

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Uroš M. Gašić

**FITOHEMIJSKI MARKERI
BOTANIČKOG I GEOGRAFSKOG
POREKLA MEDA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Uroš M. Gašić

**PHYTOCHEMICALS AS MARKERS OF
BOTANICAL AND GEOGRAPHICAL
ORIGIN OF HONEY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Mentor:

dr **Živoslav Tešić**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr **Dušanka Milojković-Opsenica**,

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr **Danijela Mišić**, viši naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja

„Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

U Beogradu, _____2017.

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Temu ove teze predložio je mentor dr Živoslav Tešić, redovni profesor, koji je i rukovodio radom. Želim da mu se i ovom prilikom najiskrenije zahvalim na svestranoj pomoći koju mi je pružao tokom izrade i pisanja ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem dr Dušanki Milojković-Opsenici, redovnom profesoru, na pokazanom interesovanju, korisnim savetima i svesrdnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Takođe želim da se zahvalim dr Danijeli Mišić, višem naučnom saradniku, na svesrdnoj pomoći pri izradi doktorske disertacije, kao i na korisnim sugestijama prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći i podršci tokom izrade ove teze.

Posebno se zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima na svemu što su učinili i što za mene čine.

Na kraju, ali ne najmanje važno, veliko HVALA mojoj supruzi Ivani.

Fitohemijski markeri botaničkog i geografskog porekla meda

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je određivanje polifenolnog i šećernog profila meda i njihove veze sa botaničkim i geografskim poreklom. Postoji veliki broj eksperimentalnih metoda kombinovanih sa hemometrijskim tehnikama, već opisanih u literaturi, koje se bave utvrđivanjem autentičnosti meda, odnosno njegovog botaničkog i geografskog porekla analizom specifičnih fitohemikalija. Pronalaženje hemijskih biomarkera, odnosno fitohemikalija karakterističnih za pojedine vrste meda je predmet interesovanja značajnog broja istraživača. U literaturi su kao potencijalni biomarkeri botaničkog i geografskog porekla meda opisani niži šećeri i njihovi karakteristični odnosi, aminokiseline, isparljive supstance, minerali, polifenoli i druge supstance. Do sada, kvantitativni sadržaj polifenola i šećera u kombinaciji sa analizom glavnih komponenata nije korišćen za procenu botaničkog i geografskog porekla meda.

U cilju identifikacije polifenolnih jedinjenja u medu korišćena je ultra-visoko efikasna tečna hromatografija sa hibridnim masenim detektorom visoke rezolucije koji kombinuje linarni trap-kvadrupol i orbitrap maseni analizator (*UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*), dok je za kvantifikaciju polifenola korišćen UHPLC sa ultravioletnim detektorom sa više dioda (DAD) i masenim detektorom sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (*QQQ, triple quadrupol, UHPLC-DAD MS/MS*). Profil šećera određen je visoko-efikasnom anjonskom hromatografijom sa elektrohemijom detekcijom (*HPAEC-PAD*). Tečno-masena hromatografija se pokazala kao brza i efikasna metoda za određivanje velikog broja polifenola u medu, dok je jonska hromatografija bila veoma pogodna metoda za određivanje šećernog profila meda.

Odabrane su dve botaničke vrste meda: lipov med sa dva lokaliteta (Fruška Gora i Istočna Srbija) i med od žalfije (kadulje) sa područja Hrvatske (Primorsko-goranska regija). Kvantitativni podaci (sadržaj polifenola i šećera) dobijeni analizom ovih medova upotrebljeni su za utvrđivanje veze između određenih hemijskih karakteristika meda i njegovog botaničkog, odnosno geografskog porekla. Metoda multivarijantne hemometrijske analize, analiza glavnih komponenata (*Principal component analysis, PCA*), primenjena je za klasifikaciju uzoraka meda i identifikaciju najznačajnijih faktora odgovornih za pripadnost datoj grupi, odnosno identifikaciju potencijalnih biomarkera

porekla meda. Kao parametri koji definišu geografsko poreklo meda lipa sa Fruške gore identifikovani su šećeri fruktoza, maltoza, maltotrioza, melezitosa i gentobioza sa turanozom, ali i flavonoidi luteolin i galangin. Geografsko poreklo meda lipa iz Istočne Srbije definisano je jedinstvenim sadržajem flavonoida naringina i naringenina, šećera izomaltotrioze i trehaloze, kao i abscisinske kiseline. Viši sadržaj bora i kalijuma, kao i turanoze i kampferola mogu biti predloženi kao markeri za potvrdu autentičnosti i botaničkog porekla monofloralnog meda od žalfije.

Razvoj pouzdanih analitičkih procedura za procenu autentičnosti, sistematsku karakterizaciju i klasifikaciju meda, kao i drugih pčelinjih proizvoda, je izuzetno aktuelna oblast hemije hrane. S obzirom da med sa područja Srbije i Hrvatske do sada nije detaljno i sistematski ispitivan, rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su od posebnog značaja za uspostavljanje standarda kvaliteta meda iz regiona i njegov plasman na domaćem i evropskom tržištu. Naučni cilj ove disertacije bio je određivanje botaničkog i geografskog porekla meda kombinacijom eksperimentalnih podataka dobijenih tečno-masenom i jonskom hromatografijom sa metodama multivarijantne analize. Analiza glavnih komponenata je upotrebljena za utvrđivanje razlika između medova koji potiču od različitih biljaka (botaničko poreklo) ili sa drugih lokaliteta (geografsko poreklo).

Ključne reči: med; polifenoli; šećeri; LC-MS; HPAEC-PAD; PCA; botaničko poreklo; geografsko poreklo.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Phytochemicals as Markers of Botanical and Geographical Origin of Honey

The research topic of this doctoral thesis was determination of polyphenolic and sugar profiles of honey and their relations with its botanical and geographical origin. There are a large number of experimental methods combined with multivariate analysis techniques, already described in the literature, engaged in determining the authenticity of honey, its botanical and geographic origin by analyzing specific phytochemical constituents. Finding phytochemicals characteristic for particular species of honey is the subject of interest of a significant number of researchers. Potential biomarkers of botanical and geographical origin of honey can be sugars, amino acids, volatiles, minerals, antioxidants and others, as well as their characteristic relations. Until now, the quantitative content of polyphenols and sugars combined with principal component analysis was not used to estimate the botanical and geographical origin of honey.

Identification of the polyphenolic compounds from honey was achieved using ultra-high performance liquid chromatography coupled with a hybrid mass spectrometer which consists of a linear ion trap and an Orbitrap mass analyzer (UHPLC-LTQ Orbitrap XL), while the quantification of the them was done by UHPLC with DAD (doide array detection) and triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-DAD MS/MS) detection. Sugar profile was determined by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Liquid chromatography-mass spectrometry technique are proved to be a quick and efficient method for the determination of a large number of polyphenols in honey, while anion exchange chromatography was very suitable method for the determination of the sugars in honey. In order to isolate polyphenols from honey samples solid phase extraction (SPE) was used. Analysis of individual sugar was performed from aqueous solution of honey sample.

For this invastigation, two botanical varieties of honey were selected: linden honey from two locations (Fruška Gora and Eastern Serbia) and sage honey from Croatia (Primorsko-goranska region). Quantitative data (polyphenols and sugars) obtained by the analysis of these honeys were used to establish the relationship between certain chemical properties of honey and its botanical or geographical origin. The

method of multivariate chemometric analysis, principal component analysis (PCA) was applied for classifying the honey samples and identification of the most important factors responsible for belonging to a given group, and identification of potential biomarkers of origin of honey. Fructose, maltose, maltotriose, melezitose, gentobiose with turanose, and the flavonoids luteolin and galangin were identified as parameters that define the geographical origin of the linden honey from Fruška Gora Mountain. The geographical origin of linden honey from the region of East Serbia was defined by the unique content of flavonoids naringin and naringenin, sugars isomaltotriose and trehalose, as well as *cis*, *trans*-abscisic acid. The higher contents of boron and potassium, as well as turanose and kaempferol, may be proposed as markers for the authenticity and the botanical origin of unifloral sage (*Salvia officinalis* L) honey.

The development of reliable analytical procedures for assessing the authenticity, systematic characterization and classification of honey and other bee products, is very topical area of food chemistry. The Serbian and Croatian honeys have not been systematically studied in detail and the results obtained in the framework of this doctoral thesis are of particular importance for the establishment of quality standards for honey in the region and its placement on the domestic and European markets. The scientific objective of this thesis was determination of botanical and geographical origin of honey with combination of experimental data obtained by liquid-mass and ion chromatography methods and methods of multivariate analysis. Principal component analysis, a useful multivariate analysis technique, was used to establish differences between honeys originating from different plants (botanical origin), or from different places (geographical origin).

Keywords: honey; polyphenols; sugars; LC-MS; HPAEC-PAD; PCA; botanical origin; geographical origin.

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

UDC Number: 543

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Definicija i vrste meda	3
2.2. Hemijski sastav i analitičke metode za određivanje botaničkog i geografskog porekla meda	5
2.2.1. Šećeri	9
2.2.2. Proteini i aminokiseline	11
2.2.3. Aktivnost enzima	14
2.2.4. Fenolna jedinjenja	15
2.2.4.1. Flavonoidi	23
2.2.4.2. Fenolne kiseline	26
2.2.5. Organske kiseline	28
2.2.5.1. Abscisinska kiselina	28
2.2.6. Fermentacioni proizvodi	29
2.2.7. Isparljiva jedinjenja	29
2.2.8. Minerali i elementi u tragovima	31
2.2.9. Stabilni izotopi	32
2.2.10. Polenska analiza	33
3. EKSPERIMENTALNI DEO	35
3.1. Uzorci meda	35
3.2. Reagensi i standardi	35
3.3. Priprema standardnih rastvora	38
3.4. Ekstrakcija polifenola iz uzorka meda	38
3.5. Tečna hromatografija - masena spektrometrija (LC-MS)	39
3.5.1. Određivanje polifenolnog profila	39
3.5.2. Kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja	40
3.6. Analiza šećera u medu primenom visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD)	41
3.6.1. Priprema uzoraka	41
3.6.2. Jonska hromatografija	41
3.7. Određivanje ukupnih fenola (TPC) i antioksidativne aktivnosti (RSA)	43
3.8. ICP-EOS analiza minerala u uzorcima meda	44

3.9. Statistička obrada rezultata	44
4. NAŠI RADOVI	45
4.1. Melizopalinološka analiza	45
4.2. Analiza polifenola	46
4.2.1. Polifenolni profil lipovog meda i nektara	46
4.2.2. Polifenolni profil meda od žalfije	53
4.3. Analiza šećera	60
4.3.1. Šećerni profil nektara i meda lipe	65
4.3.2. Šećerni profil meda od žalfije	69
4.4. Analiza glavnih komponenata	71
4.4.1. Procena geografskog porekla meda	71
4.4.2. Procena botaničkog porekla meda	73
5. ZAKLJUČAK	75
6. LITERATURA	77
7. PRILOG	102
8. BIOGRAFIJA	109

1. UVOD

U poslednje vreme, botaničko i geografsko poreklo su važna tema kada se govori o kvalitetu i bezbednosti hrane. Ova studija teza se fokusira na korišćenje hemijskih parametara za određivanje botaničkog i geografskog porekla meda.

Veliki broj cvetnica sintetiše različite fitohemikalije koje pokazuju antioksidativnu aktivnost. Prilikom prikupljanja nektara od strane pčela, bioaktivne komponente, poreklom iz biljaka, prenose se u med. U hemijskom smislu, med je presićen vodeni rastvor šećera, čiji su najzastupljeniji sastojci ugljeni hidrati, i to najvećim delom fruktoza i glukoza (više od 60 %), zatim sledi voda (oko 17 %), a ostatak čine proteini (uključujući i enzime), minerali, vitamini, organske kiseline, polifenolna jedinjenja (flavonoidi i fenolne kiseline), neka isparljiva jedinjenja, voskovi i druge fitohemikalije.

Postoji veliki broj eksperimentalnih metoda kombinovanih sa tehnikama multivarijantne analize, već opisanih u literaturi, koje se bave ispitivanjem kvaliteta i utvrđivanjem autentičnosti meda, odnosno određivanjem botaničkog i geografskog porekla meda analizom specifičnih fitohemikalija. Pronalaženje hemijskih markera, odnosno fitohemikalija karakterističnih za pojedine vrste meda, je predmet interesovanja značajnog broja istraživača u svetu. U literaturi su kao potencijalni markeri botaničkog i geografskog porekla meda opisani niži šećeri i njihovi karakteristični odnosi, aminokiseline, isparljive supstance, minerali, polifenoli (Wang i Qing, 2011).

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka uključeni u odbrambeni mehanizam biljke. U med, pre svega, dospevaju preko nektara, ali i preko propolisa i polena. Samim tim, njihov sadržaj u medu u mnogome zavisi od botaničke vrste biljaka sa kojih su pčele prikupile nektar. Udeo i međusobni odnosi pojedinih šećera u medu su direktno povezani sa vrstom biljaka od kojih potiče nektar. Sadržaj polifenola i šećera u medu takođe može da varira u zavisnosti od klimatskih uslova geografskog regiona u kojem su pčele proizvele med. Analizom hemijskog sastava uzoraka meda, a naročito pomenutih jedinjenja, mogu se dobiti veoma korisne informacije o botaničkom i geografskom poreklu meda. Zbog toga je razvoj pouzdanih analitičkih procedura za

procenu autentičnosti, sistematsku karakterizaciju i klasifikaciju meda, kao i drugih pčelinjih proizvoda, izuzetno aktuelna oblast hemije hrane. S obzirom da med sa područja Srbije i Hrvatske do sada nije detaljno i sistematski ispitivan, rezultati istraživanja u okviru ove teze su od posebnog značaja za uspostavljanje standarda kvaliteta meda iz regiona i njegov plasman na domaćem i evropskom tržištu.

U ovoj disertaciji, polifenolna jedinjenja u medu iz Srbije i Hrvatske su identifikovana primenom ultra-efikasne tečne hromatografije sa masenim detektorom visoke rezolucije (*UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*), dok je za kvantifikaciju polifenola korišćena ultra-efikasna tečna hromatografija sa DAD i masenim detektorom sa tri analizatora (*UHPLC-DAD MS/MS*). Šećerni profil je određen visoko-efikasnom jonskom hromatografijom sa elektrohemijom detekcijom (*HPAEC-PAD*). Analiza glavnih komponenata (*Principal component analysis, PCA*), veoma korisna tehnika multivarijantne analize, upotrebljena je za utvrđivanje razlika između medova koji potiču od različitih biljaka (botaničko poreklo) ili sa različitih lokaliteta (geografsko poreklo).

Naučni cilj ove doktorske disertacije bio je određivanje botaničkog i geografskog porekla monofloralnog meda od žalfije i lipe poreklom iz Srbije i Hrvatske, kombinacijom eksperimentalnih podataka dobijenih tečno-masenom i jonskom hromatografijom sa metodama multivarijantne analize.

2. OPŠTI DEO

2.1. Definicija i vrste meda

Med je prirodna slatka supstanca koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*), kako iz nektara cvetova medonosnih biljaka, tako i iz izlučevina sa delova biljaka ili iz ekskreta insekata koji sišu sokove biljaka. Takvu supstancu pčele transformišu kombinujući je sa vlastitim specifičnim supstancama i potom je skladište u ćelije saća da sazri (Codex Alimentarius Commission (2001); Wang i Qing, 2011).

Med predstavlja presićen vodeni rastvor šećera, te su najzastupljeniji sastojci meda ugljeni hidrati. Druga po zastupljenosti je voda (prosečno oko 17 %), i ona zajedno sa svim šećerima čini više od 99 % meda. Ostatak čine proteini (uključujući i enzime), mineralni, vitamini, organske kiseline, fenolna jedinjenja (flavonoidi i fenolne kiseline), neka isparljiva jedinjenja, voskovi i razni derivati hlorofila. (Tewari i Irudayaraj, 2004). Iako je udeo ovih supstanci u medu veoma mali (< 1 %), one su zasigurno odgovorne kako za senzorska tako i za specifična svojstva meda (Singhal, 1997). Neke od ovih supstanci u med dodaju pčele, neke vode poreklo od medonosne biljke, a neke nastaju u toku zrenja meda u saću (Burlando i Cornara, 2013). Različite vrste meda, kao i medovi poreklom od pojedinačnih biljnih vrsta (tzv. monofloralni/sortni medovi), razlikuju se po svom sastavu zavisno od botaničkog i geografskog porekla, klimatskih uslova, vrste pčela, kao i sposobnosti samog pčelara, načina dorade i metodologije skladištenja meda (Wang i Qing, 2011).

Prema načinu proizvodnje i obliku u kojem se stavlja u promet razlikuju se (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015):

- med u saću - stavlja se u promet u prirodnom, zatvorenom saću,
- tečni med - dobijen isticanjem (ceđenjem) iz saća, bez ikakve mehaničke obrade,
- vrcani med - dobijen vrcanjem saća u centrifugi,
- presovani med - dobijen hladnim gnječenjem saća,
- topljeni med - dobijen zagrevanjem (ali ne na više od 40 °C) drobljenog saća, i
- kremasti med - dobijen kontrolisanom kristalizacijom meda.

Med se može razvrstati u grupe po različitim kriterijumima, pa tako postoje: sortni med (monofloralni), cvetni (livadski) med (polifloralni), medljikovac (šumski) i „pekarski“ med (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).

Sortni (monofloralni) **med** je proizvod koji medonosne pčele proizvode od nektara cvetova određene medonosne biljne vrste. Svaka pojedinačna vrsta sortnog meda ima karakterističan ukus i miris izvorne biljke. Monofloralni med može se imenovati prema određenoj biljnoj vrsti, ako u nerastvorljivom delu sadrži najmanje 45 % polenovih zrna te biljne vrste. Postoje i izuzeci od ovog pravila koji važe za pojedine biljne vrste; najmanji procenat polenovih zrna tih biljnih vrsta u nerastvorljivom medu dat je u **Tabeli 1** (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).

Tabela 1. Najmanji dozvoljeni udeo polenovih zrna u nerastvorljivom monofloralnom medu za pojedine biljke.

Biljna vrsta	Latinski naziv	Udeo polenovih zrna u nerastvorljivom delu
Pitomi kesten	<i>Castanea sativa</i> Mill.	85 %
Uljana repica	<i>Brassica napus</i> L.	60 %
Facelija	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	60 %
Lipa	<i>Tilia spp.</i>	25 % (10 %) ^a
Bagrem	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	20 %
Metvica ili nana	<i>Mentha spp.</i>	20 %
Vresak	<i>Calluna vulgaris</i> L.	20 %
Primorski	<i>Satureja montana</i> L.	20 %
Maslačak	<i>Taraxacum officinale</i>	20 %
Ruzmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	20 %
Žalfija ili	<i>Salvia officinalis</i> L.	15 % (10 %) ^a
Planika ili	<i>Arbutus unedo</i> L.	10 %
Agrumi	<i>Citrus spp.</i>	10 % (5 %) ^a
Lavanda	<i>Lavandula spp.</i>	10 % (5 %) ^a
Suncokret	<i>Helianthus annuus</i> L.	40 %
Lucerka ili	<i>Medicago sativa</i> L.	30 %

^aUz karakteristična senzorska svojstva meda za određenu vrstu biljaka (miris, ukus, boja).

Cvetni (livadski) med proizvode pčele od nektara medonosnih cvetova različitih vrsta livadskih biljaka, i ova vrsta meda se koristi u narodnoj medicini od davnina kao univerzalni lek. Blagotvorno deluje na krvne sudove, preporučuje se uzimanje kod stomačnih tegoba i pada imuniteta (Ajibola, 2015).

Medljikovac (tamni šumski med, medun) je jedini med koji ne potiče od nektara. Pčele ga proizvode od mediljke, slatkog soka koji luče zalisci i lišće hrasta, klena, bora i drugih četinara ili od mediljke koju luče biljne vaši. Ovaj tip meda kristališe već u saću. Vrlo često je u upotrebi u narodnoj medicini usled svojstva da popravlja krvnu sliku, a naročito utiče na sadržaj gvožđa. Uzima se u kombinaciji sa raznim voćnim sokovima. Najznačajnije vrste medljikovca su: jelov, smrekov, hrastov i medljikovac od mediljke medećeg cvrčka (Persano Oddo, 2004).

Pekarski med je med izmenjenog kvaliteta koji se koristi u industriji ili kao sastojak druge hrane koja se dalje prerađuje i može da ima nesvojstven ukus ili miris, u stanju vrenja, prevreo ili pregrejan (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).

Pogrešno označavanje i krivotvorenje meda postali su, nažalost, svetski problem. Falsifikovanje se obično vrši putem razblaživanja vodom i šećerom ili nekim šećernim sirupom (npr. kukuruzni ili visoko-fruktozni sirup), dok krivotvorenje uključuje prihranu pčela šećerim sirupom i veštačkim medom i pogrešno označavanje botaničkog i(ili) geografskog porekla. Pitanje autentičnosti hrane je jedno od najvažnijih pitanja bezbednosti i kontrole kvaliteta hrane. Regulatornim organima, prerađivačima hrane, trgovcima i potrošačima je veoma bitno da imaju uvid u poreklo i kvalitet meda. (Cordella, 2002; Lees, 2003; Sivakesava i Irudayaraj, 2001a i 2001b; Tewari i Irudayaraj, 2004).

2.1. Hemijski sastav i analitičke metode za određivanje botaničkog i geografskog porekla meda

Mnoge supstance koje se nalaze u medu mogu koristiti za diskriminaciju njegovog geografskog i(ili) botaničkog porekla. Na primer, neki istraživači su, koristeći isparljive i poluisparljive hemikalije prisutne u monofloralnom medu, predložili markere njegovog botaničkog porekla (Anklam, 1998; Benedetti, 2004; Odeh, 2007).

Enzimi se takođe koriste za označavanje botaničkog porekla meda (Vorlová, 2002). Ugljeni hidrati (šećeri) predstavljaju glavne komponente meda, a u literaturi postoji mnogo radova u kojima se šećeri koriste kao indikatori autentičnosti meda (Daniel-Kelly, 2004; Irudayaraj, 2003; Sivakesava i Irudayaraj, 2001a i 2001b). Analiza fermentacionih proizvoda meda, kao što su glicerol i etanol, može dati neke grube informacije o uslovima čuvanja meda, ali se ne mogu koristiti za razlikovanje botaničkog i (ili) geografskog porekla meda (Anklam, 1998; Huidobro, 1993 i 1994). Analiza minerala i mikroelemenata u medu može biti pogodna za predikciju geografskog porekla, zbog činjenice da su ove vrednosti veoma povezane sa sadržajem minerala i mikroelemenata u zemljištu na kojem rastu medonosne biljke, kao i zagađenjem životne sredine (Anklam, 1998; Rodriguez-Otero, 1994 i 1995). Medovi različitog botaničkog i geografskog porekla mogu sadržati razne organske kiseline i stoga detekcija profila organskih kiselina može biti korisna pri dobijanju informacija o botaničkom i geografskom izvoru meda (Wilkins, 1995). Pažljiva procena profila fenolnih kiselina, fenolnih estara i nekih aromatičnih jedinjenja može biti dobar pokazatelj botaničkog porekla meda (Anklam, 1998). Različite aminokiseline u medu su korišćene za predikciju njegovog geografskog porekla (Davies, 1975 i 1976).

Važno je napomenuti da gore navedene metode imaju nedostatke pri proceni geografskog porekla meda. Na primer, izolovanje isparljivih jedinjenja u tragovima iz kompleksne smeše kao što med je veoma teško, i ona nisu korisna za razlikovanje njegovog geografskog porekla, ali se mogu koristiti za procenu botaničkog porekla. Šećeri u medu su pogodni za detekciju ilegalne prakse u proizvodnji, ali nema mnogo naučnih radova u kojima se oni koriste za procenu botaničkog ili geografskog porekla. Enzimi i fermentacioni proizvodi mogu dati samo neke informacije o preradi i skladištenju meda, ali nisu pogodni za procenu njegovog geografskog porekla. Analiza minerala i mikroelemenata uglavnom daje informacije o kontaminiranosti oblasti u kojoj je med proizveden. Profili organskih i aminokiselina mogu dati neke indirektno informacije o poreklu meda, dok se proteini mogu koristiti za procenu botaničkog i geografskog porekla meda (Anklam, 1998; Rodriguez-Otero, 1994 i 1995; Won, 2008).

U **Tabeli 2** je prikazan pregled literature koji ukazuje na karakteristične marker-supstance i analitičke tehnike koje se koriste u klasifikaciji meda prema geografskom i botaničkom poreklu.

Tabela 2. Analitičke tehnike i marker-supstance najčešće korišćene za klasifikaciju meda po geografskom i botaničkom poreklu.

Analitičke metode	Hemijski markeri	Reference
Tečna hromatografija, infracrvena spektroskopija	<i>Šećeri</i>	Irudayaraj, 2003; Daniel-Kelly, 2004
Elektroforeza, masena spektrometrija	<i>Proteini</i>	Marshall i Williams, 1987; Won, 2008; Wang, 2009
Tečna i gasna hromatografija (sa MS detekcijom)	<i>Aminokiseline</i>	Pirini i Conte, 1992; Pawlowska i Armstrong, 1994
Analiza dijastaze	<i>Aktivnost enzima</i>	Rendleman, 2003
Tečna hromatografija (sa MS detekcijom), kapilarna elektroforeza	<i>Flavonoidi</i>	Amiot, 1989; Ferreres, 1994a i 1994b; Delgado, 1994
Tankoslojna, gasna i tečna hromatografija	<i>Fenolne kiseline</i>	Yao, 2003; Gómez-Caravaca, 2006
Tečna i gasna hromatografija (sa MS detekcijom), enzimski esej	<i>Organske kiseline</i>	Wilkins, 1995; Mato, 2006 i 2006b
Gasna hromatografija, enzimski esej	<i>Fermentacioni proizvodi</i>	Huidobro, 1993
Ggasna hromatografija (sa MS detekcijom)	<i>Isparljiva jedinjenja</i>	Bonaga i Giumanini, 1986; Overton i Manura, 1994
Induktivno spregnuta plazma - atomskom emisiona spektroskopija (ili masena spektrometrija)	<i>Minerali i metali u tragovima</i>	Gonzalez-Miret, 2005; Nalda, 2005
Analiza odnosa stabilnih izotopa (H, C, N i S)	<i>Stabilni izotopi</i>	Anklam, 1998; Ghidini, 2006; Schellenberg, 2010
Polenska analiza	<i>Polen</i>	von der Ohe, 2004; Sesta, 2006

Pouzđano određivanje botaničkog i geografskog porekla meda može se postići detaljnim ispitivanjem organoleptičkih osobina, polenskom analizom i analizom fizičko-hemijskih parametara od strane stručnjaka (Bogdanov, 2004; Persano Oddo i Bogdanov, 2004). Sa druge strane, neki naučnici smatraju da polenska analiza ima dosta nedostataka kod određivanja geografskog porekla i da je pogodna samo za određivanje botaničkog porekla meda, tako da je veoma bitno razviti nove analitičke metode koje bi se koristile u obe svrhe (Molan, 1998).

