GC-MS analize.



Slika 10. Aparatura za kontinuiranu ekstrakciju tekuće-tekuće

2.4. ANALIZA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva provedena je plinskom kromatografijom–spektrometrijom masa (GC-MS). Pri tome je korišten vezani

sustav GC-MS proizvođača Agilent Technologies koji se sastoji od plinskog kromatografa 7820A i spektrometra masa 5977E (slika 11).

Analize su izvršene na koloni HP-5MS s nepolarnom stacionarnom fazom, proizvođača Agilent Technologies čiji je kemijski sastav 5% difenil-95% dimetilpolisilksan, a dimenzije 30 m x 0,25 mm i debljina sloja stacionarne faze 0,20 µm. Protok plina nositelja, helija, bio je 1mL/min, omjer cijepanja 1:50, temperatura injektora iznosila je 250°C, temperatura detektora 280°C, a energija ionizacije 70eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3 min pri 70°C, zatim zagrijavanje od 70°C do 200°C brzinom od 3°C/min i zadržavanje od 2 min pri 200°C.

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

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

- kromatogram ukupne ionske struje (kraće TIC od engl. *total ion chromatogram*)
- vrijeme zadržavanja svakog sastojka (na kromatogramu predstavljeno pikom)
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postotcima (udio površine pika u ukupnoj površini) i
- naziv spoja ili spojeva čiji je spektar masa najsličniji spektru nepoznate komponente (sličnosti spektara koji su uspoređeni izraženi su u postotcima).



Slika 11. GC-MS aparatura

3. REZULTATI

Hlapljivi spojevi izolirani su iz meda divlje trešnje (dva uzorka od pčelara iz Kutjeva, uzorak 1 i Voćina, uzorak 2) dvjema metodama, ultrazvučnom ekstrakcijom, USE i ekstrakcijom tekuće-tekuće (poglavlje 2.3.). Dobivena su četiri uzorka hlapljivih spojeva, a svi su analizirani vezanim sustavom GC-MS. Rezultati analiza su prikazani u tablicama 2 i 3. Spojevi u tablicama poredani su prema redoslijedu eluiranja (vremenu zadržavanja) sa kolone HP-5MS. Maseni udio svakog spoja u uzorku (u %) predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini svih pikova.

Značenje simbola u tablicama je:

t_R - vrijeme zadržavanja u minutama

1 – med divlje trešnje Kutjevo

2 – med divlje trešnje Voćin

/ - spoj nije identificiran u uzorku

* - točan izomer nije određen

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

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

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 1	2
1.	benzaldehid	5,47	0,5	0,5
2.	benzil-alkohol	7,62	1,5	/
3.	2-feniletanol	10,36	0,5	/
4.	aldehid jorgovana[a]	11,71	/	0,5
5.	benzojeva kiselina	13,17	10,6	3,6
6.	terpendiol I*,[a]	13,37	3,0	3,5

7.	4-vinilfenol	15,03	8,5	3,0
8.	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	15,29	1,8	/
9.	2-feniloctena kiselina	16,63	1,3	7,3
10.	2-metoksi-4-vinilfenol	18,50	5,6	2,1
11.	3-(5-metil-5-viniltetra hidrofuran-2-il)butan-2-ol[a]	19,22	4,0	/
12.	2-metil-4-nitrorezorcinol[a]	19,29	/	5,7
13.	izofitol[a]	19,58	9,2	21,9
14.	3,5,11,15-tetrametil--hekdadec-1-en-3-ol[a]	19,70	3,6	/
15.	8-hidroksilinalol*[a]	19,84	2,8	/
16.	4-alilfenol[a]	20,13	2,3	/
17.	8-hidroksilinalol*[a]	20,63	1,4	1,3
18.	vanilin	22,10	2,9	/
19.	2,6-di(1,1-dimetiletil) -4-metilfenol	26,54	/	
20.	5-aminoindan-1-on[a]	29,59	0,8	/
21.	3-hidroksi-β-damaskon[a]	30,60	/	1,2
22.	2,4,5-trimetilkumen[a]	31,74	/	2,0
23.	3-okso-7,8-dihidro-α-jonol[a]	33,83	/	2,2
24.	6,7-dehidro-7,8-dihidro--3-okso-α-jonol[a]	34,08	2,2	6,0
25.	kar-3-en-2,5-dion[a]	36,23	/	8,8
26.	metil-siringat	36,30	21,2	/
27.	4-hidroksi-3,5,6-trimetil -4-(3-oksobuten-1-il)ciklo-heks-2-en-1-on[a]	37,05	7,6	12,3
28.	palmitinska kiselina	42,69	1,1	/
29.	trikosan	56,33	2,2	/
Ukupno identificirano (%)			94,6	81,9