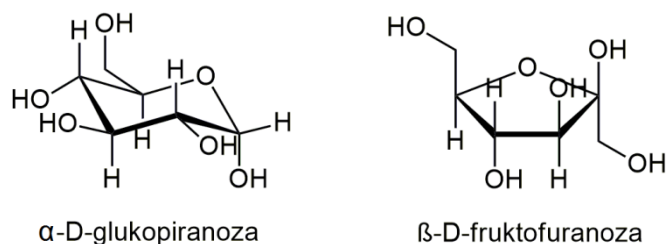
Poslednjih godina pažnja mnogih naučnika je okrenuta razvijanju novih analitičkih metoda koje se u kombinaciji sa multivarijantnom analizom podataka mogu koristiti za procenu botaničkog porekla meda. Neke od tih analitičkih metoda su: karakterizacija osnovnih fizičko-hemijskih parametara (Mateo i Bosch-Reig, 1998; Devillers, 2004; Lazarević, 2012), analiza sadržaja minerala (Nalda, 2005), sastav ugljenih hidrata (Terrab, 2002; Cordella, 2003), sastav aminokiselina (Cotte, 2004; Kečkeš, 2013a), gasna hromatografija - masena spektrometrija (Radović, 2001a i 2001b), tečna hromatografija - masena spektrometrija (Kečkeš, 2013b; Gašić, 2014a, Gašić, 2015), ramanska spektroskopija (Goodacre, 2002) i infracrvena spektroskopija (Davies, 2002). Međutim, ove metode omogućuju jasnu diskriminaciju botaničkog porekla za nekoliko tipova monofloralnih medova, ali ne i polifloralnih. Potpuna identifikacija botaničkog porekla meda obično zahteva kombinaciju nekoliko analitičkih metoda.

Analiza polena je veoma ekonomičan način za razlikovanje meda po botaničkom poreklu, jer ne zahteva skupe instrumente i reagense, ali zahteva stručnjaka za razlikovanje oblika i vrsta polenovih zrna. Polenski spektar meda bi trebao da se podudara sa polenskim spektrom biljaka sa lokaliteta na kojem se med prikuplja, tako da polen u nekim slučajevima može poslužiti i za definisanje geografskog porekla meda. Međutim, kada se analiziraju uzorci sa područja manjih geografskih regiona, sama polenska analiza često ne može da zadovolji standarde kvaliteta (Wang i Qing, 2011). Usled toga je neophodno koristiti veći broj parametara i tehnika za procenu geografskog porekla meda: aminokiselinski sastav (Davies, 1975; Gilbert, 1981), mineralni sastav (Latorre, 1999, 2000), ramanska spektroskopija meda (Goodacre, 2002), sadržaj šećera i mineralnih komponenata u kombinaciji sa fizičko-hemijskim parametrima (Sanz, 1995; Gomez Barez, 2000; Gonzalez Paramas, 2000). U većini

navedenih studija istraživanja su vršena na ograničenom broju uzoraka ili na uzorcima iz malih geografskih regiona.

2.2.1. Šećeri

Šećeri su glavni sastojci meda i čine više od 95 % suve supstance meda (Bogdanov, 2008). Fruktosa je dominantni šećer u gotovo svim vrstama meda i zajedno sa glukozom čine oko 60 % meda (**Slika 1**). Veći sadržaj glukoze u odnosu na fruktozu je pronađen samo u medu od uljane repice (*Brassica napus*), maslačka (*Taraxacum officinale*) i od biljke *Trichostema lanceolatum* (Cavia, 2002). Šećeri najzastupljeniji u medu prikazani su u **Tabeli 3** (Doner, 1977).



Slika 1. Glukoza i fruktoza.

Tabela 3. Pregled šećera prisutnih u medu.

Monosaharidi	Disaharidi	Polisaharidi
Glukoza	Saharoza	Erloza
Fruktoza	Maltoza	Panoza
	Izomaltoza	Maltotrioza
	Turanoza	Rafinoza
	Gentobioza	Izomaltotrioza
	Trehaloza	Izomaltopentoza

Med sadrži proste šećere u visokom procentu i zato se može brzo resorbovati u organizmu. Međusobni odnosi raznih šećera u medu zavise od odnosa šećera u cvetnom

nektaru, ali i od enzima invertaze koji katalizuje reakciju razgradnje saharoze na fruktozu i glukozu. Postoje razlike u sastavu šećera u medljikovcu i cvetnom medu. Medljikovac obično ima veći sadržaj oligosaharida, uglavnom trisaharida, melezitose i rafinoze (Wang i Qing, 2011).

Odnosi fruktoze i glukoze, maltoze i izomaltoze, saharoze i turanoze, kao i maltoze i turanoze mogu se koristiti kao markeri za procenu mogućeg falsifikovanja meda glukoznim ili visokofruktoznim sirupom (Horváth i Molnár-Perl, 1997), a takođe i kao markeri za identifikaciju i klasifikaciju monofloralnih medova (Low, 1988; Persano Oddo, 1995; Persano Oddo i Piro, 2004). Analiza sadržaja šećera u medu metodom jonske hromatografije se pokazala kao veoma pogodna za razlikovanje monofloralnih od polifloralnih uzoraka meda (Cordella, 2003).

Maltoza i maltotrioza se mogu koristiti kao markeri za detekciju ilegalne prakse u proizvodnji meda, jer je njihova koncentracija u medu veoma niska, a u sirupima kojima se falsifikuje med visoka. Sadržaj maltoze u prirodnim medovima je, generalno, manji od 30 mg/g (Joshi, 2000; Cotte, 2003), ali u nekim vrstama meda može biti do 50 mg/g (Costa, 1999; Devillers, 2004).

Sadržaj šećera u medu se može odrediti na nekoliko načina: raznim elektrohemijским metodama i metodama protočne analize (White, 1980; Kumar, 1988, Gritzapis i Timotheou-Potamia, 1989; Peris-Tortajada, 1992), tankoslojnom hromatografijom (Patzsch, 1988; Pukl i Prosek, 1990), gasnom hromatografijom (Mateo, 1987; Low and Sporns, 1988), jonskom hromatografijom sa pulsno-amperometrijskom detekcijom (Gašić, 2014b i 2015), kao i tečnom hromatografijom sa detektorom koji meri indeks refrakcije (Kamal i Klein, 2011).

Jedna grupa naučnika iz Italije je analizirala šećere u autentičnim uzorcima meda pomoću gasne hromatografije. Otkrili su da odnos maltoze i izomaltoze, u ovom slučaju, nije pogodan za detekciju falsifikata meda šećernim sirupom, dok sadržaj saharoze jeste. Druga grupa je koristila tečnu hromatografiju za razlikovanje autentičnih medova od medova koji su proizvedeni veštačkom prihranom pčela i medova sa dodatkom saharoze (Wang i Qing, 2011). Važno je napomenuti da se sadržaj saharoze smanjuje tokom skladištenja meda zbog prisustva enzima invertaze (White, 1992). Jonoimenjivačka hromatografija je pogodna za analizu oligosaharida u medu (Swallow i

Low, 1994). Invertni šećerni sirup i visoko-fruktozni kukuruzni sirup su složene mešavine oligosaharida i obično se proizvode hemijskim ili enzimskim procesima. Sadržaj oligosaharida može koristiti kao indikator nezakonitog dodavanja sirupa u med. Sadržaj oligosaharida u više od 90 uzoraka britanskih medova određen je korišćenjem jonoimenjivačke hromatografije sa pulsno-amperometrijskom detekcijom (Goodall, 1995). Spektroskopska metoda, FTIR, u kombinaciji sa metodama statističke analize, može se takođe koristiti za određivanje sadržaja šećera u medu, kao i za detekciju falsifikovanja meda nekim šećernim sirupom (Wang, 2010a).

Sadržaj šećera može poslužiti kao parameter za određivanje botaničkog porekla meda. Postoje značajne razlike između šećernog profila cvetnog meda i medljikovca, Meedljikovci sadrže veći sadržaj oligosaharida, uglavnom trisaharida melezitose i rafinoze. Tako su Cotte i saradnici ispitivali sedam botaničkih vrsta, tačnije 280 uzoraka monofloralnog meda, i pokušali su da na osnovu sadržaja šećera odrede botaničko poreklo nekih drugih komercijalnih medova. Primenom statističke analize jelov medljikovac se potpuno odvojio od ostalih ispitivanih vrsta ispitivanih medova (bagrem, kesten, uljana repica, lavanda, lipa i suncokret) (Cotte, 2004). *Metcalfa pruinosa* medljikovac proizveden u Italiji razlikuje se od drugih medljikovaca, jer sadrži veću količinu maltotrioza i dekstrina (Fiori, 2000).

Prema „Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela“ (2015) količina grukoze i fruktoze ne sme biti manja od 60 g/100g u cvetnom medu, dok u medljikovcu ovaj zbir ne sme biti manji od 45 g/100 g meda. U istom pravilniku propisana je i maksimalna količina saharoze za sve vrste cvetnih medova i iznosi 5 g/100 g meda. Postoje i izuzeci od ovog pravila, pa tako u medu od bagrema, lucerke, vreska, slatkovine (vučja trava), eukaliptusa i agruma sadržaj saharoze može biti i do 10 g/100g, dok je u medu od lavande maksimalna količina saharoze 15 g/100g meda.

2.2.2. Proteini i aminokiseline

Sadržaj proteina u medu je oko 0,2 %. Proteini u medu su životinjskog (od pčela) i biljnog (iz polena) porekla. Neki naučnici smatraju da glavne količine proteina dospevaju u med iz pljuvačnih žlezda pčela prilikom prerade nektara i medljike, dok drugi zastupaju teoriju da je najveći izvor tih supstanci polen, koji je prilično bogat

proteinima (Nazarian, 2010). Iako je udeo ukupnih proteina u medu mali, u tim proteinima se nalazi otprilike 18 esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina čiji sadržaj varira u zavisnosti od biljne vrste (Janiszewska, 2012).

Jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE*) se obično koristi za analizu proteina u medu. U literaturi postoji nekoliko radova objavljenih na temu klasifikacije meda po geografskom i botaničkom poreklu na osnovu tragova proteina (Marshall i Williams, 1987; Ferreres, 1993; Lee, 1998; Baroni, 2002; Won, 2008). *Marshall* i *Williams* su pokazali da u elektroferogramu uzoraka meda različitog botaničkog porekla postoji najmanje 19 proteinskih traka. Pretpostavlja se da su ovi proteini pretežno pčelinjeg a ne cvetnog porekla. *Baroni* i saradnici navode da se polen različitih medonosnih biljaka može razlikovati dvodimenzionalnom elektroforezom, te se zbog toga proteini mogu koristiti kao markeri botaničkog porekla meda (Baroni, 2002). *Maier* i saradnici su pokazali da je upotreba *MALDI TOF MS* (*Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight mass spectrometry*) tehnike brza i pouzdana metoda za klasifikaciju i identifikaciju bakterija i proteina u svrhu kliničke dijagnostike, zaštite životne sredine, kao i za taksonomska istraživanja i kontrola kvaliteta i proizvodnje hrane (Maier, 2006). *Wang* i saradnici su razvili brz i pouzdan način diskriminacije meda po geografskom poreklu korišćenjem *MALDI TOF MS* tehnike *Biotiper* softverom. Proteinski profil se može dobiti za nekoliko sekundi, a spektralni podaci mogu lako biti pretvoreni u proteinski „otisak prsta“ (bar kod) upotrebom *Biotiper* softvera. Ova tehnika zahteva minimalnu pripremu uzorka (Wang, 2009).

Proteinski profil meda se takođe koristi za karakterisanje medova proizvedenih od različitih vrsta pčela. Tako su *Lee* i saradnici primetili da molekulska masa dominantnih proteina meda proizvedenom od strane pčele *Apis cerana* iznosi 56 kDa, dok je molekulska masa dominantnih proteina u medu proizvedenom aktivnošću *Apis mellifera* pčele 59 kDa (Lee, 1998).

Prosečan sadržaj azota u medu je oko 0,04 %, dok sadržaj slobodnih aminokiselina čini oko 1 %. Aminokiselinski profil meda predložen je kao tehnika za određivanje njegovog botaničkog i geografskog porekla (Gilbert, 1981; Davies i Harris, 1982; Anklam, 1998). Polen je glavni izvor aminokiselina u medu. *Davies* i saradnici su

utvrdili da odnos pojedinih aminokiselina u medu varira u zavisnosti od njegovog geografskog i botaničkog porekla (Davies, 1975 i 1976). Prolin je najzastupljeniji i u medu ga mora biti više od 180 mg/kg, a najmanje 66 % od ukupnih slobodnih aminokiselina (najčešće 80 - 90 % od svih aminokiselina). Većinom potiče od pčela i u med dospeva prilikom prerade nektara u med, a njegov procenat je predložen kao jedan od indikatora zrelosti meda. Njegov sadržaj je usko povezan sa sadržajem šećera u medu, kao i sa aktivnošću enzima glukoza-oksidadaze (Flanjak, 2016).

Sadržaj aminokiselina u medu određuje se metodama tečne hromatografije, bez prethodne derivatizacije (Bouseta, 1996; Conte, 1998) ili koje zahtevaju derivatizaciju, najčešće dietil-ethoksimetilen malonom ili fluorenilmetil hloroformatom (Bernal, 2005). Profili slobodnih aminokiselina analizanih gasnom hromatografijom (GC) pokazali su očigledne razlike između uzoraka meda iz Velike Britanije, Argentine, Australije i Kanade (Gilbert, 1981). *Hermosín* i saradnici pokušali su da preko sadržaja aminokiselina u medu odrede njegovo botaničko poreklo i tako su analizom 48 uzoraka monoflornih medova (poreklom sa ukupno 10 botaničkih vrsta) iz 6 različitih geografskih regiona Španije uspeli da izdvoje samo med od lavande i to prema značajno višoj koncentraciji tirozina. Prolin, fenilalanin, tirozin i lizin su bile glavne aminokiseline u 31 uzorku meda koji obuhvata 5 botaničkih vrsta (ruzmarin, eukaliptus, lavanda, majčina dušica i pomorandža), potom su sledili arginin, glutaminska kiselina, histidin i valin (Hermosín, 2003). Brazilski naučnici utvrdili su da med eukaliptusa ima 1245 mg /kg prolina što je više nego u svim ostalim analiziranim vrstama medova (Costa, 1999).

Pawłowska i *Armstrong* (1994) su analizirali sadržaj nekih aminokiselina i njihove enantiomerne odnose u medu pomoću HPLC tehnike. Značajne količine d-leucina i d-fenilalanina i relativno niska koncentracijama d-prolina nađene su u medu različitog botaničkog i geografskog porekla. Istaknuto je da se enantiomerni odnosi aminokiselina mogu koristiti za proveru pravilnog skladištenja, starosti i tehničke obrade meda. *Pirini* i *Konte* (1992) koristili su gasnu hromatografiju za analizu aminokiselina u uzorcima meda različitog botaničkog porekla (bagrem, limun, kesten, rododendron, ruzmarin i limeta), i utvrdili da je prisustvo nekih aminokiselina (arginin, triptofan i cistein) karakteristično za određene tipove meda, ali da jedna aminokiselina

ili grupa aminokiselina ne može biti izabrana kao marker za karakterizaciju pojedinih botaničkih vrsta meda.

Senyuva i saradnici (2009) su odredili sadržaj fenilalanina i tirozina u nekoliko vrsta monofloralnih medova iz različitih regiona. Zaključili su da ove dve aminokiseline i još neki fizičko-hemijski parametri u kombinaciji sa metodama multivarijantne analize mogu biti pogodni za razlikovanje botaničkog porekla ispitivanih medova.

U jednom istraživanju aminokiselinskog sastava i karakterističnih ispaljivih jedinjenja u medu od eukaliptusa (*Eucalyptus spp.*) i lavande (*Lavandula spp.*) pronađen je prolin kao dominantna aminokiselina u medu od eukaliptusa, dok su značajne količine fenilalanina (906-1830 mg/kg) i tirozina (229-382 mg/kg) karakteristične za med lavande. Ovi parametri bili su karakteristični za razdvajanje ove dve vrste meda po botaničkom poreklu (Bouseta, 1996). Za razlikovanje medljikovca i cvetnog meda kao parametar se može koristiti koncentracija aminokiselina kao što su triptofan i glutaminska kiselina, čiji je sadržaj znatno viši u medljikovcu nego u cvetnom medu (Lglesias, 2004).

Sadržaj aminokiselina u 92 uzorka meda (17 botaničkih vrsta iz 4 različita geografska regiona) analiziran je gasnom hromatografijom i u većini uzoraka prolin je bio dominantna aminokiselina, ali pronađene su i značajne količine fenilalanina, asparaginske kiseline, asparagina, glutaminska kiselina i glutamin. Međutim, veće količine serina, tirozina i lizina nađene su u monofloralnom medu od nane. U medu od ruzmarina tirozin je najzastupljeniji, potom slede prolin i fenilalanin. Na osnovu aminokiselinskog sastava, a primenom linearne diskriminantne analize, medovi od majčine dušice i kestena su se grupisali u dva klastera. (Conte, 1998).

2.2.3. Aktivnost enzima

Jedna od karakteristika po kojoj se med razlikuje od ostalih zaslađivača je i prisustvo enzima. Neki od njih vode poreklo od pčele, a neki potiču iz polena ili iz bakterija prisutnih u medu. Enzimski profil meda u velikoj meri varira sa botaničkim poreklom nektara, ali je poznato da α -amilaze i α -glukozidaza uglavnom potiču od medonosne pčele (Low, 1988; Persano Oddo i Piro, 2004, Persano Oddo, 1990 i 1999). Zajedno sa proteinima, enzimi medu oni daju karakteristična svojstva koja se veštačkim

putem ne mogu nadomestiti. Pregled enzima prisutnih u medu prikazan je u **Tabeli 4** (Vorlová, 2002). Enzimska aktivnost meda smanjuje se pregrevanjem meda ili tokom dužeg skladištenja. Stoga, određivanje aktivnosti enzima u cilju razlikovanja meda prema botaničkom poreklu se mora raditi iz svežeg uzorka meda. Aktivnost α , β , i γ -amilaze se obično koristi kao važan parametar kvaliteta meda (Voldrich, 2009).

Tabela 4. Pregled enzima prisutnih u medu.

Naziv enzima	Reakcija koju katalizuje
Dijastaza (α -amilaza)	hidroliza skroba do maltoze
Invertaza	pretvaranje saharoze u invertni šećer glukozu i fruktozu
Glukozaoksidaza	oksiduje glukozu u glukuronsku kiselinu
Kisela fosfataza	hidrolizuje estre fosfatne kiseline
Proteaze	hidrolizuje proteine i polipeptide na kraće peptide
Esteraza	hidrolizuje estarske veze

Merenje aktivnost dijastaze je metoda propisana „Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015 (Republika Srbija)” i koristi se za procenu svežine i termičke obrade meda. Iako prirodan nivo dijastaze varira sa botaničkim poreklom meda, smanjenje aktivnosti dijastaze se ne koristi u svrhu određivanja botaničkog porekla meda, već je bitan pokazatelj kvaliteta meda. Dijastaza uglavnom potiče od pčela, ali i od polena i nektara. Ona razlaže skrob na maltozu. Kada se u prirodan med doda šećerni sirup, smanjuje se aktivnost dijastaze, što se može nadomestiti dodavanjem stranih amilaza (Voldrich, 2009).

2.2.4. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja ili polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka. Predstavljaju jednu od najvažnijih bioaktivnih grupa jedinjenja koja se javljaju u biljkama. Flavonoidi i fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetine kiseline) predstavljaju najvažnije klase polifenola (Anklam, 1998). U med, pre svega, dospevaju posredstvom nektara, ali i preko propolisa i polena. Med je bogat fenolnim jedinjenjima koja deluju kao prirodni

antioksidansi i postaje sve popularniji u ishrani zbog svoje potencijalne uloge u lečenju raznih bolesti, kao i samom doprinosu za ljudsko zdravlje. Analiza polifenola u medu se smatra kao veoma perspektivan način procene njegovog botaničkog (Gašić, 2017) i geografskog porekla (Pyrzynska i Biesaga, 2009). Polifenolna jedinjenja koja su predložena kao markeri za određivanje botaničkog porekla nekoliko monofloralnih tipova medova prikazana su u **Tabeli 5**.

Mnoge studije su pokazale da polifenolna jedinjenja smanjuju rizik od raznih oboljenja, pre svega zbog svoje antioksidativne aktivnosti (Gašić, 2016). U literaturi je poznato da flavonoidi utiču na bolesti srca i to na tri načina: poboljšanje koronarne vazodilatacije, smanjenje sposobnosti trombocita u krvi da naprave ugrušak, i sprečavanje lipoproteina niske gustine (*LDLs*) da se oksiduju (Khalil i Sulaiman, 2010).

Prema većini objavljenih analitičkih procedura, sa retkim izuzecima (Scanu, 2005), određivanje polifenola u medu uključuje osnovne korake izolovanja iz matriksa uzorka, odvajanje, prečišćavanje, identifikaciju i kvantifikaciju željenih jedinjenja. Odvajanje i identifikacija obično se izvode hromatografskim (Ferrerres, 1993; Yao, 2003) ili elektroforetskim (Andrade, 1997; Merken i Beecher, 2000) tehnikama. Izbor instrumentalne tehnike i izbor operativnih parametara veoma zavise od analitičkih ciljeva i tipa karakterizacije (kvalitativnog i(ili) kvantitativnog).

U literaturi postoji veliki broj postupaka pripreme uzorka meda za određivanje polifenolnih supstanci. Nekad se koristi samo jedna tehnika ekstrakcije, a često i više njih, s ciljem da se izvrši što bolje odvajanje polifenola iz meda. Veoma je važno da uzorak bude reprezentativan, tj. da oslikava prosečan sastav meda koji se analizira. Osnovni cilj pripreme uzorka je dobijanje ekstrakta koji sadrži sve komponente od interesa, ali i odvajanje supstanci koje bi ometale njihovo dalje određivanje (Pyrzynska i Biesaga, 2009). Metode koje se najčešće koriste za izolovanje polifenola iz meda zasnivaju se na nekoliko vrsta ekstrakcije (Ciulu, 2016):

- 1) tečno-tečna ekstrakcija,
- 2) kombinacija tečno-čvrste i tečno-tečne ekstrakcije i
- 3) adsorpcija na polimernom adsorbensu Amberlite XAD u kombinaciji sa tečno-tečnom ili tečno-čvrstom ekstrakcijom.

Tabela 5. Polifenolna jedinjenja kao markeri botaničkog porekla različitih tipova medova.

Botaničko poreklo meda	Latinski naziv medonosne biljke	Polifenolna jedinjenja	Referenca
Agrumi	<i>Citrus spp.</i>	Hesperetin	Ferreres, 1993; Ferreres, 1994b; Liang, 2009
Beli zlatoglav	<i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. et Viv.	Metil-siringat	Tuberoso, 2009
Ljubičasti čičak	<i>Galactites tomentosa</i> Moench	Fenilmlečna kiselina	Tuberoso, 2011
Planika	<i>Arbutus unedo</i>	Homogentizinska kiselina	Cabras, 1999; Tuberoso, 2010; Scanu, 2005
Uljana repica	<i>Brassica napus</i>	Elaginska kiselina	Wang, 2014
Bagrem	<i>Robinia pseudacacia</i>	Hlorogena kiselina	
		Flavonol-ramnozidi	Truchado, 2008
		Derivati cimetne kiseline	
Kesten	<i>Castanea sativa</i>	4-Hidroksibenzoeva, 4-hidroksifenilmlečna, ferulinska i fenilmlečna kiselina	Dimitrova, 2007
Lipa	<i>Tilia ssp.</i>	3- Hidroksibenzoeva kiselina	

Tabela 5. Nastavak.

Botaničko poreklo meda	Latinski naziv medonosne biljke	Polifenolna jedinjenja	Referenca
Ruzmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	8-Methoksikampferol	Ferreres, 1998
		Kampferol	Gil, 1995
Suncokret	<i>Helianthus annuus</i>	Kvercetin	Tomás-Barberán, 2001
		Eriodiktiol i kvercetin	Kečkeš, 2013
Eukaliptus	<i>Eucaliptus camaldulensis</i>	Tricetin	Martos, 2000a
	<i>Eucaliptus pilligaensis</i>	Luteolin	
Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	Orto-anizinska i eudezminska kiselina	Stephens, 2010
Kanuka	<i>Kunzea ericoides</i>	Homoanizinska kiselina	
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i>	Luteolin	Ferreres, 1994a
		Naringenin	Andrade, 1997
Nana	<i>Mentha spp.</i>	Ruzmarininska kiselina	
Vresak	<i>Erica spp.</i>	Miricetin, Miricetin 3-metil etar, Miricetin 3'-metil etar,	Ferreres, 1994c;
	<i>Calluna spp.</i>	Tricetin	Ferreres, 1996
		Elaginska kiselina	Soler, 1995

Sistem za čvrsto-tečnu ekstrakciju (*Solid Phase Extraction - SPE*) se koristi za koncentrovanje tečnih uzoraka razblaženih rastvora pre analize, kao i za izolovanje i njihovo prečišćavanje, na taj način što se uklanjaju onečišćenja i ometajuće supstance iz složenih sistema. Izolovanje polifenola iz meda ometaju šećeri prisutni u matriksu, zbog čega se SPE tehnika koristi za njihovo uklanjanje.

Amberlite XAD je poliakrilni estar. Prilikom prolaska uzorka, na koloni koja je napunjena ovom polimernom smolom zaostaju polifenolna jedinjenja, dok se šećeri i ostale polarne komponente eluiraju propuštanjem vode. Polifenolna jedinjenja eluiraju se sa kolone metanolom ili acetonitrilom, čime se vrši izolovanje analita, njegovo prečišćavanje i koncentrovanje.

U jednom radu izvršeno je upoređivanje efikasnosti četiri sorbenta, tri tipa SPE kertridža (oktadecil C18, *Oasis HLB*, *Strata-X*) i kolona sa *Amberlit XAD-2* smolom, a u cilju izolovanja i prekoncentracije šest fenolnih kiselina (galne, *p*-hidroksibenzoeve, *p*-kumarinske, vanilinske, kofeinske i siringinske kiseline) i tri flavonola (rutina, kvercetin i kampferol) iz uzorka meda. *Oasis HLB* kertridž ispran sa 50 mL zakišeljene vode (pH = 2) i eluiran sa metanolom obezbedio je najbolje rezultate (Michalkiewicz, 2008). Nedavno, *Liu* i saradnici su predložili novi sorbent, nano- Al_2O_3 obložen silicijumom ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$), kao kertridž sa čvrsto-tečnu ekstrakciju flavonoida. Njegova efikasnost ekstrakcije je bila bolja nego kod komercijalnih C18 kertridža (*Liu*, 2015).

Etil-acetat se najčešće koristi kao rastvarač za tečno-tečnu ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz uzorka meda. Ekstrakcija se može izvoditi iz rastvora dobijenog rastvaranjem meda u destilovanoj vodi (Tuberoso, 2009) ili u 2 %-nom rastvoru natrijum-hlorida (Kečkeš, 2013b). *Campone* i saradnici su prijavili primer disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME*) polifenolnih jedinjenja iz meda i dobili su efikasnost ekstrakcije (*recovery*) veću od 70 % (*Campone*, 2014).

U skorije vreme predstavljena je upotreba specijalnih ugljeničnih nanocevi (*Multi-Walled Carbon NanoTubes - MWCNTs*) kao sorbenta za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja (*Badjah Hadj Ahmed*, 2014; *Wabaidur*, 2015). Glavne prednosti ovog pristupa su u mogućnosti da se istovremeno ekstrahuje veliki broj različitih klasa

polifenola (fenolne kiseline, flavonoidi i njihovi derivati) sa visokom efikašnoću i reproduktivnošću. Pored toga, *MVCNTs* sorbent ima odlična regeneraciona svojstva.

U cilju provere stabilnosti fenolnih jedinjenja pri ultrasoničnoj i mikrotalasnoj ekstrakciji, autori jedne naučne studije su pokazali da ultrazvuk obezbeđuje bolji prinos ekstrakcije. Sva polifenolna jedinjenja ekstrahovana iz meda ultrazvučnom ekstrakcijom imaju srednji prinos od oko 90 %, dok prilikom mikrotalasne ekstrakcije derivati benzoeve kiseline i flavonoida pokazuju manju prinos (70-80 %) (Biesaga i Pyrzyńska, 2013).

Uprkos rastućem interesu za razvoj naprednih tehnika tečne ekstrakcije koje za cilj imaju da se dobije što reprezentativniji polifenolni ekstrakt, samo jedan primer ubrzane ekstrakcije na sorbentu (*Accelerated Solvent Extraction - ASE*) prikazan je u literaturi (Habib, 2014). Ekstrakcija se vrši rastvaranjem uzorka u zakišeljenoj vodi (pH = 2, HCl), na 25 °C. Polifenoli se eluiraju metanolom, metanolni rastvor se upari do suva, a ostatak posle uparavanja se ponovo suspenduje u destilovanoj vodi i ekstrahuje tri puta dietiletom. Ekstrakti se ponovo upare i rastvore u rastvoru metanola i vode pre HPLC analize.

U cilju razdvajanja polifenola najviše se koriste metode tečne hromatografije visokih performansi, i to skoro uvek kao reverzno-fazne (*RP-HPLC*). Razdvajanje analita se obično postiže upotrebom C18 oktadecil (*ODS*) kolona. U poslednjih nekoliko godina UHPLC tehnika pokazala se kao brza i efikasna metoda u analizi polifenolnih sastojaka meda i to zbog niza prednosti, kao što su: visoka rezolucija, veća osetljivost i preciznost, kao i značajno smanjeno vreme trajanja analize (Tuberoso, 2009; Campone, 2014; Wabaidur, 2015). Razlog boljih performansi UHPLC tehnike leži u prosečnoj veličini čestica stacionarne faze (obično manje od 2 μ). Mobilna faza se sastoji od koncentracionog gradijenta dva rastvarača: A) vodenog rastvora mravlje (Sarmiento Silva, 2013; Zhang, 2013; Campone, 2014; Campillo, 2015; Truchado, 2015) ili sirćetne (Liang, 2009; Habib, 2014), ređe trifluorosirćetne (Pichichero, 2009; Kumazawa, 2012), fosforne kiseline ili fosfatnog pufera (Dimitrova, 2007; Tuberoso, 2009) i B) metanola ili acetonitrila.

Detektor koji se obično koristi za određivanje polifenolnog profila meda zasniva se na merenju UV apsorpcije; ponekad je to UV detektor sa sistemom dioda (DAD)

(Sarmiento Silva, 2013; Zhang, 2013; Badjah Hadj Ahmed, 2014). Izbor odgovarajućih talasnih dužina je od suštinskog značaja kako bi se povećala osetljivost metode, posebno kada jedinjenja od značaja nemaju specifične hromofore. HPLC-UV identifikacija i kvantifikacija polifenola je moguća samo poređenjem retencionih vremena uzoraka sa retencionim vremenima standarda, kao i metodom internog standarda. Glavni nedostatak svih spektrofotometrijskih detektora je nemogućnost da direktno obezbede strukturne informacije i to veoma ograničava karakterizaciju jedinjenja. Iz tog razloga, u poslednjih nekoliko godina, mnoge studije su fokusirane na razvoj HPLC metoda koje uključuju masenu spektrometriju kao vid detekcije (Ciulu, 2016).

Primena masene spektrometrije kao vida detekcije kod HPLC sistema, dovelo je do identifikacije novih potencijalnih markera botaničkog porekla meda (npr. metil-siringat za monofloralni med vrste *Asphodelus microcarpus*) (Tuberoso, 2009). Osim toga, primenom masene spektrometrije može se proučavati fragmentacioni put i doći do informacija o strukturi različitih izomernih jedinjenja. Truchado i saradnici, HPLC-ESI MSⁿ metodom, okarakterisali su flavon *O*-glikozide u medu koji proizvode *Tetragonula carbonaria* pčele i uspeali su da odrede prirodu inter-glikozidnih veza kao i da identifikuju nekoliko mono-, di- i triglikozida (Truchado, 2009). Maseni detektori koji rade na principu jonske zamke (*Ion Trap*) i maseni detektori sa tri kvadrupola (*Triple quadropole*), kao i noviji hibridni instrumenti (sa *Orbitrap* masenim analizatorom) koriste se za karakterizaciju polifenolne frakcije meda. ESI (*Electron Spray Ionisation*) izvor, koji se najčešće instalira u ovakvim spektrometrima obično radi u negativnom jonizacionom modu, ali i pozitivna varijanta može biti korisna za identifikaciju nekih analita (Stephens, 2010; Mannina, 2015).

Kvalitativni i kvantitativni profil polifenolnih jedinjenja predstavlja moćan instrument za proveru botaničkog porekla meda (Gašić, 2017). Jedan od najznačajnijih primera specifičnosti jedne fenolne kiseline kao hemijskog markera botaničkog porekla je homogentizinska kiselina (**Tabela 5**) u slučaju meda od planike (*Arbutus unedo*) (Cabras, 1999; Scanu, 2005). Prošlo je više od 15 godina od otkrića ove kiseline kao markera meda od planike, ali od tada ovo jedinjenje nije pronađeno u nekoj drugoj vrsti monofloralnog meda. Istraživačka grupa Tuberoso-a i saradnika je kasnije predložila dodatne hemijske markere (tri derivata abscisinske kiseline) za isti med (Tuberoso,

2010). Ista istraživačka grupa je predložila lumihrom (7,8-dimetilaloksazin) i fenilmlečnu kiselinu kao hemijske markere meda od čička (*Galactites tomentosa* Moench) (Tuberoso, 2011). Neka polifenolna jedinjenja mogu biti veoma korisna pri razlikovanju tipova medova koji pokazuju slične palinološke osobine (skoro identičan oblik polenovih zrna). Ovo je slučaj sa dve vrste meda karakterističnih za Novi Zeland, meda manuke (*Leptospermum scoparium*) i kanuke (*Kunzea erikoides*). Uprkos činjenici da manuka i kanuka medovi dele većinu polifenolnih jedinjenja, Stephens i saradnici (Stephens, 2010) su primetili da su *orto*-anizinska (2-metoksibenzoeva) i eudezminska (3,4,5-trimetoksibenzoeva) kiselina karakteristične za manuka med, dok je homoanizinska (4-metoksifenilsirćetna) kiselina karakteristična za kanuka med (**Tabela 5**).

Karakterizacija polifenolnog profila meda je našla promenu i u proceni geografskog porekla. U radu Habib-a i saradnika (Habib, 2014) utvrđena je značajna razlika u sadržaju polifenolnih jedinjenja meda proizvedenih u sušnim i kišovitim regionima. Razlike u polifenolnom profilu su objašnjene na osnovu različitih klimatskih faktora i izlaganja suncu što je za posledicu imalo veći sadržaj polifenola u medu proizvedenom u sušnim regionima. Kao sledeći primer, polifenolni profil *Hedysarum coronarium* meda proizvedenog u Južnoj Italiji je ukazao na razlike u geografskom poreklu (Gambacorta, 2014).

Pored karakterizacije botaničkog i geografskog porekla meda, polifenolni profil se takođe koristi za proučavanje medova proizvedenih od različitih vrsta pčela. Tako na primer, neke naučne studije (Tenore, 2012; Mannina, 2015) su posvećene analitičkoj karakterizaciji polifenolnog profila meda proizvedenog od sicilijanske crne pčele (*Apis mellifera* spp. *Sicula*). Četiri fenolne kiseline, tri flavonoida i dva izomera abscisinske kiseline su kvantifikovani u *Jandaira* medu iz Brazila koji proizvodi *Melipona subnitida* pčela (Sarmiento Silva, 2013), a izvršena je kvalitativna karakterizacija flavon O-glikozida u medu koji proizvodi *Tetragonula carbonaria* pčela iz Australije (Truchado, 2015). U svim ovim studijama koje se bave analizom polifenola u medu proizvedenom od strane specifične pčele, nisu pronađeni novi specijalni markeri, ali je koncentracija nekih polifenola znatno veća u odnosu na med koji proizvodi *Apis mellifera*.

Kvalitativni i kvantitativni profil polifenolnih jedinjenja u medu je sigurno pogodan način za prikupljanje informacija o njegovom botaničkom i(ili) geografskom poreklu, ali dobijeni podaci su pouzdani samo ako je eksperiment rađen na adekvatnom broju uzoraka. Budući da je veliki set podataka veoma teško pravilno protumačiti, hemometrijski pristup može biti od velike koristi i može dati više informacija o botaničkom i(ili) geografskom poreklu meda (Ruoff, 2005). Tako su *Petretto* i saradnici ispitivali pedeset jedan uzorak meda iz Sardinije, među kojima je identifikovano ukupno deset različitih monofloralnih vrsta meda (planika, beli zlatoglav, ljubičasti čičak, eukaliptus, obična mirta, majčina dušica, kesten, cistus, lavanda i ruzmarin). Primenom PCA uspeli su da med iz Sardinije odvoje po botaničkom poreklu na osnovu sadržaja polifenolnih jedinjenja, antioksidativne aktivnosti i fizičko-hemijskih parametara (Petretto, 2015). Naučnici iz Poljske i Holandije, koristeći proton-transfer masenu spektrometriju (PTR-MS) i HPLC-DAD polifenolni profil u kombinaciji sa PCA, uspeli su da klasifikuju med prema botaničkom poreklu (Kus i van Ruth, 2015). S druge strane, *Karabagias* i saradnici su po geografskom poreklu klasifikovali trideset pet uzoraka grčkog meda od bora sa četiri različite lokacije primenom multivarijantne analize varijansi (MANOVA) i linearne diskriminantne analize (LDA), a kao varijable su koristili polifenolni profil i fizičko-hemijske parametre (Karabagias, 2014). *Pasquini* i saradnici koristeći analizu glavnih komponenata i linearnu i kvadratnu diskriminantnu analizu, klasifikovali su pedeset uzoraka meda po geografskom poreklu na osnovu mineralnog sastava, polifenolnih jedinjenja i DPPH antioksidativne aktivnosti (Pasquini, 2014). *Wang* i saradnici su na osnovu polifenolnog profila, a primenom klusterske analize i analize glavnih komponenata, predložili markere botaničkog porekla za bagremov i med od uljane repice (Wang, 2014). Hlorogena kiselina je predložena kao mogući marker za bagremov med, a elaginska kiselina kao potencijalni marker za med od uljane repice (**Tabela 5**).

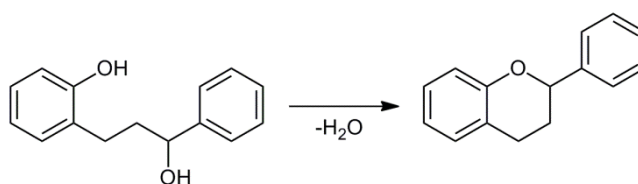
2.2.4.1. Flavonoidi

Flavonoidi (od lat. *Flavus*, sa značenjem žuto) predstavljaju jednu od najbrojnijih grupa prirodnih heterocikličkih jedinjenja sa kiseonikom. Najčešće se nalaze u biljkama kao slobodna frakcija, ali mogu biti i povezani sa šećernim

komponentama i graditi glikozide. Flavonoidi su antioksidansi rastvorljivi u vodi, a prisutni su u namirnicama kao što su voće, povrće, čaj, vino, grožđe, med, propolis, nektar, itd. Identifikovano je više od 6000 različitih flavonoida (Ferreyra, 2012), iako je samo u jednom malom procentu biljaka sprovedeno njihovo ispitivanje. Ovaj broj se neprestano uvećava.

Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje su uslovljene reakcijama hidrogenovanja, hidroksilovanja, *O*-metilovanja hidroksilnih grupa, dimerizacije ili glikolizovanjem hidroksilnih grupa (*O*-glikozidi). Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol) iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem piranovog prstena nastaje flavan, čija je struktura prikazana na **Slici 2**.

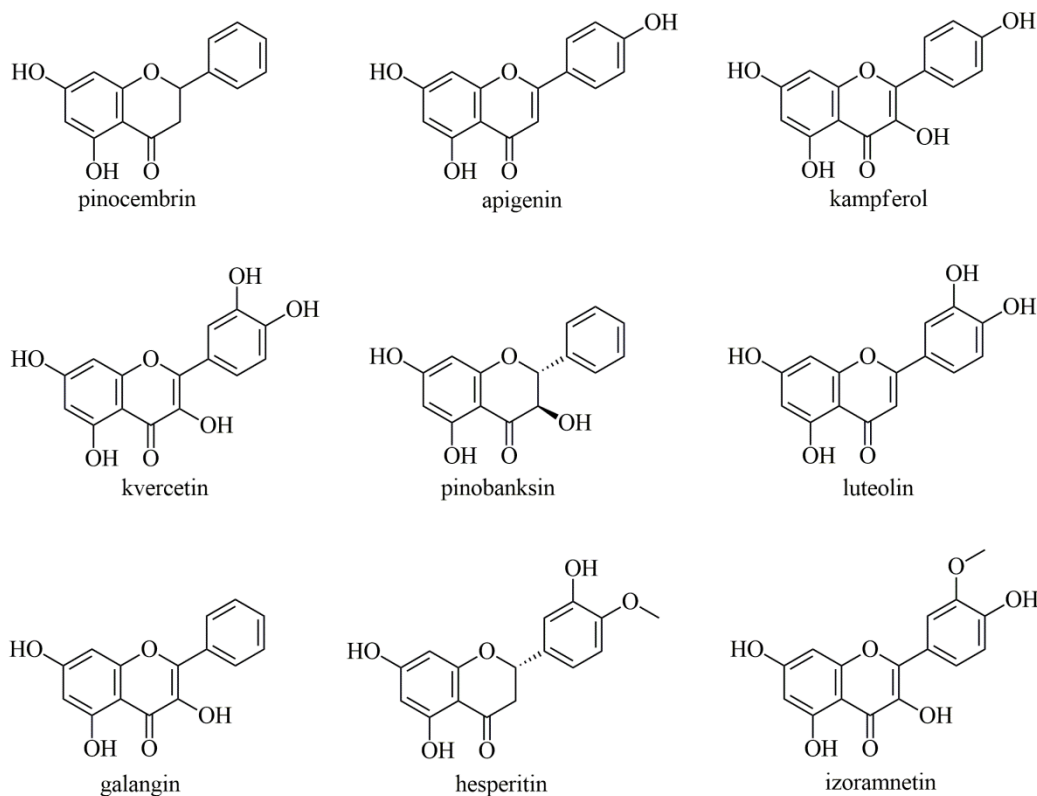
U zavisnosti od stepena oksidacije piranovog prstena, kao i od pozicije sekundarnog aromatičnog prstena, flavonoidi mogu biti klasifikovani u osam različitih podgrupa na osnovu razlika u osnovnoj molekularnoj strukturi: flavonoli, flavani, flavanoni, katehini, antocijanidini, izoflavoni, dihidroflavonoli i halkoni (Harborne i Williams, 2000; Kumar i Pandey, 2013). Flavonoidi mogu biti hidroksilovani, metoksilovani ili glikozidno vezani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže i acilne grupe na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dela. Flavonoidi poseduju veliku sklonost ka umrežavanju i polimerizaciji i tako nastaju tanini.



Slika 2. Struktura flavana.

Količina flavonoida u medu može iznositi i do 6 mg/kg, dok je njihov udeo dosta veći u polenu (0,5 %) i u propolisu (10 %) (Anklam, 1998). Na osnovu literaturnih podataka može se reći da su u medu najzastupljeniji pinocembrin, apigenin, kampferol, kvercetin, pinobanksin, luteolin, galangin, hesperitin i izoramnetin (**Slika 3**) (Beretta,

2005). Veliki broj flavonoida koji se nalaze u medu ne potiču iz cvetnog nektara već iz propolisa (pinobanksin, pinocembrin i hrizin) (Tomás-Barberán, 2001).



Slika 3. Strukture flavonoida koji se mogu naći u medu.

Flavonoidi se mogu koristiti i kao markeri botaničkog porekla evropskog meda od eukaliptusa. Medovi biljnog porekla biljke *Eucalyptus camaldulensis* sadrže tricetin kao glavni marker, dok je za *Eucalyptus pilligaensis* med luteolin predložen kao glavni marker botaničkog porekla (**Tabela 5**). Flavonoidni profili australijskog meda od eukaliptusa se veoma razlikuju od evropskog (Martos, 2000a i 2000b). Flavonol ramnozidi su se pokazali kao markeri bagremovog meda jer nisu detektovani u bilo kojoj drugoj vrsti meda. Prisustvo flavonoid-glikozida u medu je od posebnog značaja jer povećava broj potencijalnih markera za detekciju botaničkog porekla meda (Truchado, 2008). Miricetin, miricetin 3-metiletar, miricetin 3'-metiletar i tricetin su identifikovani kao karakteristični flavonoidi u medu od vreska i predloženi su kao markeri botaničkog porekla (Ferrerres, 1994c). Ferreres i saradnici (1991) su pokazali

da profili flavonoida i botaničko poreklo imaju dobru korelaciju u slučaju 5 ispitivanih medova od ruzmarina, 2 od lavande i 2 polifloralna uzorka iz Španije. Dobijeni rezultati pokazuju da flavonoidi u med dospevaju uglavnom iz polena, ali i iz propolisa.

Ferreres i saradnici su analizom flavonoidnog profila 14 botaničkih vrsta meda odredili hesperetin kao marker meda od limuna i luteolin kao marker meda od lavande (Ferreres, 1994a). Oni takođe nalaze 8-metoksi-kampferol kao glavno jedinjenje u uzorcima meda od ruzmarina (Ferreres, 1998), dok se kvercetin predlaže kao marker za botaničko poreklo suncokretovog meda (Tomás-Barberán, 2001).

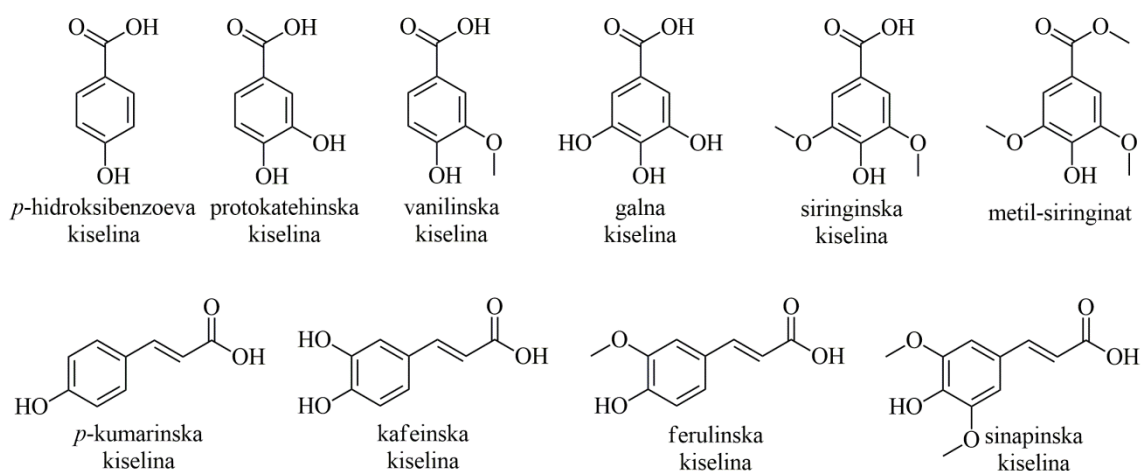
U Litvaniji je urađeno istraživanje koje je pokazalo bitnu razliku u količini i vrsti flavonoida između prolećnih i letnjih vrsta meda, pa se iz tih razloga sastav flavonoida može koristiti kao dokaz botaničkog porekla, što je potvrđeno i polenskom analizom (Čeksteryte, 2006). Slično istraživanje uradili su naučnici iz Slovenije na četrdeset uzoraka monofloralnih medova (ukupno sedam botaničkih vrsta). Cilj ovog rada bio je određivanje sadržaja šest flavonoida i dve abscisinske kiseline. Pomoću tih parametara, koristeći multivarijantnu analizu, klasifikovali su uzorke meda prema botaničkom poreklu, pri čemu se lipov med potpuno odvojio od ostalih vrsta (Bertoncelj, 2011).

2.2.4.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se dele na derivate cimetine i benzoeve kiseline. Na **Slici 4** su prikazane njihove strukture i derivati koji su prisutni u medu. Fenolne kiseline spadaju u grupu poznatih antioksidanata zbog sposobnosti da predaju vodonik ili elektron kao i zato što njihovi stabilni interemedijerni radikali sprečavaju oksidaciju različitih komponenti, naročito masnih kiselina i ulja (Heleno, 2015).

Hidroksi derivati benzoeve i cimetine kiseline su prisutni u hrani biljnog porekla (voće, povrće, žitarice). Zastupljeni su u svim delovima biljaka (koren, stabljika, lišće, seme). Osim toga, kvalitativni sastav fenolnih kiselina varira u zavisnosti od stadijuma razvića biljaka i od uslova spoljašnje sredine (abiotičkih i biotičkih faktora). Pokazano je da temperatura utiče na sadržaj fenolnih kiselina u nekim namirnicama biljnog porekla (Robbins, 2003). Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku, češće se javljaju u obliku estara, amida i glikozida. Tako fenolne kiseline mogu biti

vezane sa strukturnim komponentama biljaka (celuloza, proteini i lignini) estarskom, etarskom ili acetalnom vezom, ili sa manjim organskim molekulima (glukoza, kininska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (npr. terpeni) (Arceusz, 2013).



Slika 4. Hidroksi derivati benzoeve i cimetne kiseline identifikovani u medu.

Hidroksi derivati benzoeve kiseline prisutni u medu su: vanilinska, galna, *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, siringinska i elaginska kiselina. Od hidroksi-derivata cimetne kiseline u medu su zastupljene *p*-kumarinska, kofeinska, ferulinska i sinapinska kiselina (Trautvetter, 2009). Fenolne kiseline (najčešće kofeinska i ferulinska) mogu graditi estre sa nekim drugim kiselinama, kao što je kininska, i tako imamo kofeoilkininsku, dikofeoilkininsku, trikofeoilkininsku, feruoilkininske kiseline (Stalmach, 2006; Wang, 2010b).

Španski naučnici su u medu od nane pronašli znatno veću količinu ruzmarinske kiseline, nego u ostalim ispitivanim medovima, pa je ova kiselina predložena kao marker botaničkog porekla meda od nane (Andrade, 1997). Neke hidroksibenzoeve kiseline (elaginska kiselina u medu od vreska (Antony, 2000) i derivati hidroksicimetne kiseline (kofeinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina) u medu od kestena (Merken i Beecher, 2000) su predloženi kao markeri njihovog porekla.

2.2.5. Organske kiseline

Prema literaturnim podacima poznato je da med ima blagu kiselost, jer sadrži u proseku oko 0,57 % organskih kiselina. Najzastupljenija organska kiselina u medu je glukuronska, koja nastaje oksidacijom glukoze (Karabagias, 2014). Veliki broj organskih kiselina se u medu može naći u obliku estara. Neke organske kiseline se unose u med posredstvom nektara i medljike, a neke nastaju različitim hemijskim promenama prilikom skladištenja meda (da Silva, 2016). Sadržaj organskih kiselina u medu može se koristiti kao pokazatelj organoleptičkih svojstava (boja i ukus) i fizičkih i hemijskih osobina (pH-vrednost, kiselost i električna provodljivost) meda. (Mato, 2006b; Babarinde, 2011). Organske kiseline u medu pokazuju antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost (Gheldof, 2002).

Cherchi je sa saradnicima određivao organske kiseline u različitim uzorcima meda iz Italije. Najveći udeo nađen je za glukuronsku kiselinu (2 - 12 g/kg), a zatim za pirogroždanu (9 - 76 mg/kg), malonsku (69 - 145 mg/kg), limunsku (64 - 160 mg/kg), ćilibarnu (12 - 48 mg/kg) i fumarnu kiselinu (0,5 - 2,6 mg/kg) (Cherchi, 1994).

Organske kiseline u medu mogu se takođe koristiti kao parametar za razlikovanje medova prema botaničkom i (ili) geografskom poreklu. U istraživanju sprovedenom na četiri vrste novozelandskih monofloralnih medova identifikovana su trideset dva metilestra alifatičnih dikarboksilnih kiselina, a 2-metoksi-butandikiselina i 4-hidroksi-3-metil-*trans*-2-pentandikiselina predložene su kao markeri botaničkog porekla za *Knigthea excelsa* med (Wilkins, 1995).

Nešto veće vrednosti sadržaja organskih kiselina nađene su u istraživanju *Suarez-Luque*-a i saradnika. Uzorci meda kestena, eukaliptusa, deteline, kao i polifloralnih medova prosečno su imali: 110 mg/kg malonske, 99 mg/kg limunske, 88 mg/kg ćilibarne, 1,23 mg/kg fumarne kiseline i 0,54 mg/kg maleinske kiseline. Najveći udeo svih kiselina zabeležen je u uzorcima kestenovog meda (Suarez-Luque, 2002).

2.2.5.1. Abscisinska kiselina

Abscisinska kiselina (abscisin) je biljni hormon koji se, između ostalog, nalazi u cvetnom nektaru, posredstvom koga se prenosi i u med. Po hemijskoj prirodi je

seskviterpenoid i nezasićena organska kiselina. Još je nazivaju i hormonom stresa kod pčela (Negri, 2015).

U literaturi su opisana dva izomera abscisinske kiseline u medu i nektaru (*cis*, *trans* abscisinska i *trans*, *trans* abscisinska), a njihove koncentracije u medu veoma zavise od botaničke vrste medonosne biljke (Yao, 2005).

Slovenački naučnici određivali su sadržaj flavonoida i abscisinske kiseline u četrdeset uzoraka monofloralnih medova, poreklom od ukupno sedam biljnih vrsta, i u svakom ekstraktu meda pronađena je znatno veća koncentracija *cis*, *trans*-abscisinske kiseline u odnosu na *trans*, *trans*-abscisinsku (Bertoncelj, 2011). *Tuberoso* i saradnici predložili su derivate abscisinske kiseline kao potencijalne markere botaničkog porekla za *Arbutus unedo* med (Tuberoso, 2010).

2.2.6. Fermentacioni proizvodi

Sirov ili nezreo med obično ima visok sadržaj vode, što može dovesti do fermentacije i kvarenja meda. Informacije o ovakvom kvarenju meda se mogu dobiti mikroskopskom analizom kvasca, ali je mnogo pouzdanije uraditi kvantitativnu analizu fermentacionih proizvoda, kao što su glicerol i etanol (Beckh, 2005). Glicerol može biti u manjoj meri zastupljen u zreлом medu, jer ga proizvode mikroorganizmi nektara i medljike. *Huidobro* i saradnici (1993) su, analizirajući sadržaj glicerola u 33 uzorka meda iz Galicije (Španija) enzimskom metodom, utvrdili da se sadržaj glicerola kretao između 50 i 370 mg/kg. Analiza fermentacionih proizvoda može samo dati neke informacije o načinu obrade meda, ali nije pogodan metod za detekciju botaničkog i geografskog porekla meda.