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom tekuće-tekuće

Red. broj	Spoj	t_R (min)	Udio (%) 1	2
1.	3-metilpentanska kiselina	5,17	1,6	/
2.	benzaldehid	5,47	0,7	/
3.	benzil-alkohol	7,62	1,1	/
4.	2-feniletanol	10,36	0,4	/
5.	aldehid jorgovana[a]	11,71	0,3	/
6.	benzojeva kiselina	13,17	7,1	2,7
7.	terpendiol I*[,a]	13,37	1,4	2,1
8.	4-vinilfenol	15,03	4,0	4,6
9.	5-hidroksimetilfurfural (HMF)	15,29	0,2	1,5
10.	2-feniloctena kiselina	16,63	23,5	7,4
11.	2-metoksi-4-vinilfenol	18,50	2,6	3,0
12.	2-metil-4-nitrorezorcinol[a]	19,29	2,1	5,0
13.	izofitol[a]	19,58	4,0	13,9
14.	3,5,11,15-tetrametil-hekdadec-1-en-3-ol[a]	19,70	1,4	/
15.	8-hidroksilinalol*[a]	19,84	0,5	/
16.	4-alilfenol[a]	20,13	0,9	/
17.	8-hidroksilinalol*[a]	20,63	0,6	/
18.	vanilin	22,10	1,3	/
19.	2,6-di(1,1-dimetiletil)--4-metilfenol	26,54	/	2,2
20.	dibenzil[a]	26,70	20,5	/
21.	4-hidroksibenzojeva kiselina	29,03	/	2,3
22.	2,4,5-trimetilkumen[a]	31,74	0,6	2,8
23.	3-okso-7,8-dihidro-α-jonol[a]	33,83	/	1,6
24.	1,2-difeniletanol[a]	33,72	3,7	/

25.	6,7-dehidro-7,8-dihidro--3-okso-α-jonol[a]	34,08	1,0	3,9
26.	dibenzil-keton[a]	36,02	1,3	/
27.	kar-3-en-2,5-dion[a]	36,23	/	6,1
28.	metil-siringat	36,30	8,6	/
29.	4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4-(3-oksobuten-1-il)ciklo-heks-2-en-1-on[a]	37,05	2,0	20,2
30.	palmitinska kiselina	42,69	2,4	/
31.	trikosan	56,33	1,7	/
Ukupno identificirano (%)			94,8	79,3

4. RASPRAVA

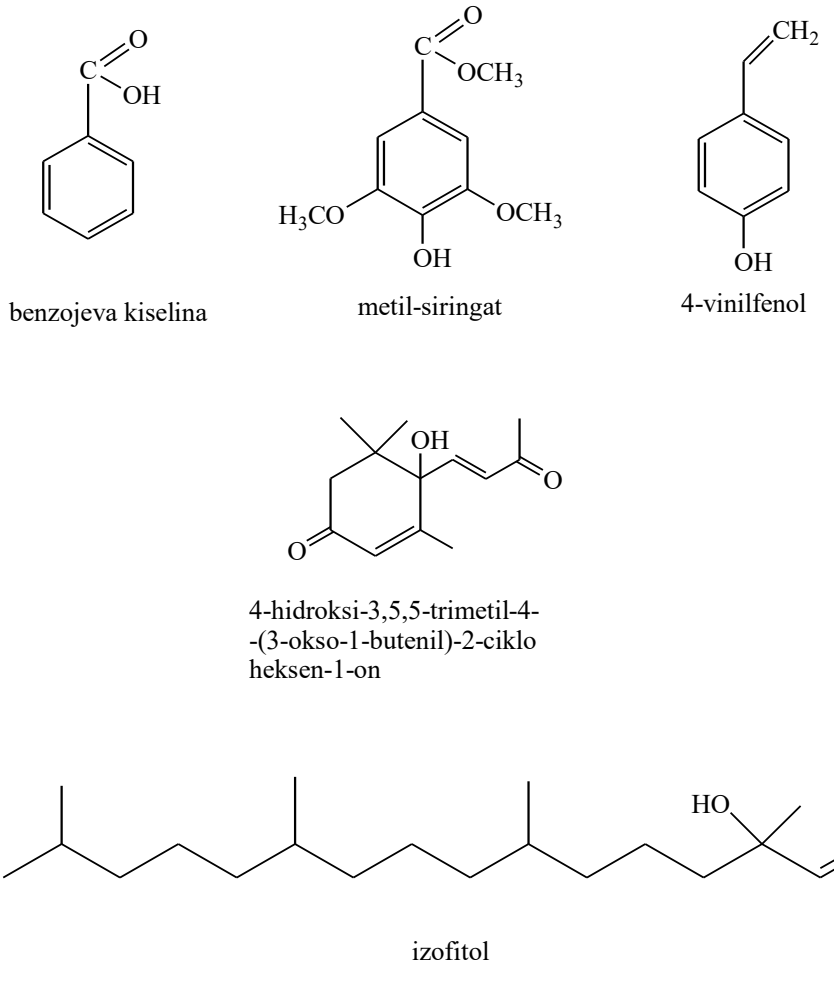
Cilj ovog rada bio je istražiti kemijski sastav i sadržaj hlapljivih (i poluhlapljivih) spojeva meda divlje trešnje. Korištena su dva uzorka meda dobivena od pčelara iz Kutjeva (Požeško-slavonska županija), u daljnjem tekstu uzorak 1 i Voćina (Virovitičko-podravska županija), u daljnjem tekstu uzorak 2. Hlapljivi (i poluhlapljivi) spojevi meda divlje trešnje izolirani su dvjema metodama, ultrazvučnom ekstrakcijom organskim otapalom (USE) i kontinuiranom ekstrakcijom tekuće-tekuće. Za ekstrakciju je korišteno isto otapalo, smjesa otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Svi uzorci hlapljivih i poluhlapljivih spojeva potom su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa na nepolarnoj HP-5MS koloni, a rezultati analiza su prikazani u tablicama.