2.2.7. Isparljiva jedinjenja

U medu je identifikovano više od 400 isparljivih jedinjenja (Bentivenga, 2004). Isparljiva i poluisparljiva jedinjenja prisutna u medu su najviše odgovorna za aromu (miris) meda. Izolovanje isparljivih jedinjenja iz meda koji imaju svoju specifičnu prirodnu aromu je vrlo teško. Promene ukusa i mirisa meda su obično povezane sa tehnikama obrade i vremenom skladištenja meda. Tačno kvantifikovanje svih isparljivih

jedinjenja može biti veoma korisno za određivanje botaničkog i geografskog porekla meda. Aromatična jedinjenja u med dolaze iz nektara ili medljike, a takođe mogu nastati zagrevanjem meda, kao i prilikom neadekvatnog skladištenja (Bonvehi i Coll, 2003; Soria, 2003). 1-Penten-3-ol predložen je kao karakteristično jedinjenje za engleski med (Radović, 2001a i 2001b). Furfuril merkaptan, benzil-alkohol, δ -oktalakton, γ -dekalakton, eugenol, benzoeva kiselina, izovalerijanska kiselina, feniletilalkohol i 2-metoksifenol su predloženi kao posebno važna isparljiva jedinjenja u brazilskom medu (Moreira, 2002). Izolovanje i identifikacija isparljivih jedinjenja su takođe važni za procenu botaničkog porekla meda (Anklam, 1998; Alissandrakis, 2005 i 2007; Kaškonienė, 2008).

Koncentracija isparljivih jedinjenja u medu je vrlo niska. Za analizu isparljivih jedinjenja u medu, šećer mora biti uklonjen. U cilju izolovanja isparljivih jedinjenja iz meda koriste se različite metode, kao što su simultana hidrodestilacija - ekstrakcija (*Likens-Nickerson* metoda) (Bouseta i Collin, 1995), dinamička „*headspace*“ ekstrakcija (Bianchi, 2005; Radović, 2001a i 2001b), ultrazvučna ekstrakcija i destilacija vodenom parom (Alissandrakis, 2005), tečna ekstrakcija (Bonvehi i Coll, 2003), kao i čvrsto-tečna mikroekstrakcija (Bentivenga, 2004). Sve ove tehnike imaju svoje prednosti i nedostatke.

Overton i *Manura* (1994) su analizirali 9 uzoraka komercijalnih medova različitog botaničkog porekla (livadski, med od borovnica, narandže, deteline, „*tupelo*“, lucerke i jabuke). Isparljiva jedinjenja zadržana na adsorbensu analizirana su GC-MS metodom upotrebom termalne desorpcije. Rezultati su pokazali da je ova metoda osjetljivija od klasične „*headspace*“ tehnike. Ovom metodom u uzorcima meda pronađeni su mono- i seskviterpenoidi. Prisustvo razgranatih aldehida u uzorcima meda može dati dosta informacija o mikrobnom kvalitetu i termičkoj obradi meda. Kombinacija ove GC-MS metode i polenske analize može biti vrlo korisno sredstvo za procenu botaničkog porekla meda (Overton i Manura, 1994).

Bonaga i *Giumanini* (1986) su izolovana isparljiva jedinjenja (SDE metodom) italijanskih medova kestena analizirali GC-MS tehnikom. Linearni ugljovodonici, zasićeni i nezasićeni, od C10 do C37, pronađeni su u kestenovom medu. *n*-Heptakozan, *n*-nonkozan, *n*-trikoza, *n*-pentakozan i *n*-hentriakontan bili su dominantni zasićeni

ugljovodonici, dok su *n*-tritriakonten i *n*-hentriakonten bili najzastupljeniji od nezasićenih ugljovodonika. Isparljiva jedinjenja italijanskog meda kestena čine složenu smešu više od 50 jedinjenja, od kojih je 3-aminoacetofenon glavna komponenta smeše i može se smatrati specifičnim markerom botaničkog porekla meda kestena (Bonaga i Giumanini, 1986).

Metil-antranilat je specifično isparljivo jedinjenje koje se nalazi u nektaru i medu od citrusa i koristi se kao marker botaničkog porekla za ovaj med (Ferrerres, 1994b; Serra Bonvehi i Ventura Coll, 1995).

2.2.8. Minerali i elementi u tragovima

Sadržaj minerala u medu varira u rasponu od 0,04 % u svetlijim do 0,20 % u tamnijim vrstama meda (Bogdanov, 2007). Glavne mineralne komponente meda su oksidi kalijuma, fosfora, kalcijuma i natrijuma i potiču iz nektara, odnosno mediljke i polenovih zrna. Kalijum je najrasprostranjeniji element u medu (jedna trećina od ukupnih minerala) sa prosečnim sadržajem oko 1500 mg/kg. Minerali iz zemljišta, posredstvom korenovog sistema biljaka dospevaju do nektara, a potom i do meda, ali takođe mogu biti antropogenog porekla (Solayman, 2016). Sadržaj minerala i elemenata u tragovima u medu može da se koristi kao indikator zagađenja životne sredine i indirektan pokazatelj geografskog porekla meda.

U medu proizvedenom u različitim regionima Španije utvrđeno je da određeni tip meda, odnosno med dobijen od iste vrste biljaka (monofloralni), pokazuje sličnosti u količini određenih minerala (Fernández-Torres, 2005). Budući da se karakterističan sastav tla određenog regiona ogleda u mineralnom sastavu medonosne biljke, udeo i sastav minerala se može iskoristiti u određivanju geografskog porekla meda. Tako su 1974. godine francuski naučnici analizom nekoliko elemenata u tragovima uspeali da razdvoje bagremov med iz Francuske od bagremovog meda poreklom iz Mađarske (Ruoff i Bogdanov, 2004). Proučavanje meda iz Turske pokazalo je da je udeo minerala u kestenovom medu viši nego u ostalim tipovima meda, a naročito je bogat kalcijumom, kalijumom i manganom (Küçük, 2007).

U istraživanju indijskih naučnika određivan je udeo minerala u uzorcima meda od deteline, suncokreta, eukaliptusa, limuna i nekoliko polifloralnih tipova medova. U

svim uzorcima najzastupljeniji je bio kalijum (489,5 - 932,6 mg/kg), zatim natrijum (163,3 - 304,3 mg/kg), a potom su sledili kalcijum (32,6 - 84,6 mg/kg), gvožđe (8,9 - 13,25 mg/kg), cink (2,5 - 16,8 mg/kg) i bakar (1,7 - 2,9 mg/kg). Najveći sadržaj kalijuma izmeren je u polifloralnom medu, gvožđa u medu eukaliptusa, a kalcijuma i cinka u medu od deteline (Nanda, 2003).

U mnogim istraživanjima predloženo je da se prisustvo nekih elemenata u tragovima u medu koreliše sa botaničkim poreklom. Na primer, svetli medovi (limun, ruzmarin, lavanda, eukaliptus i majčina dušica) imaju niži sadržaj minerala i elemenata u tragovima od tamnih (avokado, medljikovac, kesten i vresak) (Gonzalez-Miret, 2005). Električna provodljivost rastvora meda veoma zavisi od sadržaja minerala u medu i često se koristi za karakterizaciju njegovog botaničkog porekla (Bogdanov, 2004). Sadržaj teških metala u medu (Cd, Pb, Cr i Ni) oslikava status zagađenja područja na kome su pčele prikupile nektar (Porrini, 2003). *Fernandez-Torres* i saradnici (2005) su zaključili da koncentracije Zn, Mn, Mg i Na u medovima od eukaliptusa, vreska, narandže i ruzmarina iz Španije veoma zavise od botaničkog porekla ispitivanog meda.

2.2.9. Stabilni izotopi

Stabilni izotopi su izotopi nekog elementa čiji se odnos ne menja tokom vremena. Većina elemenata ima najmanje jedan stabilan izotop. Na primer, vodonik ima tri izotopa: ^1H , ^2H i ^3H (stabilni su ^1H i ^2H), kao i ugljenik: ^{12}C , ^{13}C i ^{14}C (^{12}C i ^{13}C su stabilni). Analiza stabilnih izotopa je jedna od najpouzdanijih tehnika za procenu geografskog porekla meda (Anklam, 1998). *Schellenberg* i saradnici (2010) su odredili odnose stabilnih izotopa (H, C, N i S) u medu poreklom iz različitih delova Evrope. Odnos izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ može se koristiti za određivanje dodatka šećera stranog porekla u med. Metoda se zasniva na razlici između stabilnih izotopa ugljenika meda i njegove proteinske frakcije. Predloženo je da vrednost $\delta^{13}\text{C}$ za med poreklom od C3 biljaka (većina medonosnih biljaka) bude od $-21,96$ do $-30,47\%$, od $-11,82$ do $-19,00\%$ za C4 biljke i od $-11,33$ do $-11,78\%$ za šećerni sirup od šećerne trske (Padovan, 2003). Ograničenje ove metode je u tome što se u med može dodati C3 biljni šećer od šećerne repe.

Masena spektrometrija odnosa stabilnih izotopa (*Isotope Ratio Mass Spectrometry* - IRMS) je obećavajuća tehnika za procenu autentičnosti različitih uzoraka hrane, alkoholnih i bezalkoholnih pića. U nekim slučajevima, u kombinaciji sa metodama multivarijantne analize, može poslužiti za procenu botaničkog ili geografskog porekla meda. U jednoj naučnoj studiji stabilni izotopi ugljenika i vodonika u 40 uzoraka meda iz Rumunije određeni IRMS i SNIF/NMR metodama pokazali su se kao reprezentativni parametar za razlikovanje botaničkog i(ili) geografskog porekla meda. Autori su zaključili da se botaničko poreklo meda ne može odrediti korišćenjem samo $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti, ali u tu svrhu može biti upotrebljen D/H odnos iz etanola dobijenog fermentacijom meda (Dinca, 2015). Slovenački naučnici pokušali su da procene geografsko poreklo meda tako što su odredili odnos stabilnih izotopa ($\delta^{13}\text{C}_{\text{med}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$, $\delta^{15}\text{N}$) u 271 uzorku meda (ukupno 7 botaničkih vrsta: bagrem, multifloralni, lipa, kesten, šumski, omorika i jela) iz 4 prirodna geografska regiona u Sloveniji. Multivarijantna statistička analiza pokazala je razlike između medova iz različitih geografskih regiona Slovenije (Kropf, 2010a).

2.2.10. Polenska analiza

Polen, kao i druge mikroskopske čestice, u med dospevaju sa medonosnih biljaka sa kojih se prikuplja nektar ili medljika od strane pčela. Analiza polena u medu može dati informacije o botaničkom izvoru, kao i o tome gde je med proizveden i može se koristiti i kao metod za određivanje geografskog porekla meda (Anklam, 1998). Melizopalinološka (polenska) analiza zasniva se na identifikaciji polenovih zrna pod mikroskopom i ima nekoliko ograničenja. Kao prvo, veoma dugo traje i zahteva posebno osposobljeni kadar za razlikovanje polenovih zrna. Drugi problem je u tome što pčele mogu prikupiti polen sa cveta bez uzimanja nektara, tj. mogu prikupiti polen i sa nemedonosnih biljaka, što može biti korisno kod određivanja geografskog porekla meda. Ako je med filtriran (komercijalni med), u njemu polen ne može biti prisutan. Polenska analiza se ne može koristiti za dokazivanje autentičnosti meda jer se polen može dodati u gotov med. Neke botaničke vrste meda, npr. med od limuna, sadrže veoma malo polenovih zrna, pa polenska analiza ne bi bila pogodna za razlikovanje limunovog meda od drugih vrsta (Serra Bonvehi, 1987). Polenska analiza u kombinaciji

sa drugim tehnikama je ipak efikasno sredstvo za utvrđivanje botaničkog porekla meda (Persano Oddo, 1995; von der Ohe, 2004).

Polenska analiza može razotkriti i geografsko porekla matičnog mleča (Dimou , 2007). Matični mleč je proizvod koji luče tek izlegnute mlade pčele, stare 6-12 dana, koje još ne lete. Veoma je složenog sastava i njime se matica hrani prilikom polaganja jajašaca u satne ćelije. Najvažnije komponente mleča su voda, proteini, masti i ugljeni hidrati (Karaali, 1988). Matični mleč ima veliku hranljivu vrednost i veoma je skup na tržištu, pa je određivanje njegove autentičnosti veoma važan zadatak.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Uzorci meda

Podaci o 58 uzoraka meda analiziranih u okviru doktorske disertacije, prikupljenih direktno od pčelara iz Srbije i Hrvatske (neki od njih su iz Grčke i Italije), prikazani su u **Tabeli 6**. Nakon prikupljanja, uzorci su do analiziranja čuvani na temperaturi od + 4 do + 8 °C. Da bi se utvrdilo botaničko poreklo meda, uzorci su podvrgnuti temeljnoj polenskoj (melizopalinološkoj) analizi. Polenska analiza, važno analitičko sredstvo za verifikaciju botaničkog i geografskog porekla meda, realizovana je prema metodi koju je opisao Loveaux (1978) i dodatno razradio von der Ohe (2004).

Lipov med je svetložute do tamnožute boje, dobija se iz nektara lipovog cveta, bistar je, prepoznatljiv po specifičnom mirisu lipe. Brzo kristališe u vidu sitnih zrnaca i spada u najkvalitetniji monofloralni med. U narodnoj medicini koristi se kao preparat koji ublažava bol (Beretta, 2009). Med od žalfije je svetložute ili svetlozelene boje, karakterističnog ukusa i mirisa. On povoljno deluje na bolesti praćene kašljem i odličan je za prehlade jer doprinosi lakšem izbacivanju sluzi iz organizma. Treba ga uzimati sa čajem, a deluje na organizam veoma smirujuće (Jerković, 2006).

3.2. Reagensi i standardi

Acetonitril, sirćetna i mravlja kiselina (MS čistoće), metanol (HPLC čistoće), *Folin-Ciocalteu* reagens, hlorovodonična kiselina, natrijum-hlorid, natrijum-karbonat, natrijum-hidroksid, natrijum-acetat i etil-acetat su nabavljeni od firme *Merck* (Darmštat, Nemačka). Kertridži za tečno-čvrstu ekstrakciju (C18-E, 500 mg; 6mL), korišćeni za ekstrakciju polifenola iz uzoraka meda, dobijeni su od firme *Phenomenex* (Kalifornija). Ultra-čista voda (0.055 μ S/cm, *TKA* uređaj, Nemačka) je korišćena za pripremu standardnih rastvora i uzoraka. Špric filteri (0,45 μ m) za prečišćavanje uzoraka su nabavljeni od firme *Supelco* (Pensilvanija). *cis*, *trans*-Abscisinska kiselina, standardi polifenola, troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-carboksilna kiselina) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) su nabavljeni od firme *Fluka AG* (Buh, Švajcarska). Standardi šećera su kupljeni od firme *TCI* (Belgija).

Tabela 6. Spisak uzoraka meda: botaničko i geografsko poreklo i godina proizvodnje (po izjavi pčelara).

Redni broj	Oznaka uzorka	Botaničko poreklo	Geografsko poreklo	Godina proizvodnje
1	LH1	Lipa	Istočna Srbija, Crni vrh, Knjaževac	2008
2	LH2	Lipa	Istočna Srbija, Zvezdan, Zaječar	2009
3	LH3	Lipa	Istočna Srbija, Blagojev kamen	2009
4	LH4	Lipa	Istočna Srbija, Blagojev kamen	2009
5	LH5	Lipa	Istočna Srbija, Ujevac, Kučevo	2009
6	LH6	Lipa	Istočna Srbija, Ceremošnja	2009
7	LH7	Lipa	Istočna Srbija, Bor	2009
8	LH8	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2010
9	LH9	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2007
10	LH10	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2006
11	LH11	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2006
12	LH12	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2003
13	LH13	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2002
14	LH14	Lipa	Fruška Gora, Ledinci	2001
15	LH15	Lipa	Fruška Gora, Paragovo	2001
16	LH16	Lipa	Fruška Gora, Sviloš	2001
17	LH17	Lipa	Fruška Gora, Vrdnička kula	2001
18	LH18	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2001
19	LH19	Lipa	Fruška Gora, Banstol, Veliki vrhovi	2001
20	LH20	Lipa	Fruška Gora, Rakovac	2001
21	LH21	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2011
22	LH22	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2011
23	LH23	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2008
24 ^a	LH24	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2009
25 ^b	LH25	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2014
26 ^c	LH26	Lipa	Fruška Gora, Beočin, Crveni Čot	2014

^aPrilikom proizvodnje ovog meda pčele su prehranjivane šećernim pogačama, ^bNezreo (mlad) lipov med, ^cNektar cveta lipovog drveta.

Tabela 6. Nastavak.

Redni broj	Oznaka uzorka	Botaničko poreklo	Geografsko poreklo	Godina proizvodnje
27	SH1	Žalfija	Hrvatska, Cres	2013
28	SH2	Žalfija	Hrvatska, Eastern Istria	2013
29	SH3	Žalfija	Hrvatska, Cres	2013
30	SH4	Žalfija	Hrvatska, Rab	2012
31	SH5	Žalfija	Hrvatska, Cres	2012
32	SH6	Žalfija	Hrvatska, Krk	2011
33	SH7	Žalfija	Hrvatska, Klenovica	2011
34	SH8	Žalfija	Hrvatska, Krk	2011
35	SH9	Žalfija	Hrvatska, Cres	2010
36	SH10	Žalfija	Hrvatska, Krk	2010
37	SH11	Žalfija	Hrvatska, Cres	2010
38	SH12	Žalfija	Hrvatska, Krk	2010
39	SH13	Žalfija	Hrvatska, Krk	2009
40	SH14	Žalfija	Hrvatska, Cres	2009
41	SH15	Žalfija	Hrvatska, Kraljevica	2012
42	SH16	Žalfija	Hrvatska, Cres	2010
43	SH17	Žalfija	Hrvatska, Cres	2012
44	SH18	Žalfija	Hrvatska, Krk	2012
45	MH1	Nana	Hrvatska, Pokupsko	2012
46	WSH1	Vresak	Hrvatska, Velebit	2011
47	WSH2	Vresak	Hrvatska, S. Hr. Primorje	2011
48	WSH3	Vresak	Hrvatska, Podmelnik	2011
49	TH1	Majčina dušica	Grčka	2012
50	TH2	Majčina dušica	Grčka, Krit	2011
51	TH3	Majčina dušica	Grčka, Zakintos	2011
52	TH4	Majčina dušica	Italija, Sicilija	2010
53	TH5	Majčina dušica	Italija, Sicilija	2009

3.3. Priprema standardnih rastvora

Osnovni rastvor smeše svih polifenolnih standarda i *cis*, *trans*-abscisinske kiseline napravljen je rastvaranjem u metanolu (HPLC čistoće) tako da svaki od njih ima koncentraciju oko 1000 mg/L u smeši. Razblaživanjem osnovnog rastvora mobilnom fazom dobijena je serija radnih rastvora sledećih koncentracija: 0,010; 0,050; 0,100; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000 mg/L. Polazni i radni rastvori su čuvani u mraku na 4 °C do analize. Kalibracione krive su dobijene korelisanjem površine pikova sa koncentracijom standardnih rastvora.

Svaki standard šećera rastvoren je u ultračistoj vodi tako da ima koncentraciju oko 1000 mg/L. Napravljen je serija od 5 smeša standardnih rastvora šećera i šećernih alkohola različitih koncentracija. Opseg koncentracija šećera podešen je tako da odgovara očekivanim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u medu. Opseg koncentracija za glukozu i fruktozu bio je od 10,0 do 100,0 mg/L; za saharozu od 1,0 do 10,0 mg/L; za izomaltozu od 0,5 do 5,0 mg/L, dok je za sve ostale standarde opseg koncentracija bio od 0,1 do 1,0 mg/L.

3.4. Ekstrakcija polifenola iz uzoraka meda

Metoda čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE) korišćena za ekstrakciju polifenola iz uzoraka meda od lipe, žalfije, nane, vreska i majčine dušice prethodno je opisana u literaturi (Gašić, 2014b; Gašić, 2015). Uzorak meda (5 g) rastvoren je u 5 mL ultračiste vode, a pH vrednost podešena je na 2 korišćenjem 0,1 % hlorovodonične kiseline. Nakon toga je uzorak homogenizovan u ultrazvučnom kupatilu tokom 30 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dobijeni rastvor profiltriran kroz filter-papir radi uklanjanja čvrstih čestica (saće i dr.). Kertridži za SPE su pre nanošenja uzoraka kondicionirani propuštanjem 3 mL acetonitrila i 9 mL ultračiste vode. Filtrat je propušten kroz kertridž bez vakuuma (veoma sporo), a zatim su sa 6 mL zakišeljene vode (pH = 2) uklonjeni šećeri i drugi polarni sastojci meda. Adsorbovani polifenoli su eluirani sa 1,5 mL acetonitrila. Ovako pripremljeni ekstrakti čuvani su u frižideru, a neposredno pre LC-MS analize filtrirani pomoću špic-filtera (13 mm, membrana od PTFE, 0,45 µm).

3.5. Tečna hromatografija - masena spektrometrija (LC-MS)

3.5.1. Određivanje polifenolnog profila

Razdvajanje i identifikacija komponenti od interesa vršena je na sistemu za tečnu hromatografiju sa kvaternarnom *Accela* 600 pumpom i *Accela* autosemplerom koji je povezan na hibridni maseni spektrometar visoke rezolucije (*UHPLC-LTQ OrbiTrap XL*, **Slika 5**) sa jonskim izvorom u obliku elektrosprej jonizacije (*ElectroSpray Ionization, ESI*) (Kečkeš, 2013a).



Slika 5. *UHPLC + LTQ Orbitrap XL.*

Synchronis C18 kolona (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) korišćena je kao analitička kolona za razdvajanje polifenola. Mobilna faza se sastojala od vode + 0,1% mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B), koji su eluirani u sledećem gradientu koncentracija: 5% B, 1,0 min; 5 - 95% B, 1,0 - 9,0 min; 95 - 5% B, 9,0 - 9,2 min; 5% B do 13 min (Gašić, 2014b). Protok je bio 0,3 mL/min, talasne dužine 254 i 280 nm, a injekciona zapremina 5 μL.

Snimanje masenih spektara je vršeno u negativnom jonizacionom modu. Parametri jonskog izvora su bili podešeni kao u radu Gašić (2014a). *Xcalibur* softver

(verzija 2.1, Thermo Fisher, Bremen, Nemačka) korišćen je za kontrolu instrumenta, prikupljanje i analizu podataka. Polifenoli su identifikovani na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika: maseni spektar, tačna molekulska masa, karakteristična fragmentacija, kao i karakteristično retenciono vreme. Snimanjem tačne mase molekulskog jona ($[M-H]^-$) nepoznatog jedinjenja dobija se informacija o molekulskoj formuli, dok MS^2 fragmentacija pomaže u razjašnjavanju strukture tog nepoznatog jedinjenja.

3.5.2. Kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja

Razdvajanje i kvantifikacija polifenola u uzorcima meda urađeni su na *Dionex Ultimate 3000 HPLC* sistemu opremljenim sa DAD detektorom koji je povezan na *TSQ Quantum Access Max* maseni spektrometar sa detektorom sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (*UHPLC-DAD MS/MS*, **Slika 6**).



Slika 6. *Ultimate 3000 HPLC-DAD-TSQ Quantum Access Max* maseni spektrometar.

Eluiranje je izvedeno na 40 °C na *Synchronis C18* analitičkoj koloni. Mobilna faza se sastojala od vode + 0,1% sirćetna kiselina (A) i acetonitrila (B), koji su bili u sledećem gradient koncentracije: 5% B, 2,0 min; 5 - 95% B, 2,0 - 12,0 min; 95 - 5% B,

12,0 - 12,2 min; 5% B do 15 min. Protok je bio podešen na 0,3 mL/min, a talasne dužine na 254 i 280 nm. Injekciona zapremina je bila 5 µL.

TSQ Quantum Access Max maseni spektrometar bio je opremljen jonskim izvorom u obliku elektrosprej jonizacije na temperaturi od 200 °C, napon spreja bio je 5 kV i temperatura kapilare 300 °C (Gašić, 2015). Maseni spektrometar je snimao mase u negativnom modu u opsegu od 100 do 1000 *m/z*. U cilju kvantifikacije polifenola za svaki standard posebno je snimljen molekulski jon i dva najintenzivnija fragmenta iz MS² spektra. *Xcalibur* softver (verzija 2.2) korišćen je za kontrolu instrumenta. Polifenoli su identifikovani poređenjem sa komercijalnim standardima. Ukupan sadržaj svakog jedinjenja izračunat je integraljenjem površina pikova i izražen je kao mg/kg.

3.6. Analiza šećera u medu primenom visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD)

3.6.1. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka meda za određivanje šećera jonskom hromatografijom svodi se na rastvaranje meda u ultračistoj vodi do potrebne koncentracije. Odmereno je između 0,2 i 0,3 g homogenizovanog uzorka meda, koji je dalje razblažen ultračistom vodom do finalne koncentracije od oko 0,25 g/L. Potom je rastvor profiltriran kroz špic-filter (13 mm, membrana od PTFE, 0,45 µm) i prebačen u viala za autosempler.

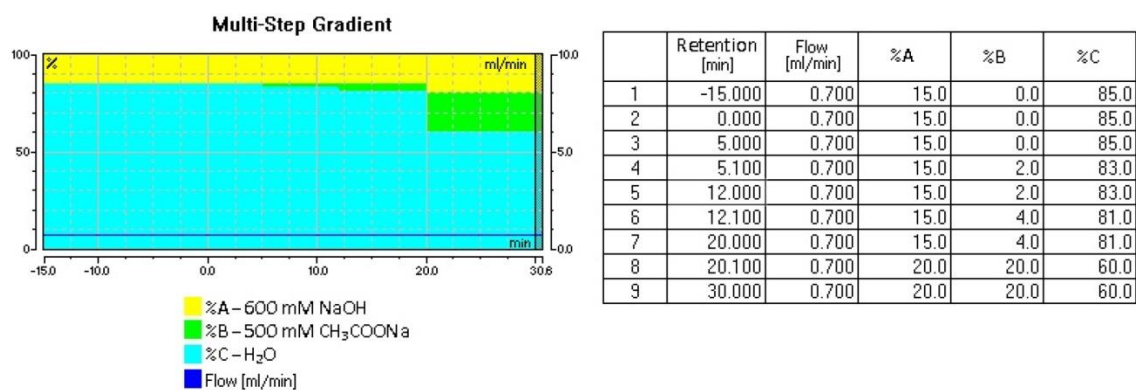
3.6.2. Jonska hromatografija

Identifikacija i kvantifikacija šećera u medu rađena je na sistemu za visoko efikasnu jonoizmenjivačku hromatografiju firme *Dionex* (model ICS 3000, **Slika 7**). Analitička kolona korišćena za razdvajanje šećera bila je *CarboPac* PA100 hidroksid-selektivna anjon-izmenjivačka kolona (4 × 250 mm, od polietaretarketona, PEEK). Stacionarna faza se sastojala od granula prečnika 9 µm izgrađenih od kopolimera etilvinilbenzena i divinilbenzena (masenog udela 55%); dok je jonoizmenjivački sloj derivatizovan alkanol-kvarternim amonijum-grupama. Pretkolona korišćena za dodatno uklanjanje nečistoća iz uzorka meda bila je *CarboPac* PA100 *Guard* kolona (4 × 50 mm). Protok je bio podešen na 0,7 mL/min, dok je eluiranje vršeno sa tri mobilne

faze (600 mM NaOH (A), 500 mM CH₃COONa (B) i ultračista H₂O (C)) gradijentnim programom prikazanim na **Slici 8**.



Slika 7. Primer modernog jonskog hromatografa.



Slika 8. Grafički i tabelarno predstavljen odnos rastvarača prilikom gradijentnog eluiranja uzorka (Gašić, 2014b).

Za detekciju šećera u uzorcima meda korišćen je elektrohemijski (pulsno-amperometrijski) detektor: elektrohemijska ćelija sa podesivim potencijalom, Ag/AgCl referentna elektroda i Au radna elektroda). Softverski paket *Chromleon* (verzija 6,80) korišćen je za kontrolu instrumenta, akviziciju i analizu podataka.

3.7. Određivanje ukupnih fenola (TPC) i antioksidativne aktivnosti (RSA)

Svaki uzorak meda (5 g) je rastvoren u 50 mL ultračiste vode. Rastvor je zatim filtriran kroz 0.45 μm PTFE membranske filtere i kao takav analiziran na sadržaj ukupnih fenola (Total Phenolic Content - TPC), kao i na antioksidativnu aktivnost (Radical Scavenging Activity - RSA) (Gašić, 2014a).

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima meda je određen *Folin-Ciocalteu* metodom. U 0,1 mL prethodno pripremljenog ekstrakta meda dodato je 6 mL ultračiste vode, zatim 0,5 ml *Folin-Ciocalteu* reagensa. Po dodatku reagensa, rastvor je promućkan. Nakon toga, dodato je 1,5 mL 20% rastvora natrijum-karbonata. Rastvor je promešan i inkubiran pola sata na 40 °C. Nakon toga, merena je apsorbancija rastvora na 720 nm na spektrofotometru Cintra 6 (Australia). Napravljena je serija standardnih rastvora galne kiseline: 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm. Vrednost TPC je izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline (mg GAE) po kg meda.

Za određivanje relativne antioksidativne aktivnosti meda DPPH \cdot metodom odmereno je 0,0078 g DPPH i rastvoreno u 250 mL metanola. Apsorbancija sveže spremljenog rastvora je iznosila 0,826. U epruvetu je dodato 0,1 mL prethodno pripremljenog ekstrakta meda i 4 mL rastvora DPPH. Nakon toga, epruvete su promućkane, odložene na tamno mesto i nakon 45 minuta mereno je smanjenje apsorbancije na 517 nm na spektrofotometru Cintra 6 (Australia). Relativna antioksidativna aktivnost je izračunata po jednačini:

$$RSA (\%) = \frac{(A_{DPPH} - A_{sample})}{A_{DPPH}} \times 100$$

gde je A_{DPPH} apsorbancija metanolnog rastvora DPPH; A_{sample} je apsorbancija rastvora uzoraka u prisustvu DPPH. Troloks je upotrebljen kao standard (koncentracije 100, 200, 300, 400, 500, i 600 $\mu\text{mol/L}$) preko koga je izražena vrednost antioksidativne aktivnosti. Kalibraciona kriva je prikazan kao funkcija procenta inhibicije DPPH radikalom. Rezultati su izraženi kao milimoli troloks ekvivalenta po kg meda (mmol TE/kg).

3.8. ICP-EOS analiza minerala u uzorcima meda

U cilju analiziranja mineralnog sastava oko 0,6 do 0,7 g uzorka svežeg meda tretirano je smešom od 7 mL 65% HNO₃ i 1 mL 35% H₂O₂ (Zorka, Šabac) i prebačeno u specijalne PTFE viala za digestiju. Mikrotalasna digestija (ETHOS 1; Mileston, Bergamo, Italija) je korišćena za proces mineralizacije uzorka. Krajnji bistar rastvor je prebačen u normalne sudove od 50 mL i dopunjen do crte sa ultračistom vodom. Slepa proba je pripremljena na isti način, ali bez uzorka meda. Minerali i elementi u tragovima određeni su korišćenjem tehnike indukovano spregnute plazme sa optički emisionom spektrometrijom (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy - ICP-OES; ICAP 6500 Duo ICP, Thermo Scientific, UK). Rezultati su izraženi kao mg minerala po kg meda.

3.9. Statistička obrada rezultata

Analiza glavnih komponenta (*Principal Components Analysis* - PCA) je metoda koja se koristi za redukciju većeg broja promenljivih koje razmatramo, na manji broj novih promenljivih (nazivamo ih glavne komponente). Najčešće manjim brojem glavnih komponenta objašnjavamo pretežan deo varijanse originalnih promenljivih, što omogućuje lakše razumevanje informacije sadržane u podacima. Osnovni zadatak ove tehnike jeste konstruisanje linearne kombinacije originalnih promenljivih (glavnih komponenta), uz uslov da one obuhvataju što je moguće veći iznos varijanse originalnog skupa promenljivih. Sukcesivne glavne komponente izdvajaju se uz ograničenje da su međusobno nekorelisane i da obuhvataju u maksimalnom iznosu preostali deo ukupne varijanse koji nije obuhvaćen prethodno izdvojenim komponentama.

U ovom radu, PCA je izvedena pomoću demo verzije *PLS Toolbox* (*Eigenvectors, Inc.*, verzija 5.7) koji je sastavni deo programa *MATLAB* (verzija 7.4.0.287; R2007a; *MathWorks, Inc., Natick, MA, USA*). Pre bilo kakve statističke obrade podataka sve vrednosti su centrirane oko srednje vrednosti i izvršeno je skaliranje.

4. NAŠI RADOVI

Potvrda autentičnosti meda, kao i njegovog botaničkog i geografskog porekla, može da obezbedi kvalitet meda na tržištu. Karakterizacija botaničkog i geografskog porekla meda je veoma komplikovan proces koji često zahteva korišćenje nekoliko kriterijuma i hemijskih markera, odnosno kombinacije nekoliko analitičkih metoda, kao i odgovarajuće metode statističke analize. U literaturi su već predložena jedinjenja i analitičke tehnike koje se mogu koristiti za procenu botaničkog i geografskog porekla meda. Optimalna metoda za procenu porekla meda mora biti brza i ekonomična, priprema uzoraka meda mora biti brza i automatizovana, što pruža veoma konkretne informacije o botaničkom i geografskom poreklu meda.

U medu je prisutan veliki broj različitih fitohemikalija. Ugljeni hidrati čine oko 80% meda i njihov sastav u medu može varirati u zavisnosti od botaničke vrste medonosne biljke, kao i od klimatskih uslova područja i sastava zemljišta gde se med prikuplja. Od polifenolnih jedinjenja u medu se uglavnom mogu naći flavonoidi i fenolne kiseline. Poznato je da polifenolna jedinjenja imaju različite nutritivne osobine, kao i potencijalnu ulogu u lečenju različitih bolesti, kao i opšti doprinos ljudskom zdravlju. Veliki broj studija koje se bave istraživanjem meda ukazuje da bi polifenoli mogli biti potencijalni markeri botaničkog, a ponekad i geografskog porekla meda. Shodno tome, mnogi naučnici su uključeni u razvoj novih analitičkih metoda za izolovanje i identifikaciju polifenola u medu. Posebno su interesantni retki i neispitani monofloralni medovi, jer u takvim medovima novi potencijalni markeri botaničkog porekla mogu biti identifikovani. Za tu svrhu, napredne tehnike tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom kao detekcijom su veoma primenjive.

4.1. Melizopalinološka analiza

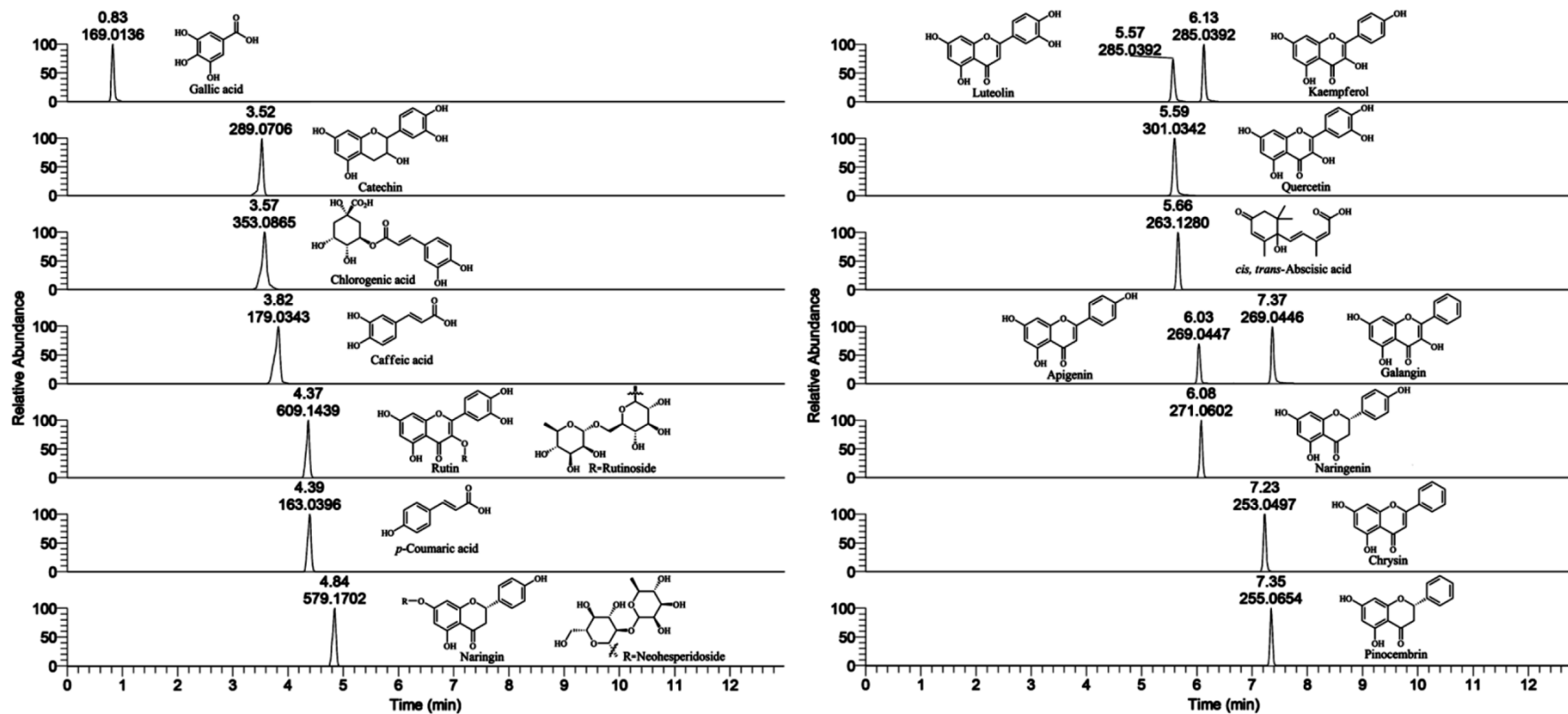
Melizopalinološka analiza potvrdila je % *Tilia* nektara (**Prilog 1**) u svim analiziranim uzorcima lipovog meda. Dok je sadržaj *Salvia officinalis* nektara (**Prilog 2**) u uzorcima medova od žalfije bio nešto niži, ali u skladu sa Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015.

4.2. Analiza polifenola

Za analizu polifenola u uzorcima meda odabran je postupak čvrsto-tečne ekstrakcije iz 0,1 M rastvora hlorovodonične kiseline, opisan u Eksperimentalnom delu. Tako pripremljeni uzorci lipovog meda iz dva regiona u Srbiji, kao i meda od žalfije sa područja Hrvatske, analizirani su na sadržaj polifenola. Za identifikaciju i kvantifikaciju polifenola u lipovom medu korišćen je maseni detektor visoke rezolucije, *LTQ Orbitrap XL*, opisan u Eksperimentalnom delu. Njegove glavne karakteristike su brzo skeniranje, tačnost pri određivanju masa i visoka rezolucija. Za kvantifikaciju polifenola u ispitivanim uzorcima meda od žalfije korišćen je maseni spektrometar sa tri analizatora (*QQQ, Triple Quadrupole*). Maseni spektri standardnih rastvora snimani su pod istim uslovima kao i spektri uzoraka meda, u negativnom jonizacionom modu, $[M-H]^-$.

4.2.1. Polifenolni profil lipovog meda i nektara

Čvrsto-tečna ekstrakcija u kombinaciji sa tehnikom tečno-masene hromatografije korišćena je za određivanje sadržaja flavonoida, fenolnih kiselina i abscisinske kiseline u lipovom medu i nektaru. Sadržaj polifenola ispitan je i kod jednog uzorka nezrelog lipovog meda (uzorak **LH25, Tabela 6**). Ideja je bila da se prate eventualne razlike u polifenolnom profilu između nektara, mladog i zrelog meda od lipe, kao i regionalne sezonske razlike između medova poreklom sa dva lokaliteta u Srbiji. Ukupno 16 jedinjenja (**Slika 9**) je kvantifikovano poređenjem retencionih vremena i masenih spektara uzoraka sa dostupnim standardima. Regresioni parametri, koeficijent determinacije, granice detekcije i kvantifikacije, kao i efikasnost metode na tri koncentraciona nivoa dati su u **Tabeli 7**. Uzorci lipovog meda (zrelog i nezrelog) pokazuju slične polifenolne profile, dok se nektar lipe značajno razlikuje (**Tabela 8**). U svim ispitivanim uzorcima meda pronađene su znatne količine hrizina, pinocembrina i galangina. Abscisinska kiselina, biljni hormon, pronađena je takođe u svim uzorcima, u rasponu od 55 do 360 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Sadržaj *cis, trans*-abscisinske kiseline je bio znatno veći u uzorcima meda od lipe poreklom sa Fruške Gore (**Slika 10**). Odsustvo hrizina, pinocembrina i galangina u lipovom nektaru je očekivano jer se zna da u med dospevaju iz propolisa (Tomás-Barberán, 2001). Slični polifenoli su pronađeni u slovenačkom lipovom medu (Bertoncelj, 2011).



Slika 9. Retenciona vremena, tačne mase u negativnom jonizacionom modu (m/z) i strukture polifenolnih jedinjenja i abscisinske kiseline identifikovanih u lipovom medu iz Srbije.

Tabela 7. Regresioni parametri, koeficijent determinacije, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) i efikasnost metode na tri koncentraciona nivoa; SE – standardna greška.

Jedinjenje	Y = A + BX ($\times 10^5$)		R^2	GD (mg/L)	GK (mg/L)	Efikasnost (“recovery”), %		
	(A \pm SE)	(B \pm SE)				Nivo 1	Nivo 2	Nivo 3
Galna kiselina	-2,10 \pm 0,58	334,68 \pm 1,12	0,9903	0,09	0,30	109	107	93
Hlorogena kiselina	-2,32 \pm 1,13	286,00 \pm 2,08	0,9997	0,02	0,07	115	93	98
Katehin	-1,72 \pm 0,70	107,71 \pm 1,35	0,9943	0,07	0,23	95	114	108
Kofeinska kiselina	0,20 \pm 1,60	417,02 \pm 3,24	0,9997	0,02	0,07	112	105	105
Rutin	-1,22 \pm 1,31	206,49 \pm 2,31	0,9994	0,03	0,11	119	113	81
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,43 \pm 0,50	4,17 \pm 0,12	0,9977	0,07	0,22	87	110	106
Naringin	-0,64 \pm 0,48	112,09 \pm 0,91	0,9939	0,08	0,27	89	105	96
Kvercetin	-11,52 \pm 2,86	319,38 \pm 4,92	0,9988	0,05	0,16	85	104	86
<i>cis, trans</i> -Abscisinska kis.	-0,85 \pm 0,26	21,04 \pm 0,41	0,9985	0,05	0,18	99	112	108
Luteolin	-4,34 \pm 2,99	423,84 \pm 5,75	0,9991	0,04	0,13	102	104	97
Naringenin	-1,13 \pm 0,37	49,01 \pm 0,72	0,9991	0,04	0,13	104	95	107
Apigenin	-4,31 \pm 0,76	192,40 \pm 1,46	0,9997	0,02	0,07	83	98	86
Kampferol	-5,08 \pm 1,43	197,97 \pm 2,58	0,9991	0,04	0,12	101	108	99
Hrizin	-2,29 \pm 0,80	76,88 \pm 1,59	0,9979	0,06	0,19	106	90	97
Pinocembrin	-1,48 \pm 0,41	103,15 \pm 0,79	0,9997	0,02	0,07	87	96	93
Galangin	-29,45 \pm 3,17	994,97 \pm 6,35	0,9998	0,01	0,05	106	121	99

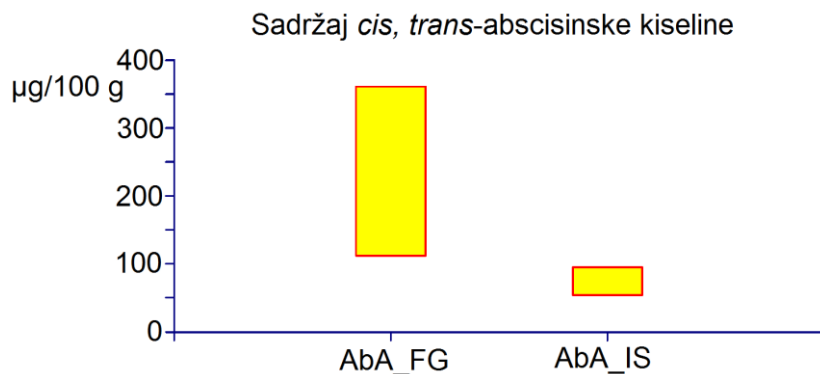
Tabela 8. Sadržaj nekih polifenola i abscisinske kiseline u zrelom i nezrelom lipovom medu i nektaru ($\mu\text{g}/100\text{g}$).

Br.	GaA	ChA	C	CaA	RUT	CoA	NAR	QUE	AbA	LUT	NAN	API	KAE	CHR	PNC	GLN
LH1	0,31	–	–	22,22	–	16,91	–	1,60	85,91	5,01	–	7,70	1,66	230,34	43,17	191,93
LH2	0,31	–	–	6,69	0,11	3,07	–	0,33	77,61	1,14	–	2,41	0,76	168,21	35,18	85,85
LH3	0,69	–	–	21,14	0,17	18,57	–	0,92	83,97	2,89	–	6,89	2,26	205,02	56,22	255,89
LH4	–	–	–	12,26	0,10	12,94	–	0,66	77,19	1,91	–	5,72	2,21	204,97	50,87	190,64
LH5	–	1,33	–	9,10	0,05	16,75	–	1,11	53,23	3,05	–	14,99	3,20	212,63	60,68	177,89
LH6	–	–	–	18,94	–	20,43	–	0,16	75,32	1,56	–	3,02	0,47	188,28	20,74	62,86
LH7	1,53	–	–	22,41	0,70	–	–	1,39	74,97	3,09	–	4,92	1,98	192,43	44,22	143,93
LH8	6,32	–	29,59	0,50	–	5,81	–	–	140,18	–	–	2,40	3,74	192,35	211,65	5,60
LH9	72,72	–	2,46	80,67	–	71,51	2,26	5,47	279,35	0,55	–	13,96	5,47	278,20	198,08	88,20
LH10	47,93	–	2,24	77,51	–	81,58	4,58	3,29	275,02	1,05	1,10	11,40	4,95	238,63	182,30	86,17
LH11	12,16	–	2,65	4,16	–	16,02	2,09	–	226,51	–	–	4,48	0,34	227,50	203,48	18,22
LH12	30,59	0,68	16,10	21,76	–	47,63	6,63	–	237,13	–	1,61	2,76	–	172,99	48,17	10,81
LH13	20,10	–	18,36	1,67	–	10,01	–	–	176,77	–	–	1,26	–	128,05	36,81	1,36
LH14	6,08	–	10,39	39,29	–	28,00	2,85	–	175,71	–	0,40	1,52	–	120,24	10,51	1,28

Tabela 8. Nastavak.

Br.	GaA	ChA	C	CaA	RUT	CoA	NAR	QUE	AbA	LUT	NAN	API	KAE	CHR	PNC	GLN
LH15	10,05	–	5,42	0,61	–	10,00	1,96	–	153,34	–	0,43	0,79	–	87,88	24,57	0,54
LH16	6,18	2,59	9,38	10,84	–	31,68	2,10	–	148,34	–	0,27	3,73	–	152,45	63,27	13,21
LH17	0,86	2,74	17,71	–	–	3,26	–	–	125,93	–	0,50	–	–	28,62	8,59	–
LH18	6,62	–	17,97	0,25	–	10,14	2,23	–	229,69	–	0,47	1,69	–	201,70	85,94	2,22
LH19	31,07	1,50	4,19	54,12	–	44,15	1,73	0,52	256,44	0,65	0,14	6,75	0,71	247,13	83,92	37,94
LH20	3,73	0,63	1,06	15,15	–	34,31	3,17	6,28	243,74	0,50	–	16,18	11,16	250,76	283,83	101,22
LH21	80,07	0,83	6,95	207,92	1,24	166,36	–	7,54	285,28	2,45	–	36,07	31,41	278,89	336,90	195,68
LH22	172,04	–	–	96,84	0,54	130,57	–	3,25	215,09	3,74	–	55,65	37,46	348,75	477,58	206,35
LH23	49,08	1,54	4,12	95,52	–	79,57	–	3,05	358,03	0,31	–	7,02	4,00	220,19	177,72	76,02
LH24 ^a	1,88	–	–	48,94	–	38,51	1,15	5,69	130,40	0,70	–	23,54	11,46	337,94	444,31	123,58
LH25 ^b	–	–	–	58,94	12,11	125,96	–	–	230,64	3,06	0,66	66,84	60,21	275,48	101,96	150,94
LH26 ^c	–	0,02	2,38	–	1,31	–	–	–	0,33	0,93	–	–	0,10	1,01	0,34	0,37

GaA – Galna kiselina; ChA – Hlorogena kiselina; C – Katehin; CaA – Kofeinska kiselina; RUT – Rutin; CoA – *p*-Kumarinska kiselina; NAR – Naringin; QUE – Kvercetin; AbA – *cis, trans*-Abscisinska kiselina; LUT – Luteolin; API – Apigenin; NAN – Naringenin; KAE – Kampferol; CHR – Hrizin; PNC – Pinocembrin; GLN – Galangin; ^aPrilikom proizvodnje ovog meda pčele su prehranjivane šećernim pogačama, ^bNezreo (mlad) lipov med, ^cNektar cveta lipe.



Slika 10. Grafički prikazana koncentracija *cis, trans*-abscisinske kiseline (AbA) u medu od lipe (FG – Fruška Gora, 125 – 360 µg/100 g; IS – Istočna Srbija, 55 – 85 µg/100 g).

Postoje razlike u polifenolnom profilu medova lipe prikupljenih u Istočnoj Srbiji u odnosu na medove poreklom sa Fruške gore, a ogledaju se u prisustvu katehina, naringina i naringenina samo u medovima sa Fruške gore. Polifenolni profil meda (uzorak **LH24**) iz košnice u kojoj su pčele prehranjivane šećernim pogačama se ne razlikuje značajno od ostalih uzoraka (**Tabela 8**).

U nedostatku standarda, 15 flavonoid-glikozida je identifikovano na osnovu tačne mase $[M-H]^-$ deprotonovanog molekula i njegove MS^2 fragmentacije (**Tabela 9**). Kvalitativna slika dobijena u slučaju nektara se razlikuje od uzoraka zrelih medova, što je i očekivano, jer pčele u med unose svoje enzime, koji veoma utiču na hemijski sastav zrelog meda. Pod uticajem enzima može doći do hidrolize flavonoid-glikozida, a njihovi aglikoni su detektovani i okarakterisani u zreлом medu. Poznato je da flavonoid-ramnozidi i rutinozidi ne mogu biti hidrolizovani pomoću glukozidaze prisutne u pčelinjoj pljuvački (Truchado, 2009). Takva jedinjenja su pronađena u uzorku nezrelog meda, a takođe i u zrelih medovima.

Hemijski sastav meda veoma zavisi od vrste medonosnih biljaka sa kojih su pčele prikupljale nektar, a takođe i od karakteristika tla na kojem se nalaze košnice i od klimatskih uslova (Kaškonienė i Venskutonis, 2010). Kada se posmatra sezonska varijabilnost u uzorcima zrelih medova, mogu se uvideti razlike u količinama galne, kofeinske i *cis, trans*-abscisinske kiseline, apigenina, hrizina, pinocembrina i galangina. Sadržaj polifenola u uzorcima prikupljenih 2011. godine razlikovao se od ostalih analiziranih uzoraka, što ukazuje na značaj uslova sredine na polifenolni profil meda.

Tabela 9. Identifikovani flavonoid-glikozidi u lipovom medu i nektaru iz Srbije: ime jedinjenja, retencino vreme (t_R), izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i MS² fragmenti.

Jedinjenje	t_R , min	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	ppm	MS ² Fragmenti	Zreo med	Nezreo med	Nektar
Kampferol-3-O-glukozil-ramnozil-glukozid	5,09	755,20269	755,20203	0,87	593,15, 447,09, 285,04	+	+	+
Kvercetin-3-O-ramnozil-galahtozid	5,12	609,14524	609,14392	2,17	447,09, 301,03	-	-	+
Kvercetin-3-O-soforozid	5,14	625,14060	625,13910	2,40	463,09, 301,03	-	-	+
Izoramnetin-3-O-soforozid	5,31	639,15622	639,15443	2,81	459,09, 315,05	+	+	+
Kampferol-3,7-O-diglukozid	5,37	609,14522	609,14429	1,53	447,09, 285,04	-	+	+
Izoramnetin-3-O-rutinozil-7-O-glukozid	5,41	785,21371	785,21271	1,27	623,16, 461,11, 315,05	+	+	+
Kvercetin 3-O-ramnozil-ramnozil-glukozid	5,51	755,20401	755,20294	1,42	593,15, 447,09, 301,03	+	+	+
Izoramnetin-3-O-ramnozil-galaktozid	5,52	623,16086	623,15973	1,81	461,11, 315,05	+	+	+
Kvercetin-3-O-rutinozid (Rutin)	5,53	609,14611	609,14539	1,18	463,09, 301,03	+	+	+
Kvercetin-3-O-glukozid	5,75	463,08777	463,08633	3,11	301,03	-	-	+
Kvercetin-3-O-(6"-malonil-glukozid)	5,90	549,08861	549,08844	0,31	301,03	-	-	+
Izoramnetin-3-O-galaktozid	5,98	477,10340	477,10269	1,49	315,05	+	+	+
Kampferol-3-O-glukozid	6,05	447,09284	447,09210	1,66	285,04	-	+	+
Kampferol-3-O-ramnozid	6,51	431,09792	431,09708	1,95	285,04	+	+	+
Izoramnetin-3-O-glukozid	6,52	477,10340	477,10272	1,43	315,05	+	+	+

U literaturi postoji nekoliko radova koji se bave polifenolnim profilom cveta lipe (Wichtl, 2004; Kosakowska, 2015). Poljski naučnici su ispitali sadržaj fenolnih jedinjenja (fenolnih kiselina i flavonoida) u cvetu samonikle lipe (*Tilia cordata* Mill.). Među četiri identifikovane fenolne kiseline vanilinska kiselina bila je najdominantnija. U cvetu od lipe se mogu naći i hlorogena i kofeinska kiselina, a njihovo prisustvo je primećeno u značajnom broju uzoraka meda od lipe. Pronađeno je i devet flavonoida, a rutin i (-)-epikatehin bili su najzastupljeniji (Kosakowska, 2015). Isti autori navode da se se u ekstraktu cveta lipe mogu naći kvercetin i kampferol U našim uzorcima rutina i kampferola je najviše bilo u uzorku **LH25** (nezreo lipov med).