4.1. HLAPLJIVI SPOJEVI IZOLIRANI ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM

Ultrazvučna ekstrakcija organskim otapalom je metoda kojom se osim hlapljivih izoliraju i poluhlapljivi spojevi. Kemijski sastav i sadržaj (udio) hlapljivih i poluhlapljivih spojeva u oba uzorka meda divlje trešnje izoliranih ultrazvučnom ekstrakcijom prikazan je u tablici 2.

U uzorku 1 identificirana su 22 spoja koji čine 90,8 % od ukupnih hlapljivih spojeva u uzorku. Glavni spoj u uzorku je metil-siringat (21,2 %), a slijede benzojeva kiselina (10,6 %), izofitol (9,2 %), 4-vinilfenol (8,5 %) i 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on (7,6 %). Metil-siringat je trivijalno ime estera metil-3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzoata koji spada u veliku skupinu prirodnih organskih spojeva, fenolne spojeve, a s obzirom na osnovni strukturni element u podskupinu C_6C_1 fenolnih spojeva (slika 12). Benzojeva kiselina također spada C_6C_1 fenolne spojeve. Ovi spojevi nastaju biosintetskim putem koji je karakterističan za fenolne spojeve, a to je šikiminski biosintetski put. Metil-siringat i benzojeva kiselina potječu iz nektara i identificirani su u raznim vrstama meda. Keton 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on je

predstavnik norizoprenoida, točnije C_{13}-norizoprenoida. Norizoprenoidi nastaju razgradnjom karotenoida. Izofitol je diterpenski aciklički alkohol, derivat fitola s obzirom na položaj hidroksilne (-OH) skupine i dvostruke veze. Fitol je jedan od glavnih acikličkih diterpenskih alkohola i uobičajeni hlapljivi spoj zelenih biljaka jer nastaje razgradnjom klorofila. S obzirom na navedeno i činjenicu da je izofitol mirisni spoj, on vjerojatno potječe iz cvjetnog nektara.



Slika 12. Glavni sastojci USE ekstrakta meda divlje trešnje

U literaturi je uobičajeno svrstavanje glavnih hlapljivih spojeva identificiranih u različitim vrstama meda u tri skupine organskih spojeva, terpenoide, norizoprenoide i derivate benzena. Dakle, glavni sastojci ovog uzorka hlapljivih spojeva su upravo spojevi iz navedenih skupina. Metil-siringat i benzojeva kiselina te 4-vinilfenol su derivati benzena, izofitol je diterpenski alkohol, a 4-hidroksi-3,5,5-

trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on je C_{13}-norizoprenoid. Od derivata benzena kvantitativno značajan sastojak u ovom uzorku je još i 2-metoksi-4-vinilfenol (5,6 %). Ostali derivati benzena identificirani u uzorku 1 u manjim količinama su: benzaldehid, benzil-alkohol, 2-feniletanol, 2-feniloctena kiselina, 4-alilfenol (kavikol) i vanilin. Udio 5-hidroksimetilfurfurala (1,8 %) je nizak što je u skladu s očekivanim s obzirom da se ultrazvučna ekstrakcija provodi pri sobnoj temperaturi (oko 25 °C). 5-Hidroksimetilfurfural (HMF) je spoj koji se nalazi u svim vrstama meda u manjim količinama. Ovaj spoj se smatra glavni toplinskim artefaktom i pokazatelj je nepravilnog postupanja s medom, npr. zagrijavanja meda, ali i starosti meda. Starenjem meda udio HMF-a raste.

U uzorku 2 identificirano je 16 hlapljivih spojeva. Uspješnost identifikacije bila je relativno niska, identificirano je 81,9 % od ukupnih hlapljivih spojeva u uzorku. Glavni spoj u ovom uzorku je diterpenski aciklički alkohol izofitol (21,9 %). Kvantitativno značajni sastojci su 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on (12,3 %), kar-3-en-2,5-dion (8,8 %) i 2-feniloctena kiselina (7,3 %). Interesantno, u ovom uzorku nije identificiran metil-siringat. Kar-3-en-2,5-dion je terpenski spoj,a 2-feniloctena kiselina spada u derivate benzena.

4.2. HLAPLJIVI SPOJEVI IZOLIRANI EKSTRAKCIJOM TEKUĆE-TEKUĆE

Ekstrakcija tekuće-tekuće provedena je kontinuirano i s istim organskim otapalom kao i ultrazvučna ekstrakcija, smjesom pentan:dietil-eter 1:2. Kemijski sastav i sadržaj (udio) hlapljivih i poluhlapljivih spojeva u oba uzorka meda divlje trešnje prikazan je u tablici 3.

U uzorku 1 identificirano je 27 spojeva koji čine 94,8 % od ukupnih hlapljivih spojeva u uzorku. Glavni sastojci uzorka su 2-feniloctena kiselina (23,5 %) i dibenzil (1,2-difeniletan, 20,5 %). Kvantitativno značajni sastojci uzorka su metil-siringat (8,6 %) i benzojeva kiselina (7,1 %). S obzirom na strukture navedeni spojevi su derivati benzena. Uključivši ostale derivate benzena koji su identificirani u uzorku u manjim količinama, a to su benzaldehid, benzil-akohol, 2-feniletanol, 4-

vinilfenol, 2-metoksi-4-vinilfenol, 4-alilfenol, vanilin, 1,2-difeniletanol i dibenzil-keton, može se reći da u uzorku prevladavaju derivati benzena.

U uzorku 2 identificirano je 15 spojeva. Uspješnost identifikacije bila je i kod ovog uzorka niska, identificirano je samo 79,3 % od ukupnih hlapljivih spojeva u uzorku. Glavni sastojci u uzorku su C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on (20,2 %) i diterpenski alkohol izofitol (13,9 %). Kvantitativno značajni sastojci uzorka su 2-feniloctena kiselina (7,4 %) i kar-3-en-2,5-dion (6,1 %).

Iz rezultata dobivenih u ovom radu vidi se da se odabirom različitih metoda ekstrakcije, čak i kad se koristi isto otapalo za ekstrakciju, dobiva bolji profil hlapljivih spojeva meda, odnosno potpuniji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva. Da bi se zaključilo koja je metoda pogodnija za izolaciju hlapljivih spojeva iz meda istraživanja treba nastaviti i proširiti. Na primjer, ove dvije metode ekstrakcije mogu se provesti drugim otapalom (različite polarnosti) ili se mogu odabrati druge metode ekstrakcije, kao što su mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi (uz vlakna različite polarnosti) ili *headspace* ekstrakcija.