4.2.2. Polifenolni profil meda od žalfije

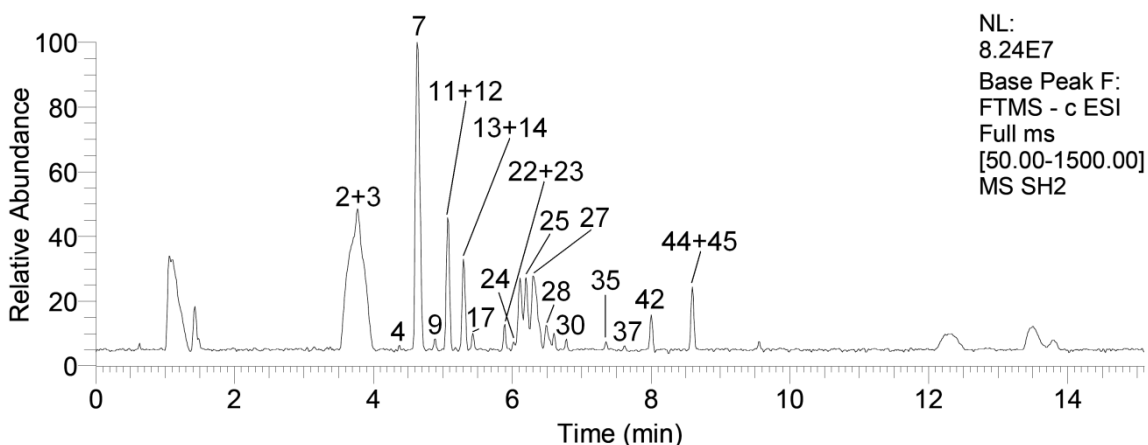
Monofloralni medovi gotovo nikad nisu 100% poreklom od nektara jedne biljke, jer je nemoguće sprečiti pčelu da posećuje sve medonosne biljke koje cvetaju u datom trenutku (Persano Oddo i Bogdanov, 2004). Med koji sadrži najmanje 15% polena (nektara) biljke *Salvia officinalis* može se smatrati medom od žalfije. Polifenolna jedinjenja, kao što su flavonoidi (Kenjeric, 2008), ugljeni hidrati (Primorac, 2011) i isparljiva jedinjenja (Jerković, 2006) su ranije predloženi kao mogući markeri za utvrđivanje botaničkog porekla meda od žalfije.

Ekstrakt lista žalfije sadrži širok spektar polifenolnih jedinjenja, većinom derivata kofeinske kiseline. Ruzmarinska, siringinska, galna, *p*-kumarinska, kofeinska i *trans*-ferulinska kiselina su navedene kao glavne fenolne kiseline koje se mogu naći u ekstraktu žalfije (Generalić, 2011). Relativni sadržaj ruzmarinske kiseline, koja je najzastupljenija fenolna kiselina u ekstraktu žalfije, se kretao od 94,54% do 98,38%, dok je sadržaj ostalih kiselina bio značajno niži (Generalić, 2012). Druge studije navode prisustvo vanilinske kiseline, salvianolinske kiseline K i I i metil-ruzmarinata u ekstraktu divlje žalfije (Dragović-Uzelac, 2012; Dent, 2013). Saglasno navodima nekoliko autora, iz porodice flavonoida u *Salvia officinalis* ekstraktu se uglavnom mogu naći flavoni (apigenin, luteolin i neki njihovi hidroksi derivati), flavon glikozidi (6-hidroksiluteolin-7-glukozid, luteolin-7-glukuronid, luteolin-7-glukozid, luteolin-3'-glukozid, apigenin-7-glukuronid i apigenin-7-glukozid), flavonoli (uglavnom metil-etri kampferola i kvercetina) i flavonol glikozidi (kvercetin-4'-glukozid, rutin) (Generalić,

2011; Dragović-Uzelac, 2012). Stilbeni (*trans*-resveratrol, astringin i piceid), katehin i epikatehin (Generalić, 2012) su takođe prisutni.

Ova doktorska disertacija daje uvid u polifenolni profil monofloralnog meda od žalfije koristeći metabolomički pristup, što je rezultiralo identifikacijom značajnog broja polifenolnih jedinjenja. Hromatogrami ispitivanih uzoraka meda od žalfije pokazuju slične polifenolne profile. Na **Slici 11** prikazan je totalni jonski hromatogram (*Total Ion Chromatogram* – TIC) ekstrakta jednog hrvatskog meda (uzorak **SH2**) od žalfije. U odsustvu standarda, identifikacija flavonoid-glikozida i drugih polifenola je definisana na osnovu tačne masei deprotonovanog molekula i njegove MS² fragmentacije korišćenjem UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS tehnike. Na ovaj način bilo je moguće identifikovati 61 jedinjenje (**Tabela 10**).

Nekoliko derivata hidroksicimetine kiseline (kofeinska, ruzmarinska, ferulinska, hlorogena i *p*-kumarinska kiselina) su identifikovani u ispitivanim uzorcima meda od žalfije. Od derivata hidroksibenzoeve kiseline pronađene su *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, gentizinska i protokatehinska kiselina, što je i u skladu sa literaturom (Zgórka i Głowniak, 2001). Sve navedene fenolne kiseline se smatraju potencijalnim markerima autentičnosti meda od žalfije i stoga su uključene u ciljanu kvantitativnu analizu uzoraka meda.



Slika 11. Polifenolni profil ekstrakta meda od žalfije (uzorak **SH2**). Brojevi iznad pikova odgovaraju brojevima jedinjenja u **Tabeli 10**.

Tabela 10. Identifikovana polifenolna jedinjenja u hrvatskom medu od žalfije: ime jedinjenja, retencino vreme (t_R), izračunata masa, nađena masa, srednje odstupanje masa (ppm) i MS² fragmenti.

Br.	Jedinjenje	t_R , min	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	ppm	MS ² Fragmenti
1	Galna kiselina ^a	2,55	169,01392	169,01425	1.95	125
2	Galokatehin ^a	3,96	305,06583	305,06668	2.79	219, 261
3	Salvianinska kiselina A	3,97	197,04520	197,04555	1.78	179, 153, 123
4	Protokatehinska kiselina ^a	4,34	153,01903	153,01933	1.96	109
5	Hlorogena kiselina (izomer 1)	4,48	353,08716	353,08781	1.84	191, 179, 146
6	Kofeoil-heksozid	4,52	341,08716	341,08781	1.91	179
7	Epigalokatehin ^a	4,65	305,06589	305,06668	2.59	219, 261
8	Dimethoksibenzoeva kiselina	4,75	181,05025	181,05063	2.10	151, 137
9	Katehin ^a	4,92	289,07095	289,07176	2.80	159, 123
10	Eriodiktiol-rutinozid	5,01	595,16644	595,16684	0.67	449, 287
11	Hlorogena kiselina ^a	5,04	353,08682	353,08781	2.80	191, 179, 146
12	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina ^a	5,09	137,02425	137,02442	1.24	93
13	Feruloil-heksozid (izomer 1)	5,30	355,10229	355,10346	3.29	193
14	Epikatehin ^a	5,32	289,07114	289,07176	2.14	159, 123

Tabela 10. Nastavak.

Br.	Jedinjenje	t_R , min	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	ppm	MS ² Fragmenti
15	Galokatehin galat ^a	5,34	457,07703	457,07763	1.31	305
16	Hlorogena kiselina (izomer 2)	5,37	353,08710	353,08781	2.01	191, 179, 146
17	Kumaroil-heksozid	5,39	325,09213	325,09289	2.34	163
18	Epigalokatehin galat ^a	5,46	457,07690	457,07763	1.60	305
19	Kofeinska kiselina ^a	5,48	179,03476	179,03498	1.23	135, 161
20	Feruloil-heksozid (izomer 2)	5,61	355,10260	355,10346	2.42	193
21	Rutin ^a	5,94	609,14490	609,14611	1.99	463, 301
22	Gentizinska kiselina ^a	5,96	153,01900	153,01933	2.16	109
23	Luteolin-rutinozid	5,97	593,15045	593,15119	1.25	447, 285
24	Izoramnetin-rutinozid	6,03	623,16040	623,16176	2.18	461, 315
25	Kvercetin-heksozid	6,07	463,08691	463,08820	2.79	301
26	Elaginska kiselina ^a	6,16	300,99847	300,99899	1.73	283, 200, 175
27	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ^a	6,25	163,03984	163,04007	1.41	119
28	Taksifolin	6,47	303,05023	303,05103	2.64	285, 269, 255, 217
29	Ferulinska kiselina ^a	6,70	193,05014	193,05063	2.54	175, 139
30	Ruzmarinska kiselina ^a	6,79	359,07635	359,07724	2.48	197, 179, 161

Tabela 10. Nastavak.

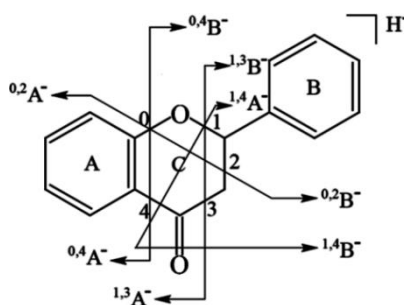
Br.	Jedinjenje	t_R , min	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	ppm	MS ² Fragmenti
31	Apigenin-rutinozid	6,83	577,15521	577,15628	1.85	431, 269
32	Apigenin-heksozid (izomer 1)	6,92	431,09775	431,09837	1.44	269
33	Luteolin-heksozid	6,93	447,09274	447,09329	1.23	285
34	Eriodiktiol	7,14	287,05551	287,05611	2.09	125
35	<i>trans, trans</i> -Abscisinska kiselina	7,44	263,12814	263,12888	2.81	191, 179
36	Apigenin-heksozid (izomer 2)	7,52	431,09778	431,09837	1.37	269
37	Monohidroksibenzoeva kiselina	7,70	137,02423	137,02442	1.39	93
38	<i>cis, trans</i> -Abscisinska kiselina ^a	7,73	263,12833	263,12888	2.09	191, 179
39	Luteolin ^a	7,75	285,03989	285,04046	2.00	213, 151
40	Kvercetin ^a	7,80	301,03445	301,03538	3.09	151, 179, 121
41	Resveratrol ^a	7,85	227,07056	227,07137	3.57	209
42	Sakuranetin	8,06	285,07623	285,07685	2.17	133
43	Apigenin ^a	8,44	269,04477	269,04555	2.90	149, 151, 173, 183
44	Kampferol ^a	8,57	285,03970	285,04046	2.67	199, 161, 151, 135
45	Ramnetin	8,57	315,04996	315,05103	3.40	300, 165, 121
46	Hispidulin	8,66	299,05527	299,05611	2.81	284

Tabela 10. Nastavak.

Br.	Jedinjenje	t_R , min	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nađena masa, [M-H] ⁻	ppm	MS ² Fragmenti
47	Pinobanksin ^a	8,67	271,06067	271,06120	1.96	253, 243, 165, 151, 107
48	Izoramnetin	8,73	315,05057	315,05103	1.46	300, 151, 107
49	Hesperetin ^a	8,77	301,07101	301,07176	2.49	271, 161
50	Kvercetin dimetil-etar (izomer 1)	8,98	329,06656	329,06668	0.36	315, 165
51	Kvercetin dimetil-etar (izomer 2)	9,64	329,06586	329,06668	2.49	315, 166
52	Pinostrobin ^a	9,83	269,08121	269,08193	2.68	151, 179
53	Prenil kofeat	9,85	247,09703	247,09758	2.23	135, 179
54	Hrizin ^a	10,07	253,05009	253,05063	2.13	101, 151, 181, 209, 143
55	Pinocembrin ^a	10,09	255,06563	255,06628	2.55	213, 211, 151
56	Akacetin	10,14	283,06094	283,06120	0.92	268, 133, 151, 107
57	Fenethyl ester kofeinske kiseline	10,15	283,09714	283,09758	1.55	135, 179
58	Galangin ^a	10,25	269,04489	269,04555	2.45	151, 183
59	Genkvanin	10,62	283,06042	283,06120	2.76	268, 239, 211
60	Karnozol ^a	11,72	329,17487	329,17583	2.92	311, 296
61	Karnozinska kiselina ^a	12,81	331,19061	331,19148	2.63	287, 269

^aIdentifikovano na osnovu dostupnog standarda.

Većina flavonoida koji se nalaze u ekstraktu biljke *Salvia officinalis* (apigenin, luteolin, hispidulin, cirsimaritin i hesperetin) su takođe identifikovani u analiziranim uzorcima meda (Brieskorn i Biechele, 1971; Cuvelier, 1996; Lu i Yeap Foo, 2002; Kontogianni, 2013). Prilikom identifikacije flavonoida u negativnom modu, fragmenti nastaju gubitkom funkcionalnih grupa kao što su H₂O (−18 Da), CO (−28 Da), C₂H₂O (−42 Da), i CO₂ (−44 Da). Metilovani ili metoksilovani flavonoidi su karakteristični po gubitku CH₃ grupe (−15 Da) (de Rijke, 2006). Za analizu fragmentacionog puta flavonoida najkorisniji su oni fragmenti koji nastaju u *Retro-Diels-Alder*-ovoj (RDA) reakciji i ovaj način fragmentacije je dobro opisan u literaturi (Ma, 1997). U flavanskoj strukturi postoje tri prstena obeležena sa A, B, i C, a dobijeni RDA fragmenti sa [^{i,j}A][−] i [^{i,j}B][−] (Slika 12). Veze na C-prstenu obeležene su brojevima od 0 do 4, radi lakšeg numerisanja fragmenata. Tako, na primer, [^{1,3}A][−] fragmentacioni jon koji nastaje prilikom RDA fragmentacije nesupstituisanih flavona, flavonola, flavanona i flavanonola iznosi 151 *m/z* (Ma, 1997).



Slika 12. Fragmentacioni put flavonoida po RDA reakciji (Ma, 1997).

Od flavonoid-glikozida pronađeni su derivati luteolina i apigenina. Prisustvo 6-hidroksi- i 6-metoksi-flavon-glikozida je tipično za rod *Salvia* (Tomás-Barberán, 1988). Stoga, prisustvo ovih jedinjenja u medu može biti jedan od indikatora da je zaista u pitanju med cvetnog porekla od žalfije. Od flavonola identifikovani su kampferol i kvercetin metil-etri, kvercetin i hesperetin. Pored flavonoida, resveratrol i katehini su takođe ranije identifikovani u ispitivanim uzorcima meda (Generalić, 2011). Sledeći derivati katehina su pronađeni u uzorcima meda od žalfije: katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin, galokatehin galat i epigalokatehin galat.

Fenolni diterpeni, karnozol i karnozinska kiselina, za koje je poznato da su prisutni u ekstaktu žalfije (Kontogianni, 2013), nisu prethodno otkriveni u medu od žalfije. U ovoj studiji, data jedinjenja su identifikovana u svim uzorcima, ali u tragovima (**Tabela 10**).

Detektor sa više dioda (DAD) i maseni spektrometar sa tri analizatora (QQQ) korišćeni su za kvantifikaciju 25 ciljanih polifenola u ispitivanim uzorcima meda od žalfije. Kvantifikacija polifenola je rađena tako što su u postavljenim uslovima (jonizacioni mod, pritisak gasa, voltaža i drugi parametri jonskog izvora) za svako jedinjenje prvo definisana dva najintenzivnija jona iz MS² spektra, kao i kolizione energije na kojima ti joni nastaju. Parametri ove metode (retenciono vreme, mase molekulsih jona i fragmenata), koeficijenti determinacije kalibracionih prava, granice detekcije i kvantifikacije, kao i efikasnost metode prikazani su u **Tabeli 11**.

Među kvantifikovanim jedinjenjima u uzorcima meda od žalfije, neke fenolne kiseline (*p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzoeva i ferulinska kiseline) bile su prisutne u većim količinama. Zanimljivo je bilo to što je ruzmarinska kiselina bila prisutna u relativno malim količinama u analiziranim medovima (**Tabela 12**). Mogući razlog za to mogu biti relativno niske koncentracije ovog jedinjenja u nektaru. Gentizinska kiselina je detektovana samo u 3 uzorka (**SH8**, **SH15** i **SH18**). Stilben-resveratrol je otkriven samo u 4 uzorka meda (**SH2**, **SH5**, **SH16** i **SH17**). Galokatehin-galat i epigalokatehin-galat su bili najzastupljeniji iz grupe katehina. Sadržaj katehina i epikatehina bio je nizak. Uzorci medova od žalfije analiziranih u ovoj studiji su karakterični po značajnim količinama pinobanksina (0,21-2,35 mg/kg), hrizina (0,06-1,98 mg/kg) i abscisinske kiseline (0,26-3,99 mg/kg).

4.3. Analiza šećera

Šećeri u medu su određeni korišćenjem *HPAEC-PAD* tehnike. Kvantifikacija je izvršena sa dostupnim standardima šećera i šećernih alkohola. Redukujući šećeri, glukoza i fruktoza, bili su glavni sastojci svih ispitivanih uzoraka meda, a njihovi iznosi bili su u skladu sa propisom Evropske unije (EU) (Direktiva 2001/110/EC).

Tabela 11. Validacija metode za kvantifikaciju polifenola: zadata masa, produkt-joni sa kolizionom energijom, srednje retenciono vreme (t_R), koeficijent determinacije, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) i efikasnost metode na dva koncentraciona nivoa.

Jedinjenje	Zadata masa, m/z	Produkt joni, m/z (koliziona energija, eV)	t_R , min	R^2	GD, mg/L	GK, mg/L	Efikasnost (“recovery”), %	
							Nivo 1	Nivo 2
GaA	169,032	79,11 (31); 125,04 (16)	1,98	0,9911	0,16	0,55	29	37
GC	305,120	125,22 (27); 179,19 (17)	3,87	0,9996	0,03	0,10	92	106
PrA	153,013	108,09 (23); 109,10 (14)	3,98	0,9980	0,10	0,34	103	68
EGC	305,110	125,22 (27); 179,19 (17)	5,07	0,9999	0,01	0,02	96	112
HbA	137,057	93,19 (19); 108,33 (22)	5,08	0,9934	0,14	0,48	100	101
GeA	153,003	108,07 (5); 109,10 (15)	5,18	0,9998	0,02	0,06	51	59
ChA	353,103	191,28 (25)	5,23	0,9980	0,08	0,27	116	109
C	289,094	203,00 (23); 245,03 (31)	5,25	0,9953	0,14	0,45	111	105
CaA	179,004	134,00 (13); 135,00 (16)	5,51	0,9951	0,11	0,38	111	111
EC	289,084	203,00 (23); 245,03 (31)	5,25	0,9991	0,06	0,19	84	89
GCG	457,146	161,08 (25); 359,23 (16)	5,82	0,9930	0,07	0,22	85	67
CoA	163,031	93,12 (39); 119,09 (16)	6,15	0,9947	0,12	0,41	111	117
FeA	193,057	134,00 (18); 178,00 (15)	6,55	0,9933	0,15	0,50	101	95

Tabela 11. Nastavak.

Jedinjenje	Zadata masa, m/z	Produkt joni, m/z (koliziona energija, eV)	t_R , min	R^2	GD, mg/L	GK, mg/L	Efikasnost ("recovery"), %	
							Nivo 1	Nivo 2
RoA	359,061	133,00 (43); 161,00 (21)	6,70	0,9968	0,08	0,26	59	64
EGCG	457,156	161,08 (25); 359,23 (16)	6,81	0,9928	0,15	0,51	70	73
AbA	263,110	153,18 (5); 219,44 (16)	7,54	0,9987	0,02	0,07	97	101
RES	227,060	143,18 (22); 185,04 (22)	7,85	0,9925	0,14	0,45	73	77
KAE	285,074	211,00 (32); 227,00 (32)	8,29	0,9961	0,04	0,13	95	86
PNB	271,020	197,00 (32); 253,00 (32)	8,34	0,9956	0,03	0,10	91	84
QUE	301,016	125,00 (20); 151,00 (29)	8,37	0,9978	0,08	0,27	111	98
CHR	253,054	119,00 (36); 143,00 (30)	9,54	0,9948	0,03	0,10	106	102
PNS	269,100	165,06 (22); 226,11 (22)	9,55	0,9959	0,04	0,13	100	90
PNC	255,081	150,93 (25); 213,04 (25)	9,56	0,9936	0,04	0,14	112	98
HES	301,010	151,01 (26); 164,00 (27)	9,57	0,9978	0,03	0,10	95	86
GLN	269,037	169,00 (32); 171,00 (32)	9,67	0,9959	0,03	0,11	113	90

GaA – Galna kiselina; **GC** – Galokatehin; **PrA** – Protocatehinska kiselina; **EGC** – Epigallocatehin; **GeA** – Gentizinska kiselina; **HbA** – *p*-Hidroksibenzoeva kiselina; **ChA** – Hlorogena kiselina; **C**– Katehin; **CaA** – Kofeinska kiselina; **GCG** - Galocatehin galat; **EC** – Epikatehin; **CoA** – *p*-Kumarinska kiselina; **FeA** – Ferulinska kiselina; **RoA** – Ruzmariniska kiselina; **EGCG** - Epigallocatehin galat; **AbA** – *cis, trans*-Abscisinska kiselina; **RES** – Resveratrol; **KAE** – Kampferol; **PNB** – Pinobanksin; **QUE** – Kvercetin; **CHR** – Hrizin; **PNS** – Pinostrobin; **PNC**– Pinocembrin; **HES** – Hesperetin; **GLN** – Galangin.

Tabela 12. Sadržaj nekih polifenola i abscisinske kiseline u zrelom i medu od žalfije (mg/100 g).

	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	SH12	SH13	SH14	SH15	SH16	SH17	SH18
GaA	–	0,15	0,13	0,12	0,12	0,18	0,16	0,19	–	0,13	–	0,12	–	0,17	0,13	0,15	0,12	–
GC	–	0,49	0,15	0,19	0,16	0,16	–	–	0,16	0,22	0,16	0,15	–	–	–	0,20	0,26	0,37
PrA	0,34	0,70	0,74	0,54	0,25	0,34	0,31	0,68	0,62	0,48	0,49	0,14	0,31	0,42	0,33	0,39	0,44	0,68
EGC	0,12	–	0,46	0,10	0,08	0,12	0,08	0,10	0,14	0,14	0,09	0,07	0,16	0,08	0,08	–	0,24	0,16
HbA	–	–	–	–	–	–	–	0,13	–	–	–	–	–	–	0,01	–	–	0,02
GeA	1,89	1,93	1,61	1,25	1,82	1,45	3,28	2,18	1,36	1,82	1,20	0,81	1,34	1,55	2,06	1,73	1,66	2,36
ChA	–	0,04	0,01	0,10	0,22	–	0,02	0,05	0,26	0,09	0,04	0,03	0,07	–	–	0,10	0,03	–
C	0,12	0,03	0,15	0,09	–	–	–	–	0,05	0,01	0,04	–	0,05	–	–	0,01	0,06	–
CaA	0,48	1,89	0,56	0,37	0,48	0,59	0,57	0,92	0,54	0,64	0,61	0,62	0,37	0,38	0,47	0,70	0,55	0,26
EC	0,82	0,74	0,75	–	–	–	1,15	1,05	0,72	0,70	0,72	0,69	0,81	0,69	0,71	0,69	0,73	1,03
GCG	0,10	–	0,03	0,06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,05	0,07	–
CoA	2,73	3,11	3,45	1,89	2,01	1,36	3,62	2,78	2,81	1,39	1,82	2,51	1,03	0,77	0,92	1,62	2,68	1,10
FeA	0,64	1,54	3,09	0,97	0,44	0,50	1,01	4,39	1,31	0,34	0,51	0,77	0,6	0,16	0,83	0,53	0,67	1,40
RoA	–	0,21	0,01	0,21	0,37	0,30	0,33	0,05	0,18	0,09	0,15	0,23	0,14	0,27	0,25	0,14	0,26	0,29

Tabela 12. Nastavak.

	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	SH12	SH13	SH14	SH15	SH16	SH17	SH18
EGCG	0,94	1,25	0,97	0,85	0,79	1,11	1,00	0,96	0,8	–	0,96	1,26	0,95	0,58	1,07	1,28	1,14	1,61
AbA	0,35	1,06	1,89	0,54	0,74	1,09	0,73	3,99	0,61	0,26	0,48	0,86	0,39	0,64	1,64	0,69	0,46	1,59
RES	–	0,11	–	–	0,22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,08	0,46	–
KAE	0,14	0,18	0,24	0,78	0,46	0,16	0,20	0,21	0,51	0,38	0,65	0,03	0,38	0,18	0,26	0,54	0,55	0,28
PNB	–	2,35	0,35	0,33	0,63	1,57	1,00	1,82	0,82	1,30	1,00	2,26	0,44	0,58	1,10	1,14	0,24	0,21
QUE	0,07	0,38	0,14	0,58	0,23	0,12	0,17	0,33	0,36	1,05	0,36	0,11	0,32	0,36	0,14	0,59	0,45	0,30
CHR	0,06	1,98	0,41	0,27	0,23	0,87	0,48	0,95	0,47	0,81	0,73	1,50	0,42	0,47	0,90	0,92	0,25	0,09
PNS	–	0,34	–	–	–	0,07	0,04	0,19	0,01	0,07	0,03	0,19	–	–	0,05	0,04	–	–
PNC	–	0,8	0,09	0,05	0,15	0,51	0,22	0,46	0,28	0,45	0,35	0,72	0,15	0,17	0,46	0,43	–	–
HES	–	0,84	0,19	0,06	0,2	0,37	0,11	0,38	0,27	0,33	0,2	0,52	0,04	0,09	0,36	0,36	–	–
GLN	–	0,39	0,01	–	0,01	0,11	0,07	0,23	0,04	0,12	0,07	0,22	0,01	–	0,09	0,09	–	–

GaA – Galna kiselina; **GC** – Galokatehin; **PrA** – Protocatehinska kiselina; **EGC** – Epigalocatehin; **GeA** – Gentizinska kiselina; **HbA** – *p*-Hidroksibenzoeva kiselina; **ChA** – Hlorogena kiselina; **C**– Katehin; **CaA** – Kofeinska kiselina; **GCG** - Galocatehin galat; **EC** – Epikatehin; **CoA** – *p*-Kumarinska kiselina; **FeA** – Ferulinska kiselina; **RoA** – Ruzmariniska kiselina; **EGCG** - Epigalocatehin galat; **AbA** – *cis, trans*-Abscisinska kiselina; **RES** – Resveratrol; **KAE** – Kampferol; **PNB** – Pinobanksin; **QUE** – Kvercetin; **CHR** – Hrizin; **PNS** – Pinostrobin; **PNC**– Pinocembrin; **HES** – Hesperetin; **GLN** – Galangin.

4.3.1. Šećerni profil nektara i meda lipe

Koeficijenti determinacije (R^2), granice detekcije (GD), granice kvantifikacije (GK), kao i vrednosti efikasnosti primenjene analitičke metode na dva koncentraciona nivoa za analizu šećera dati su u **Tabeli 13**, a kvantitativni sadržaj svih šećera dat je u **Tabeli 14**. Hromatogram standarda ispitivanih šećera (**A**), kao i hromatogram odabranog uzorka zrelog lipovog meda (**B**) sa Fruške Gore (uzorak **LH11**) prikazani su na **Slici 13**. Šest disaharida i četiri trisaharida su kvantifikovani u svim analiziranim uzorcima. Od disaharida, saharoza i izomaltoza su bili najzastupljeniji u uzorcima zrelih medova, dok su saharoza i maltoza bili dominantni u nezrelom (mladom) lipovom medu i nektaru.

Tabela 13. Metoda za kvantifikaciju šećera: koeficijenti determinacije (R^2), granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK), i efikasnost metode na dva koncentraciona nivoa.

Šećer	Skraćenica	R^2	GD (mg/L)	GK (mg/L)	„Recovery“, %	
					Nivo 1	Nivo 2
Trehaloza	TRE	0,9965	0,09	0,30	111	107
Glukoza	GLU	0,9967	4,07	13,57	115	114
Fruktoza	FRU	0,9974	3,73	12,43	93	91
Izomaltoza	iMAL	0,9999	0,02	0,07	108	108
Saharoza	SUC	0,9974	0,38	1,27	88	103
Melezitoza	MEL	0,9994	0,04	0,13	99	109
Gentobioza + Turanoza	GENT+TUR	0,9993	0,22	0,73	109	104
Izomaltotrioza	iMALt	0,9988	0,06	0,20	114	89
Maltoza	MAL	0,9992	0,20	0,67	104	85
Panoza	PAN	0,9995	0,04	0,13	88	115
Maltotrioza	MALt	0,9999	0,01	0,03	96	112

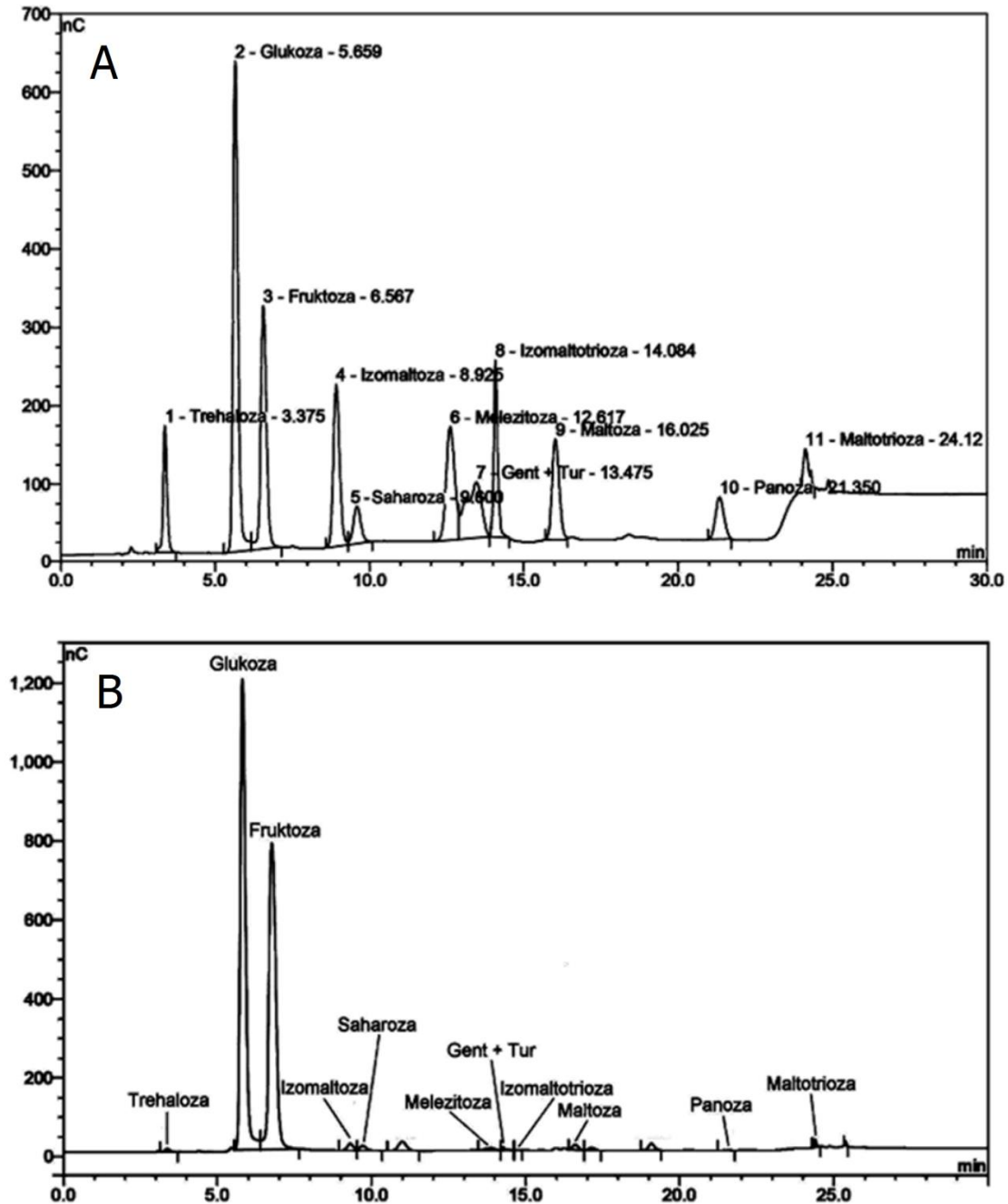
Tabela 14. Sadržaj šećera u zrelom i nezrelom lipovom medu i nektaru (g/kg).

	TRE	GLU	FRU	iMAL	SAH	MEL	GENT +TUR	iMALtr	MAL	PAN	MALtr
LH1	0,90	230,60	425,30	20,80	48,90	6,60	28,10	1,60	10,20	2,40	0,30
LH2	0,80	281,80	421,30	18,60	47,40	6,50	28,60	1,10	8,50	2,10	0,80
LH3	1,30	248,30	422,20	20,20	49,20	7,30	28,40	1,20	11,70	2,50	0,40
LH4	1,40	255,40	424,60	17,30	45,70	6,40	28,20	1,00	8,40	2,20	0,50
LH5	1,40	298,40	402,80	18,50	46,10	5,00	28,50	0,50	6,80	1,60	0,70
LH6	3,00	282,10	393,30	24,10	51,00	10,50	25,40	2,10	8,40	2,50	0,30
LH7	0,90	262,40	401,10	17,40	41,60	9,70	23,20	1,00	6,40	3,00	0,40
LH8	1,60	262,80	436,90	18,60	44,50	3,10	13,20	0,60	4,80	2,80	0,40
LH9	2,80	277,80	405,70	29,50	74,50	3,50	20,00	3,30	5,10	5,20	0,10
LH10	2,40	247,10	413,30	26,80	61,50	3,90	24,40	1,70	5,20	6,40	0,00
LH11	3,00	272,40	444,40	27,50	66,70	3,80	26,70	1,30	5,50	0,90	0,10
LH12	1,70	250,70	389,50	36,60	97,80	3,20	24,50	6,90	5,30	6,50	0,10
LH13	1,50	276,30	385,60	31,10	82,20	3,80	21,70	4,10	4,70	5,10	0,10

Tabela 14. Nastavak.

	TRE	GLU	FRU	iMAL	SAH	MEL	GENT +TUR	iMALtr	MAL	PAN	MALtr
LH14	5,10	257,80	419,10	35,90	98,90	3,10	23,90	5,70	5,20	5,80	0,10
LH15	1,80	250,40	366,20	36,30	92,90	3,00	21,40	9,90	5,50	8,20	0,10
LH16	3,20	293,40	368,20	29,20	64,90	2,80	16,60	5,30	4,90	1,00	0,10
LH17	3,10	290,90	364,20	28,90	65,20	2,80	16,70	5,40	4,90	1,00	0,10
LH18	5,30	243,70	429,00	30,20	88,40	5,00	20,70	4,40	5,70	0,30	0,00
LH19	1,80	269,20	389,80	27,70	75,40	4,50	17,50	4,10	4,30	0,30	0,20
LH20	2,20	274,60	401,40	30,70	74,70	4,80	15,00	5,90	4,80	7,90	0,10
LH21	6,10	307,80	411,10	15,70	37,20	5,40	15,40	0,70	2,90	0,60	0,00
LH22	4,00	300,00	424,00	10,10	30,70	5,90	11,60	0,40	2,20	0,60	0,10
LH23	1,70	247,80	401,00	25,10	55,00	2,90	16,30	2,30	5,30	1,30	0,20
LH24^a	3,00	270,20	403,10	27,50	69,40	3,90	19,10	3,90	4,80	3,40	0,10
LH25^b	2,10	337,60	334,80	0,40	46,90	0,50	3,00	1,80	1,70	0,60	0,90
LH26^c	2,20	278,00	273,50	0,00	190,60	0,50	2,30	0,50	1,90	0,30	0,10

^aPrilikom proizvodnje ovog meda pčele su prehranjivane šećernim pogačama, ^bNezreo (mlad) lipov med, ^cNektar cveta lipovog drveta.



Slika 13. Hromatogram standarda ispitivanih šećera (**A**) i hromatogram odabranog uzorka zrelog lipovog meda (**B**) sa Fruške gore (uzorak **L11**).

Sadržaj glukoze u uzorcima zrelih medova od lipe varirao je od 23,06 do 30,78 g/100 g, a fruktoze od 36,42 do 44,44 g/100 g. Nezreo lipov med i nektar imali su gotovo isti sadržaj glukoze i fruktoze zajedno, ali sa manjim sadržajem fruktoze u odnosu na zreli med.

U nekoliko uzoraka sadržaj saharoze bio je veći od 5 g/100 g (kretao se od 3,07 do 9,89 g na 100 g meda), što nije u skladu sa „Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela“ (2015). U lipovom medu iz Rumunije (Dobre, 2012) pronađena je znatno niža koncentracija saharoze (2,53 g/100g meda), dok je u lipovom medu iz Španije (Kádár, 2010) pronađena još niža koncentracija saharoze (1,72 g/100g meda). Sadržaj saharoze u uzorku nezrelog lipovog meda je unutar granica direktive Evropske unije. S druge strane, sadržaj saharoze u lipovom nektaru bio je 19,06 g/100 g, što je više nego dvostruko od sadržaja saharoze u uzorcima zrelih medova. Smanjena aktivnost pčelinjih enzima može biti uzrok značajno višeg sadržaja saharoze u uzorcima zrelih medova.

Sadržaj izomaltoze u testiranim uzorcima zrelih medova bio je veći nego sadržaj maltoze i varirao je od 1,01 do 3,66 g/100 g. Sadržaj izomaltoze u nezrelom medu i nektaru lipe bio je veoma nizak. Sadržaj gentobioze sa turanozom bio je mnogo veći u uzorcima zrelih medova u odnosu na nezreli lipov med i nektar.

U lipovom medu iz košnice u kojoj su pčele dodatno prehranjivane šećernim sirupom nije pronađena značajna razlika u sadržaju šećera u odnosu na ostale nektarne medove (**Tabela 14**).

Prilikom analize sadržaja šećera u uzorcima zrelih medova prikupljenih u različitim godinama, može se uočiti mala varijabilnost samo u sadržaju saharoze i izomaltotrioze. Slično kao u slučaju polifenola, sadržaj kvantifikovanih šećera u uzorcima meda prikupljenih u 2011. godini bio je drugačiji od svih ostalih uzoraka.

4.3.2. Šećerni profil meda od žalfije

Primenom jonoizmenjivačke hromatografije sa elektrohemijском detekcijom u analiziranim uzorcima meda od žalfije kvantifikovano je ukupno četrnaest različitih šećera i šećernih alkohola. Kao što je i očekivano, redukujući šećeri, fruktoza i glukoza, bili su glavni sastojci svih ispitivanih uzoraka (**Tabela 15**). U svim uzorcima vrednost glukoze i fruktoze iznosila je oko 60 g na 100 g meda. Od ostalih monosaharida, u medu od žalfije je identifikovana arabinoza, ali u relativno malim količinama.

Tabela 15. Sadržaj šećera i šećernih alkohola u monofloralnom medu od žalfije (g/kg).

	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	SH12	SH13	SH14	SH15	SH16	SH17	SH18
ERY	0,04	0,07	0,05	0,05	0,02	0,07	0,06	0,07	0,05	0,07	0,09	0,69	0,06	0,07	0,18	0,12	0,11	0,09
SOR	0,04	0,13	0,03	0,06	0,09	0,08	0,3	0,33	0,20	0,06	0,06	0,03	0,04	0,02	0,18	0,05	0,05	0,02
TRE	1,23	5,70	2,71	2,07	5,34	0,21	5,07	2,76	1,45	5,08	1,82	0,75	1,31	2,39	1,41	0,14	0,63	1,02
ARA	0,04	0,15	0,05	0,10	0,10	0,37	0,12	0,07	0,06	0,07	0,10	0,05	0,09	0,05	0,05	0,06	0,08	0,03
GLU	305,03	272,07	280,30	253,24	212,95	206,81	108,89	245,39	200,35	263,82	227,38	240,15	244,46	252,72	271,21	262,22	277,59	263,08
FRU	399,41	464,01	440,30	420,83	393,63	475,99	480,76	437,51	442,23	462,32	464,06	489,06	461,97	455,68	461,76	464,87	447,35	471,03
SUC	30,41	28,78	11,02	15,69	14,17	14,27	20,71	14,03	11,87	16,54	21,4	27,08	25,64	19,01	11,21	18,59	16,34	16,16
TUR	1,34	0,12	0,32	0,68	0,60	0,83	1,13	0,76	0,88	0,65	0,87	0,82	0,82	0,90	0,11	0,77	1,16	1,06
GLY	1,51	0,11	0,16	0,09	0,12	0,17	0,12	0,16	0,03	0,19	0,10	0,05	0,08	0,07	0,17	0,12	0,12	0,13
GAL	0,06	0,06	0,04	0,09	0,46	0,33	0,20	0,36	0,02	0,07	0,08	0,03	0,02	0,03	0,20	0,06	0,07	0,03
iMAL	4,45	3,11	5,31	14,6	3,63	7,13	7,68	5,40	3,95	12,61	12,34	3,52	7,44	8,51	8,28	10,22	11,62	9,98
iMALt	1,44	2,88	0,73	4,66	2,55	2,76	1,24	1,48	1,11	3,79	5,66	1,11	0,33	0,36	0,31	2,41	3,91	2,44
MAL	6,05	3,74	5,92	16,85	8,76	9,32	11,91	7,32	7,38	11,77	11,09	7,40	8,98	10,06	8,33	11,49	12,31	9,91
MALt	0,11	0,06	0,01	0,02	0,02	0,05	0,06	0,08	0,06	0,04	0,07	0,08	0,09	0,07	0,02	0,09	0,08	0,08
SUM	751,16	780,99	746,95	729,03	642,44	718,39	638,25	715,72	669,64	777,08	745,12	770,82	751,33	749,94	763,42	771,21	771,42	775,06
F/G	1,31	1,71	1,57	1,66	1,85	2,30	4,42	1,78	2,21	1,75	2,04	2,04	1,89	1,80	1,70	1,77	1,61	1,79
M/iM	1,36	1,20	1,11	1,15	2,41	1,31	1,55	1,35	1,87	0,93	0,90	2,10	1,21	1,18	1,01	1,13	1,06	0,99

ERY – Eritritol; **SOR** – Sorbitol; **TRE** – Trehaloza; **ARA** – Arabinoza; **GLU** – Glukoza; **FRU** – Fruktioza; **SUC** – Saharoza; **TUR** – Turanoza; **GLY** – Glicerol; **GAL** – Galaktitol; **iMAL** – Izomaltoza; **iMALt** – Izomaltotrioza; **MAL** – Maltoza; **MALt** – Maltotrioza; **SUM** – Zbir kvantifikovanih šećera i šećernih alkohola; **F/G** – Odnos fruktoze i glukoze; **M/iM** – Odnos maltoze i izomaltoze.

Svi uzorci meda od žalfije pokazali su sadržaj saharoze manji od 5 g na 100 g, što se obično uzima kao granična vrednost za med, a koja je propisana direktivom Evropske unije. Ostali identifikovani disaharidi bili su: trehaloza, turanoza, maltoza i izomaltoza, a od trisaharida pronađeni su maltotrioza i izomaltotrioza. Pored šećera, u medu od žalfije analizirani su polioli (šećerni alkoholi) i identifikovani su eritritol, sorbitol, galaktitol i glicerol.

Odnos pojedinih ugljenih hidrata je pokazatelj koji se može koristiti za utvrđivanje autentičnosti meda (Kaškonienė i Venskutonis, 2010). Odnos sadržaja fruktoze i glukoze u medu od žalfije, koji je preporučen za određivanje viskoznosti meda jer je glukoza manje rastvorljiva u vodi nego fruktoza, varirao je od 1,31 u uzorku **SH1** do 4,42 u uzorku **SH7**. Kao još jedna karakteristika monofloralnog meda od žalfije u ovoj studiji bio je relativno nizak odnos maltoze i izomaltoze, koji se kretao od 0,90 (uzorak **SH11**) do 2,41 (**SH5**). Interesantno je to da su naučnici iz Hrvatske u jednoj načnoj studiji koja se bavila šećernim profilom meda od žalfije dobili sadržaj maltoze i do 5 g/100 g za neke uzorke, a u našim analizama dobijeni su više nego dvostruko niže koncentracije (Primorac, 2011).

4.4. Analiza glavnih komponenata

U ovoj disertaciji je predloženo da hemijski markeri, kao što su ugljeni hidrati i polifenolna jedinjenja, mogu biti veoma korisni prilikom klasifikovanja medova prema geografskom, odnosno botaničkom poreklu. Analiza glavnih komponenata (PCA), veoma korisna metoda multivarijantne analize, pokazala se kao veoma efikasna tehnika za pronalaženje hemijskih markera.

4.4.1. Procena geografskog porekla meda

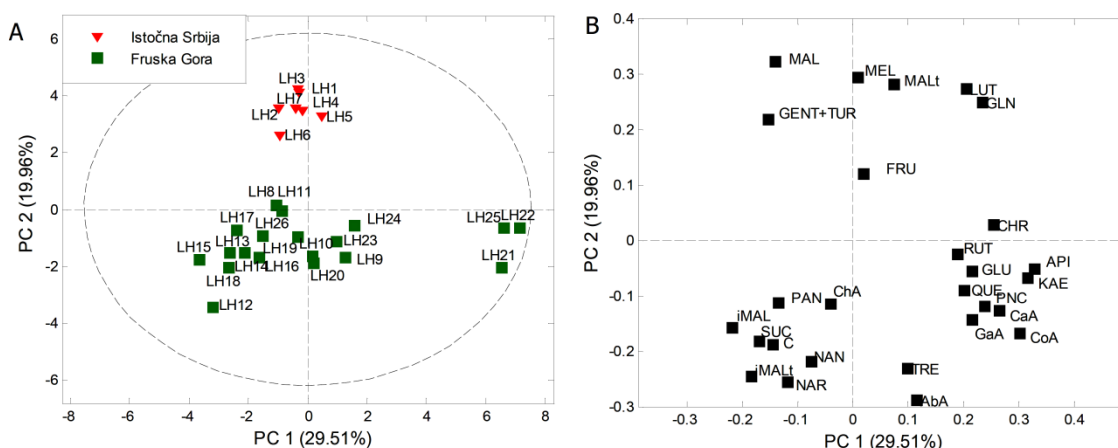
U našem istraživanju, 15 polifenolnih jedinjenja, abscisinska kiselina i 11 šećera kvantifikovanih u medu od lipe korišćeni su kao promenljive za analizu glavnih komponenata. PCA primenjena na autoskalirane (centrirane i skalirane na jediničnu standardnu devijaciju) kvantitativne podatke daje šestokomponentni model đkoji objašnjava 82,88 % od ukupne varijabilnosti. PC1 obuhvata 29,51 % od ukupnog

varijabiliteta, dok kumulativna varijansa objašnjena pomoću prve dve komponente iznosi 49,47 %.

Na **Slici 14A** može se uočiti grupisanje lipovog meda na osnovu geografskog porekla. Duž PC2 ose med koji potiče iz regiona Fruške gore se potpuno odvojio od meda iz Istočne Srbije. Na ovakvo grupisanje medova sa Fruške gore najviše utiču šećeri fruktoza, maltoza, maltotrioza, melezitoza i gentobioza sa turanozom, ali i flavonoidi luteolin i galangin. Klaster medova iz Istočne Srbije definisan je jedinstvenim sadržajem flavonoida naringina i naringenina, šećera izomaltotrioze i trehaloze, kao i abscisinske kiseline.

Takođe, tri uzorka meda sa Fruške gore **LH21**, **LH22** (zreli lipov med proizveden 2011. godine u Beočinu) i **LH25** (nezreli lipov med iz 2014. godine, takođe iz Beočina) se izdvajaju kao poseban klaster duž PC1 ose, a jedinjenja koja najviše doprinose takvom grupisanju su apigenin i kamferol (**Slici 14B**). Ovo može da ukaže na mogućnost da su uzorci **LH21** i **LH22** mogu biti delimično nezreli medovi.

U literaturi je pronađen jedan naučni rad gde je analizirano geografsko poreklo monofloralnog meda od lipe iz Slovenije. Ispitivani su neki fizičko-hemijski parametri, sadržaj elementa i odnos stabilnih izotopa ugljenika i azota u ukupno 30 uzoraka, a rezultati su tumačeni hemometrijskim metodama. Kombinacija ispitivanih parametara nudi mogućnost razlikovanja uzoraka prema geografskom poreklu (Kropf, 2010b).



Slika 14. A) Grupisanje lipovog meda prema geografskom poreklu; B) Parametri odgovorni za ovakvo grupisanje.

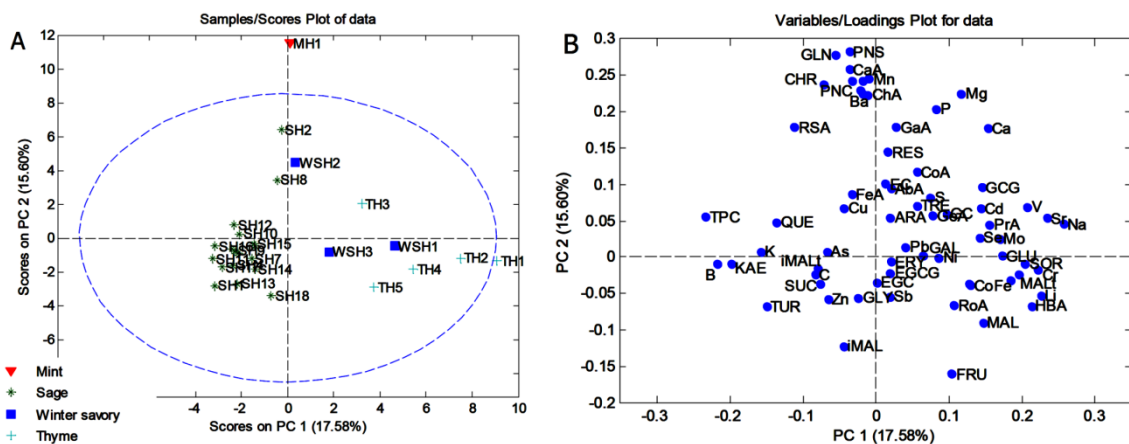
4.4.2. Procena botaničkog porekla meda

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je primena hemijskih markera za dokazivanje autentičnosti monofloralnog meda od žalfije. U tu svrhu, kao autgupe, korišćeni su uzorci tri monofloralne vrste meda, koje prema botaničkom poreklu pripadaju porodici usnatica (fam. Lamiaceae) žalfija/nana (*Mentha spp.*), primorski vresak (*Satureja montana* L.) i majčina dušica (*Thimus spp.*). Pored polifenola i šećera i šećernih alkohola, kao varijable za analizu glavnih komponenata korišćeni su rezultati spektrofotometrijskih testova (ukupni fenoli – *TPC* i antioksidativna aktivnost – *RSA*) i sadržaj minerala određen indukovanom spregnutom plazmom sa optičko-emisionom spektrometrijom (**Prilog 3**). Takođe, kvantitativni podaci (*TPC*, *RSA*, polifenoli, šećeri, šećerni alkoholi i minerali) u medovima nane, vreska i majčine dušice dati su u tabeli u **Prilogu 4**.

Kombinacijom svih navedenih varijabli jasno su definisani markeri botaničkog porekla meda od žalfije. Rezultati su pokazali da prve dve komponente (*PC1* i *PC2*) opisuju 32,18% od ukupne varijabilnosti (**Slika 15A**). Prva glavna komponenta čine 17,58 %, a druga 15,60 % od ukupne varijabilnosti. Jasna diskriminacija monofloralnih medova žalfije sa jedne strane, i nane, vreska i majčine dušice sa druge strane, uočena je duž *PC1* ose. Varijable koje su odgovorne za odvajanje monofloralnog meda od žalfije od drugih ispitivanih monofloralnih medova su identifikovani na grafiku skorova (**Slika 15B**). Uzorci meda od žalfije se razlikuju od ostalih ispitivanih uzoraka meda na osnovu znatno većeg sadržaja bora i kalijuma. Takođe, isti medovi imaju znatno veći sadržaj ukupnih fenola (*TPC*), turanoze i kampferola u odnosu na uzorke medova od nane, vreska i majčine dušice, što još više doprinosi ovakvom grupisanju (**Slika 15B**). S druge strane, med od nane karakteriše veći sadržaj mangana, barijuma i hlorogene kiseline. Samo dva uzorka meda od žalfije (**SH2** i **SH8**) znatno odstupaju od ostalih uzoraka po *PC2* osi, i to zbog većeg sadržaja hrizina, pinocembrina, galangina i kofeinske kiseline, a navedena jedinjenja su takođe karakteristična za uzorke **MH1** (nanu) i **WSH2** (vresak).

Nije uočena pravilnost, tj. zavisnost razdvajanja unutar monofloralnih medova žalfije u odnosu na geografsko poreklo, i u odnosu na godinu proizvodnje. Ovakvi rezultati nisu iznenađujuću ako uzmemo u obzir da su svi uzorci sakupljeni u okviru

relativno malog područja Dalmacije. Naime, prirodne populacije vrste *Salvia officinalis* L. rasprostiru se u obalnom pojasu severnog hrvatskog primorja, kao i na dalmatinskim ostrvima (Flora Croatica Database, 2012), gde najčešće predstavljaju dominantne florističke elemente na stenovitim i krševitim terenima (Šugar, 1983). Autentični monofloralni med od dalmatinske žalfije je široko poznat u svetu, ali je takođe u upotrebi u tradicionalnoj medicini.



Slika 15. A) Botaničko poreklo medova iz familije Lamiaceae; B) Parametri odgovorni za grupisanje ispitivanih medova prema botaničkom poreklu.

5. ZAKLJUČAK

Polifenolni i šećerni profili 27 zrelih uzoraka meda, jednog mladog meda i nektara od lipe korišćeni su za karakterisanje geografskog porekla lipovog meda iz Srbije, a delimično je ispitan i hemijski sastav lipovog meda u različitim fazama proizvodnje. Takođe, u 18 uzoraka meda od žalfije, ali i drugim medovima iz familije Lamiaceae, dobijeni su zanimljivi rezultati u vezi sa karakterističnim polifenolima, šećerima i mineralnim sastavom. U našim ispitivanjima došli smo do sledećih zaključaka:

- U ovom radu, po prvi put je upotrebljena kombinacija eksperimentalnih podataka dobijenih tečno-masenom i jonskom hromatografijom sa metodama multivarijantne analize u cilju definisanja botaničkog i geografskog porekla meda.
- Fruktaza i glukoza, glavni šećeri u svim ispitivanim uzorcima, bili su u granicama utvrđenim propisima EU.
- Nezreo i zreli lipovi medovi odlikuju se sličnim profilom polifenolnih jedinjenja, dok je lipov nektar znatno drugačiji.
- Primenom masene spektrometrije visoke rezolucije i proučavanjem MS² fragmentacije u uzorku lipovog nektara identifikovano je 15 flavonoid-glikozida.
- Sadržaj saharoze u uzorku cvetnog lipovog nektara bio je više nego dvostruko veći od sadržaja saharoze u svim uzorcima meda, i to se može pripisati aktivnosti enzima, tj. da saharoza iz nektara nije skoro potpuno razgrađena na glukozu i fruktozu, kao što je to slučaj kod zrelog meda.
- Primećeno je i da neki šećeri, izomaltoza i gentibioza sa turanozom, imaju različitu koncentraciju u različitim fazama proizvodnje meda od lipe.
- Kao parametri koji definišu geografsko poreklo meda lipe sa Fruške gore identifikovani su šećeri fruktoza, maltoza, maltotrioza, melecitoza i gentobioza sa turanozom, ali i flavonoidi luteolin i galangin.
- Geografsko poreklo meda lipe iz Istočne Srbije definisano je jedinstvenim sadržajem flavonoida naringina i naringenina, šećera izomaltotrioze i trehaloze, kao i abscisinske kiseline.