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu je istražen je profil hlapljivih spojeva meda divlje trešnje, tj. određen je sastav i sadržaj hlapljivih spojeva. Za izolaciju hlapljivih spojeva korištena je metoda ekstrakcije i to ultrazvučna ekstrakcija i kontinuirana ekstrakcija tekuće-tekuće. U obje ekstrakcijske tehnike korišteno je isto otapalo, smjesa otapala pentan:dietil-eter 1:2, v/v. Analiza svih uzoraka je provedena plinskom kromatografijom–masenom spektrometrijom.
- Glavni sastojci u uzorku hlapljivih spojeva meda iz Kutjeva dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom su derivati benzena, metil-siringat, benzojeva kiselina i 4-vinilfenol, diterpenski alkohol izofitol i C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on.
- Glavni spoj među hlapljivim spojevima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom (med iz Voćina) je diterpenski alkohol izofitol, a kvantitativno značajni sastojci su C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on (12,3 %), terpenski spoj kar-3-en-2,5-dion i derivat benzena 2-feniloctena kiselina.
- U uzorku hlapljivih spojeva izoliranih ekstrakcijom tekuće-tekuće (uzorak 1) prevladavaju derivati benzena, a glavni sastojci su 2-feniloctena kiselina i dibenzil (1,2-difeniletan).
- Glavni spoj među hlapljivim spojevima uzorka 2 dobivenim ekstrakcijom tekuće-tekuće je C_{13}-norizoprenoid 4-hidroksi-3,5,5-trimetil-4-(3-okso-1-butenil)-2-cikloheksen-1-on, a slijedi diterpenski alkohol izofitol.
- Odabirom različitih tehnika ekstrakcije, čak i kad se koristi isto otapalo za ekstrakciju, dobiva se bolji profil hlapljivih spojeva meda, odnosno potpuniji uvid u sastav i sadržaj hlapljivih spojeva meda.

6. LITERATURA

1. https://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/kratka-povijest-meda/ (pristupljeno 1. 8. 2019.)
2. https://hr.wikipedia.org/wiki/Pčelarstvo (pristupljeno 01. 08. 2019.)
3. Narodne novine, *Pravilnik o kavoći meda i drugih pčelinjih proizvoda*, Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH 20/00.
4. https://hr.wikipedia.org/wiki/Med (pristupljeno 01. 08. 2019.)
5. https://www.tportal.hr/lifestyle/clanak/i-s-medom-treba-oprezno-a-evo-i-zasto-20141028 (pristupljeno 01. 08. 2019.)
6. https://animals.howstuffworks.com/insects/bee6.htm (pristupljeno 02. 08. 2019)
7. http://med-zdravlje.blogspot.com/2011/12/kategorije-meda.html (pristupljeno 02. 08. 2019)
8. https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/22842/Med-produkt-suzivota-pcela-i-ljudi.html (pristupljeno 02. 08. 2019)
9. https://gospodarski.hr/nekategorizirano/kvaliteta-meda/8099/ (pristupljeno 02. 08. 2019)
10. https://gospodarski.hr/rubrike/medun-ili-med-medljikovac/ (pristupljeno 02. 08. 2019)
11. https://hr.wikipedia.org/wiki/Med#Kemijski_sastav_meda (pristupljeno 05. 08. 2019)
12. https://en.wikipedia.org/wiki/Honey#Physical_and_chemical_properties (pristupljeno 05. 08. 2019)
13. K. Batinić, M. Palinić, *Priručnik o medu*, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru, Mostar, 2014, str. 35.
14. https://www.pcelarstvo.hr/index.php/radovi/pcelarska-radionica/90-kristalizacija-meda (pristupljeno 05. 08. 2019)
15. A. Poljanec, *Kemijska analiza bagremovog i šumskog meda*, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017, str. 11-14.

16. http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/ljekovita-svojstva-meda (pristupljeno 05. 08. 2019)
17. M. D. Mandal, S. Mandal, *Asian Pac J Trop Biomed*. **1** (2011) 154-160.
18. I. Gobin, D. Vučković, D. Lušić, *Medicina fluminensis*, **50** (2014) 150-157.
19. https://www.centarzdravlja.hr/hrana-i-zdravlje/zdrava-prehrana/sto-su-antioksidansi/ (pristupljeno 10. 08. 2019)
20. https://radovanpetrovic.com/antioksidacijska-svojstva-meda/ (pristupljeno 10. 08. 2019)
21. C. E. Manyi-Loh, R. N. Ndip, A. M. Clarke, *Int J Mol Sci.* **12** (2011) 9514–9532
22. N. C. Da Costa, S. Eri, *Identification of Aroma Chemicals,* in: D. J. Rowe (Ed.), *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, pp. 20-25.
23. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, 2011, str. 123-126.
24. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 654-655.
25. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike* (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
26. http://m.hr.alwsci.com/info/whats-gas-chromatography-mass-23953743.html (pristupljeno 15. 08. 2019)
27. https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/gas-chromatography-mass-spectrometry (pristupljeno 15. 08. 2019)
28. https://www.plantea.com.hr/raseljka/ (pristupljeno 15. 08. 2019)