- Identifikovana jedinjenja u medu od žalfije pokazala su značajan potencijal za karakterizaciju ovog meda tipičnog za Jadransko primorje u Hrvatskoj, posebno njen severni deo.
- Eksperimentalni podaci pokazuju jasnu diskriminaciju monofloralnog meda od žalfije od drugih monofloralnih medova iz familije Lamiaceae pomoću grupe hemijskih markera (polifenolna jedinjenja, ugljenih hidrati i minerali).
- Od svih ispitivanih uzoraka meda iz familije Lamiaceae, neki hemijski parametri (viši sadržaj bora i kalijuma, kao i turanoze i kampferola) mogu biti predloženi kao markeri za potvrdu autentičnosti i botaničkog porekla monofloralnog meda od žalfije.

Na kraju, važno je napomenuti da medovi poreklom iz Srbije i Hrvatske nisu bili uključeni u studiju u kojoj se opisuju svojstva evropskih monofloralnih medova (Piazza i Persano Oddo, 2004). Stoga, rezultati predstavljeni u ovom radu su od suštinskog značaja za pozicioniranje uzoraka autentičnih srpskih i hrvatskih medova na evropskom tržištu meda. Pored toga, primena multivarijantne statističke analize na razne hemijske parametre u medu, pokazala se kao veoma korisna metoda za potvrdu autentičnosti, kao i određivanje botaničkog i geografskog porekla meda.

6. LITERATURA

- Ajibola, A. (2015). Novel Insights into the Health Importance of Natural Honey. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 22(5), 7-22.
- Alissandrakis, E., Tarantalis, P.A., Harizanis, P.C., Polissiou, M. (2007). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100, 396-404.
- Alissandrakis, E., Tarantalis, P.A., Harizanis, P.C., Polissiou, M. (2005). Evaluation of our isolation techniques for honey aroma compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 91-97.
- Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., Tacchini, M. (1989). Phenolic composition of honeys: Preliminary study on identification and group quantification. *Apidologie*, 20, 115-125.
- Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. (1997). Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60, 79-84.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549-562.
- Antony, S.M., Han, I.Y., Rieck, J.R., Dawson, P.L. (2000). Antioxidative effect of maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3985-3989.
- Arceusz, A., Wesolowski, M., Konieczynski, P. (2013). Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants: A Review. *Natural Product Communications*, 8(12), 1821-1829.
- Babarinde, G.O., Babarinde, S.A., Adegbola, D.O., Ajayeoba, S.I. (2011). Effects of harvesting methods on physicochemical and microbial qualities of honey. *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 628-634.

- Badjah Hadj Ahmed, A.Y., Obbed, M.S., Wabaidur, S.M., Al Othman, Z.A., Al-Shaalan, N.H. (2014). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Phenolic Acid, Flavonoid, and Phenol Contents in Various Natural Yemeni honeys Using Multi-walled Carbon Nanotubes as a Solid-Phase Extraction Adsorbent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5443-5450.
- Baroni, M.V., Chiabrando, G.A., Costa, C., Wunderlin, D.A. (2002). Assessment of the oral origin of honey by SDS-PAGE immunoblot techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1362-1367.
- Beckh, G., Wessel, P., Lüllmann, C. (2005). Natural components of honey: Yeast and its conversion products - Part 3: The ethanol and glycerin content as quality parameter with respect to the growth of yeast. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 101(1), 1-5.
- Benedetti, S., Mannino, S., Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. (2004). Electronic nose and neural network use for the classification of honey. *Apidologie*, 35, 397-402.
- Bentivenga, G., D'Auria, M., Fedeli, P., Mauriello, G., Racioppi, R. (2004). SPME-GC-MS analysis of volatile organic compounds in honey from Basilicata. Evidence of the presence of pollutants from anthropogenic activities. *International Journal of Food Science & Technology*, 39, 1079-1086.
- Beretta, G., Artali, R., Caneva, E., Orlandini, S., Centini, M., Facino, R.M. (2009). Quinoline alkaloids in honey: further analytical (HPLC-DAD-ESI-MS, multidimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy), theoretical and chemometric studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(3), 432-439.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Diego, J.C., Ruiz A. (2005). A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *Journal of Separation Science*, 28(9-10), 1039-1047.

- Bertoncelj, J., Polak, T., Kropf, U., Korošec, M., Golob, T. (2011). LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 127(1), 296-302.
- Bianchi, F., Careri, M., Musci, M. (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 89, 527-532.
- Biesaga, M., Pyrzyńska, K. (2013). Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, 136, 46-54.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbuhl, W., Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46, 269-275.
- Bogdanov, S., Jurendić, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health: a Review. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- Bonaga, G., Giumanini, A.G. (1986). Chemical composition of chestnut honey: Analysis of the hydrocarbon fraction. *Journal of Apicultural Research*, 25, 113-120.
- Bonvehí, J.S., Coll, F.V. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 275-282.
- Bouseta, A., Collin, S. (1995). Optimized Likens–Nickerson methodology for quantifying honey flavours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1890-1897.
- Bouseta, A., Scheirman, V., Collin, S. (1996). Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *Journal of Food Science*, 61, 683-694.
- Brieskorn, C.H., Biechele, W. (1971). Flavones from *Salvia officinalis*. Compounds of *Salvia officinalis*. *Archiv der Pharmazie, (Weinheim)* 304, 557-561.

- Burlando, B., Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: a review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306-313.
- Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C., Ghelli, S. (1999). Homogentisic acid: A phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4064-4067.
- Campillo, N., Viñas, P., Férrez-Melgarejo, G., Hernández-Córdoba, M. (2015). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 131, 185-191.
- Campone, L., Piccinelli, A.L., Pagano, I., Carabetta, S., di Sanzo, R., Russo, M., Rastrelli, L. (2014). Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1334, 9-15.
- Cavia, M.M., Fernandez-Muin, M.A., Gomez-Alonso, E., Montes-Perez, M.J., Huidobro, J.F. Sancho, M.T. (2002). Evolution of fructose and glucose in honey over one year: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 78, 157-161.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., Cabras, P. (1994). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A*, 669(1-2), 59-64.
- Ciulu, M., Spano, N., Pilo, M.I., Sanna, G. (2016). Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys. *Molecules*, 21(4), pii 451, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21040451>.
- Codex Alimentarius Commission (2001). Revised Codex Standard for Honey, *Codex STAN 12-1981*, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001).
- Conte, L.S., Miorini, M., Giomo, A., Bertacco, G., Zironi, R. (1998). Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1844-1849.
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A. C., Sbirrazzuoli, N., Lizzani-Cuvelier, L. (2002). Recent developments in food characterisation and adulteration detection:

- Techniques oriented perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1751-1764.
- Cordella, C.B., Militao, J.S., Clement, M.C., Cabrol-Bass, D. (2003). Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3234-3242.
- Costa, L.S.M., Albuquerque, M.L.S., Trugo, L.C., Quinteiro, L.M.C., Barth, O.M., Ribeiro, M., de Maria, C.A.B. (1999). Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*, 65(3), 347-352.
- Cotte, J.F., Casabianca, H., Chardon, S, Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M.F. (2004). Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(4), 698-705.
- Cotte, J.F., Casabianca, H., Chardon, S, Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M.F. (2003). Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, 1021, 145-155.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(5), 645-652.
- Čeksteryte, V., Kazlauskas, S., Račys, J. (2006). Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread. *Biologija*, 2, 28-33.
- da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
- Daniel-Kelly, J.F., Downey, G., Fouratier, V. (2004). Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 33-39.
- Davies, A.M.C. (1975). Amino acid analysis of honeys from eleven countries. *Journal of Apicultural Research*, 14, 29-39.
- Davies, A.M.C. (1976). The application of amino acid analysis to the determination of the geographical origin of honey. *Journal of Food Technology*, 11, 515-523.

- Davies, A.M.C., Harris, R.G. (1982). Free amino acid analysis of honeys from English and Walse: Application to the determination of geographical origin of honeys. *Journal of Apicultural Research*, 21, 168-173.
- Davies, A.M.C., Radovic, B., Fearn, T., Anklam, E.A. (2002). Preliminary study on the characterisation of honey by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10, 121-135.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- Delgado, C., Tomás-Barberán, F.A., Talou, T., Gaset, A. (1994). Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flonoids. *Chromatographia*, 38, 71-78.
- Dent, M., Dragovic-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Tomislav, B., Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.
- Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delegue, M.H., Dore, J.C. (2004). Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, 86, 305-312.
- Dimitrova, B., Gevrenova, R., Anklam, E. (2007). Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18, 24-32.
- Dimou, M., Goras, G., Thrasyvoulou, A. (2007). Pollen analysis as a means to determine the geographical origin of royal jelly. *Grana*, 46, 118-122.
- Dinca, O.R., Ionete, R.E., Popescu, R. Costinel, D., Radu., G.L. (2015). Geographical and Botanical Origin Discrimination of Romanian Honey Using Complex Stable Isotope Data and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 8(2), 401-412.
- Dobre, I., Georgescu, L.A., Alexe, P., Escuredo, O., Seijo, M.C. (2012). Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International*, 49(1), 126-132

- Doner, L.W. (1997). The sugars of honey - A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443-456.
- Dragovic-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Jukić, M., Penić, M., Dent, M. (2012). The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technology and Biotechnology*, 50(3), 377-383.
- Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J.L., Bello-López, M.A., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J.C., Guiraúm-Pérez, A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65(3), 686-689.
- Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A (European Food Research and Technology)*, 202, 40-44.
- Ferreres, F., Andrade, P., Tomás-Barberán, F.A. (1994c). Flavonoids from Portuguese heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 199, 32-37.
- Ferreres, F., Blázquez, M.A., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. (1994a). Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 669(1-2), 268-274.
- Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., Tomás-Barberán, F.A. (1993). Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 121-123.
- Ferreres, F., Giner, J.M., Tomás-Barberán, F.A. (1994b). A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 371-372.
- Ferreres, F., Juan, T., Perez-Arquillue, C., Herrera-Martache, A., Garcia-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A. (1998). Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 506-510.

- Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Tomas-Lorente, F. (1991). A HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56, 49-56.
- Ferreira, F.M.L., Rius, S.P., Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.
- Fiori J., Serra G., Sabatini A.G., Zucchi P., Barbattini R., Gazziola F. (2000). Dextrins HPLC analysis in *Metcalfa pruinosa* (Say) honeydew, *Industrie Alimentari*, 39, 463-466.
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjeric, D., Primorac, Lj. (2016). Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 39-48.
- Flora Croatica Database (2012). Flora Croatica Database. Vascular Plants. In: Taxonomy & Bibliography of Croatian Flora 2004 ed. Department of Botany, Faculty of science, FER-ZPR, University of Zagreb.
- Gambacorta, E., Simonetti, A., Garrisi, N., Intaglietta, I., Perna, A. (2014). Antioxidant properties and phenolic content of sulla (*Hedysarum spp.*) honeys from Southern Italy. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 2260-2268.
- Gašić, U., Kečkeš, S., Dabić, D., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2014a). Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry*, 145, 599-607.
- Gašić, U., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž. (2017). Polyphenols as Possible Markers of Botanical Origin of Honey. *Journal of AOAC International*, Article in press.
- Gašić, U., Natić, M., Mišić, D., Lušić, D., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž., Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 128-138.
- Gašić, U., Stanković, D., Dabić, D., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž., Mutić, J. (2016). Analytical possibilities for the relative estimation of antioxidative capacity of honey varieties harvested in different regions of Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(5), 567-574.

- Gašić, U., Šikoparija, B., Tosti, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2014b). Phytochemical Fingerprints of Lime Honey Collected in Serbia. *Journal of AOAC International*, 97(5), 1259-1267.
- Generalčić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Katalinić, A., Burčul, F., Katalinić, V. (2011). Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chemistry*, 127(2), 427-433.
- Generalčić, I., Skroza, D., Šurjak, J., Mozina, S.S., Ljubenković, I., Katalinić, A., Simat, V., Katalinić, V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, 9(2), 441-457.
- Gheldof, N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5870-5877.
- Ghidini, S., Ianieri, A., Zanardi, E., Conter, M., Boschetti, T., Iacumin, P., Bracchi, P. G. (2006). Stable isotopes determination in food authentication: A review. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, XXVI, 193-204.
- Gil, M.I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., Tomás-Barberán, F.A. (1995). Plant Phenolic Metabolites and Floral Origin of Rosemary Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2833-2838.
- Gilbert, J., Shepherd, M.J., Wallwork, M.A., Harris, R.G. (1981). Determination of the geographical origin of honeys by multivariate analysis of gas chromatographic data on their free amino acid content. *Journal of Apicultural Research*, 20, 125-135.
- Gomez Barez, J.A., Garcia Villanova, R.J., Elvira Garcia, S., Rivas Pala, T., Gonzalez Paramas, A.M., Sanchez, J. (2000). Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *European Food Research and Technology*, 210, 437-444.
- Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic

- compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220-1234.
- Gonzalez Paramas, A.M., Gomez Barez, J.A., Garcia Villanova, R., Rivas Pala, T., Ardanuy Albajar, R., Sanchez, J. (2000). Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 157-165.
- Gonzalez-Miret, M.L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernandez-Recamales, M.A., Heredia, F.J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2574-2580.
- Goodacre, R., Radovic, B.S., Anklam, E. (2002). Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 56, 521-527.
- Goodall, I., Dennis, J.J., Parker, I., Sharman, M. (1995). Contribution of high performance liquid chromatographic analysis of carbohydrates to authenticity testing of honey. *Journal of Chromatography A*, 706, 353-359.
- Gritzapis, P., Timotheou-Potamia, M. (1989). Determination of reducing sugars with a 2,4-dinitrophenolate-selective membrane electrode. *Analytica Chimica Acta*, 218, 37-46.
- Habib, H.M., Al Meqbali, F.T., Kamal, H., Souka, U.D., Ibrahim, W.H. (2014). Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, 153, 28-34.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513.
- Hermosín, I., Chicón, R.M., Cabezudo, M.D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263-268.

- Horváth, K., Molnár-Perl, I. (1997). Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides by GC-MS of their TMS ether oxime derivatives: II. In honey. *Chromatographia*, 45, 328-335.
- Huidobro, J.F., Estrella, R.M., de Andrade, B.P.C., Sanchez, M.P., Sancho, M.T., Muniategui, S., and Simal-Lozano, J. (1994). Enzymatic determination of primary normal alcohols as apparent ethanol content in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1975-1978.
- Huidobro, J.F., Estrella, R.M., de Andrade, B.P.C., Sancho, M.T., Muniategui, S., Simal-Lozano, J. (1993). Enzymatic determination of glycerol in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 557-559.
- Irudayaraj, J., Xu, F., Tewari, J. (2003). Rapid determination of invert cane sugar adulteration in honey using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 68, 2040-2045.
- Janiszewska, K., Aniołowska, M., Nowakowski, P. (2012). Free Amino Acids Content of Honeys from Poland. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(2), 85-89.
- Jerković, I., Mastelić, J., Marijanović, Z. (2006). A Variety of volatile compounds as markers in unifloral honey from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, 3, 1307-1310.
- Joshi, S.R., Pechhacker, H., Willam, W., von der Ohe, W. (2000). Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata*, *A. cerana* and *A. mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal. *Apidologie*, 21, 367-375.
- Kádár, M., Juan-Borrás, M., Hellebrandova, M., Doménech, E., Escriche, I. (2010). Differentiation of Acacia, Sunflower and Tilia Honeys from Different Countries Based on Sugar Composition, Physicochemical and Color Parameters. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 67(2), 252-258.
- Kamal, M.A., Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 17-21.

- Karaali, A., Meydanoglu, F., Eke, D. (1988). Studies on composition, freeze-drying and storage of Turkish royal jelly. *Journal of Apicultural Research*, 27, 182-185.
- Karabagias, I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M.G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, 548-557.
- Kaškonienė, V., Venskutonis, P.R. (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620-634.
- Kaškonienė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V. (2008). Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. *Food Chemistry*, 111, 988-997.
- Kečkeš, J., Trifković, J., Andrić, F., Jovetić, M., Tešić, Ž., Milojković-Opsenica, D. (2013a). Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3368-3376.
- Kečkeš, S., Gašić, U., Ćirković Veličković, T., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2013b). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(1), 32-40.
- Kenjerić, D., Mandić, M., Primorac, L., Čačić, F. (2008). Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) unifloral honey. *Food Chemistry*, 110, 187-192.
- Khalil, M.I., Sulaiman, S.A. (2010). The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 7(4), 315-321.
- Kontogianni, V.G., Tomić, G., Nikolić, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stošić-Grujičić, S., Stojanović, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136(1), 120-129.

- Kosakowska, O.K., Bączek, K., Przybył, J.L., Ejdys, M., Kuźma, P., Obiedziński, M., Węglarz, Z. (2015). Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products*, 78, 58-65.
- Kropf, U., Golob, T., Nečemer, M., Kump, P., Korošec, M., Bertoneclj, J., Ogrinc, N. (2010a). Carbon and nitrogen natural stable isotopes in Slovene honey: adulteration and botanical and geographical aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12794-12803.
- Kropf, U., Korošec, M., Bertoneclj, J., Ogrinc, N., Nečemer, M., Kump, P., Golob, T. (2010b). Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey *Food Chemistry*, 121(3), 839-846.
- Küçük, M., Kolayh, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candon, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100(2), 526-534.
- Kumar, K.G., Das, C.M., Indrasenan, P. (1988). Determination of some carbohydrates with N-bromophthalimide and N-bromosaccharin. *Talanta*, 35, 651-652.
- Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, Article ID 162750, 16 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- Kumazawa, S., Okuyama, Y., Murase, M., Ahn, M.R., Nakamura, J., Tatefuji, T. (2012). Antioxidant Activity in Honeys of Various Floral Origins: Isolation and Identification of Antioxidants in Peppermint Honey. *Food Science and Technology Research*, 18, 679-685.
- Kus, P.M.; van Ruth, S. (2015). Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 69-75.
- Latorre, M.J., Pena, R., Garcia, S., Herrero, C. (2000). Authentication of Galician (NW Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *Analyst*, 125, 307-312.

- Latorre, M.J., Pena, R., Pita, C., Botana, A., Garcia, S., Herrero, C. (1999). Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chemistry*, 66, 263-268.
- Lazarević, K., Andrić, F., Trifković, J., Tešić, Ž., Milojković-Opsenica, D. (2012). Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, 132(4), 2060-2064.
- Lee, D.C., Lee, S.Y., Cha, S.H., Choi, Y.S., Rhee, H.I. (1998). Discrimination of native bee-honey and foreign bee-honey by SDS-PAGE. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30(1), 1-5.
- Lees, M. (2003). Food Authenticity and Traceability. *Woodhead Publishing Ltd.*, Cambridge, UK.
- Lglesias, M.T., de Lorenzo, C., Polo, M.D., Martin-Alvarez, P.J., Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 84-89.
- Liang, Y., Cao, W., Chen, W. Y., Xiao, X.H., Zheng, J.B. (2009). Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Food Chemistry*, 114, 1537-1541.
- Liu, H., Guo, Y., Wang, X., Liang, X., Liu, X. (2015). Preparation of an Al₂O₃/SiO₂ core-shell composite material for solid phase extraction of flavonoids. *Analytical Methods*, 7, 3486-3492.
- Louveaux J., Maurizio A., Vorwohl G. (1978). Methods of melissopalynology, *Bee World*, 59, 139-157.
- Low, N.H., Brisbane, T., Bigam, G., Sporns, P. (1988). Carbohydrate analysis of western Canadian honeys and their nectar sources to determine the origin of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 953-957.

- Low, N.H., Sporns, P. (1988). Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *Journal of Food Science*, 53, 558-561.
- Lu, Y., Yeap Foo, L. (2002). Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochemistry*, 59(2), 117-140.
- Ma, Y.L., Li, Q.M., van den Heuvel, H., Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357-1364.
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U., Kostrzewa, M. (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*, 3, 1-2.
- Mannina, L., Sobolev, A.P., Di Lorenzo, A., Vista, S., Tenore, G.C., Daglia, M. (2015). Chemical Composition of Different Botanical Origin Honeys Produced by Sicilian Black Honeybees (*Apis mellifera ssp. sicula*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5864-5874.
- Marshall, T., Williams, K.M. (1987). Electrophoresis of honey: Characterization of trace proteins from a complex biological matrix by silver staining. *Analytical Biochemistry*, 167, 301-303.
- Martos, I., Ferreres, F., Francisco, A., Tomás-Barberán, F.A. (2000a). Identification of flavonoid markers for the botanical origin of eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1498-1502.
- Martos, I., Ferreres, F., Yao, L.H., Bruce D'Arcy, B., Caffin, N., Tomás-Barberán, F.A. (2000b). Flavonoids in monospecific eucalyptus honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4744-4748.
- Mateo, R., Bosch, G., Pastor, A., Jimenez, M. (1987). Capillary column gas chromatographic identification of sugars in honey as trimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 410, 319-328.
- Mateo, R., Bosch-Reig, F. (1998). Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 393-400.

- Mato, I., Huidobro, J., Simal-Lozano, J. (2006a). Review: Analytical methods for the determination of organic acids in honey. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, 3-11.
- Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J., Sancho, M.T. (2006b). Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1541-1550.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577-599.
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, 1187, 18-24.
- Molan, P.C. (1998). The limitations of the methods of identifying the floral source of honeys. *Bee World*, 79, 59-68.
- Moreira, R.F.A., Trugo, L.C., Pietroluongo, M., De Maria, C.A.B. (2002). Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton species*) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7616-7621.
- Nalda, M.J.N., Yague, J.L.B., Calva, J.C.D., Gomez, M.T.M. (2005). Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 311-319.
- Nanda, V., Sarkar, B.C., Sharma, H.K., Bawa, A.S. (2003). Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 613-619.
- Nazarian, H., Taghavizad, R., Majd. A. (2010). Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5), 3221-3228.
- Negri, P., Maggi, M.D., Ramirez, L., de Feudis, L., Szwariski, N., Quintana, S., Eguaras, M.J., Lamattina, L. (2015). Abscisic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie*, 46, 542-557.

- Odeh, I., Abu-Lafi, S., Dewik, H., Al-Najjar, I., Imam, A., Dembitsky, V.M., Hanuš, L.O. (2007). A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101, 1393-1397.
- Overton, S.V., Manura, J.J. (1994). Flavour and aroma in commercial bee honey. *American Laboratory*, 26, 45-53.
- Padovan, G.J., de Jong, D., Rodrigues, L.P., Marchini, J.S. (2003). Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82, 633-636.
- Pasquini, B., Goodarzi, M., Orlandini, S., Beretta, G., Furlanetto, S., Dejaegher, B. (2014). Geographical characterisation of honeys according to their mineral content and antioxidant activity using a chemometric approach. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 1351-1359.
- Patzsch, K., Netz, S., Funk, W. (1988). Quantitative HPTLC of sugars-Part 2: Determination in different matrices. *Journal of Planar Chromatography*, 1, 177-179.
- Pawlowska, M., Armstrong, D.W. (1994). Evaluation of enantiomeric purity of selected amino acids in honey. *Chirality*, 6, 270-276.
- Peris-Tortajada, M., Puchades, R., Maquieira, A. (1992). Determination of reducing sugars by the neocuproine method using flow injection analysis. *Food Chemistry*, 43, 65-69.
- Persano Oddo, L. Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35, S38-S81.
- Persano Oddo, L., Baldi, E., Accorti, M. (1990). Diastatic activity in some unifloral honeys. *Apidologie*, 21, 17-24.
- Persano Oddo, L., Bogdanov, S. (2004). Determination of botanical origin: Problems and issues. *Apidologie*, 35, 2-4.
- Persano Oddo, L., Piazza, M. G., Pulcini, P. (1999). Invertase activity in honeys. *Apidologie*, 30, 57-65.

- Persano Oddo, L., Piazza, M.G., Sabatini, A.G., Accorti, M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26, 453-465.
- Persano Oddo, L., Piro, R., Bruneau, É., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., Flamini, C., Lheritier, J., Morlot, M., Russmann, H., Von der Ohe, W., Von der Ohe, K., Gotsiou, P., Karabournioti, S., Kefalas, P., Passaloglou-Katrali, M., Thrasyvoulou, A., Tsigouri, A., Marcazzan, G.L., Piana, M.L., Piazza, M.G., Sabatini, A.G., Kerkvliet, J., Godinho, J., Bentabol, A., Valbuena, A.O., Bogdanov, S., Ruoff K. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(1), S38-S81.
- Petretto, G.L., Cossu, M., Alamanni, M.C. (2015). Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 482-491.
- Piazza, M.G., Persano Oddo, L. (2004). Bibliographical review of the main European unifloral honeys. *Apidologie*, 35(1), S94-S111.
- Pichichero, E., Canuti, L., Canini, A. (2009). Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 609-616.
- Pirini, A., Conte, L.S. (1992). Capillary gas chromatography determination of free amino acids in honey as a mean of discrimination between different botanical sources. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 165-170.
- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E., Celli, G. (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38, 63-70.
- Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela. (2015). Službeni glasnik Republike Srbije”, broj 101/15, od 8.decembra 2015. godine.
- Primorac, L., Flanjak, I., Kenjerić, D., Bubalo, D., Topolnjak, Z. (2011). Specific rotation and carbohydrate profile of Croatian unifloral honeys. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(5), 515-519.

- Pukl, M., Prosek, M. (1990). Rapid quantitative TLC analysis of sugars using an improved commonly used solvent system. *Journal of Planar Chromatography*, 3, 173-176.
- Pyrzynska, K., Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893-902.
- Radovic, B.S., Careri, M., Manglia, A., Musci, M., Gerboles, M., Anklam, E. (2001a). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72, 511-520.
- Radovic, B.S., Goodacre, R., Anklam, E. (2001b). Contribution of pyrolysis-mass spectrometry (Py-MS) to authenticity testing of honey. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 60, 79-87.
- Rendleman, J.A. (2003). The reaction of starch with iodine vapor. Determination of iodide ion content of starch-iodine complexes. *Carbohydrate Polymers*, 51, 191-202.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Rodriguez-Otero, J.L., Paseiro, P., Simal, J., Cepeda, A. (1994). Mineral content of the honeys produced in Galicia (north-west Spain). *Food Chemistry*, 49, 169-171.
- Rodriguez-Otero, J.L., Paseiro, P., Simal, J., Terradillos, L., Cepeda, A. (1995). Silicon, phosphorus, sulphur, chlorine and ash contents of Spanish commercial honeys. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung (European Food Research and Technology)*, 200, 233-234.
- Ruoff, K., Bogdanov, S. (2004) Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta*, 38, 317-327.
- Ruoff, K., Karoui, R., Dufour, E., Luginbuhl, W., Bosset, J.O., Bogdanov, S., Amado, R. (2005). Authentication of the botanical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. A preliminary study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1343-1347.

- Sanz, S., Perez, C., Herrera, A., Sanz, M., Juan, T. (1995). Application of a statistical approach to the classification of honey by geographic origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 135-140.
- Sarmiento Silva, T.M., Pereira dos Santos, F., Evangelista-Rodrigues, A., Sarmiento da Silva, E.M., Sarmiento da Silva, G., Santos de Novais, J., Ribeiro dos Santos, F.A., Amorim Camara, C. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 10-18.
- Scanu, R., Spano, N., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Sanna, G., Tapparo, A. (2005). Direct chromatographic methods for the rapid determination of homogentisic acid in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Chromatography A*, 1090(1-2), 76-80.
- Schellenberg, A., Chmielus, S., Schlicht, C., Camin, F., Perini, M., Bontempo, L., Heinrich, K., Kelly, S.D., Rossmann, A., Thomas, F., Jamin, E., Horacek, M. (2010). Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. *Food Chemistry*, 121, 770-777.
- Senyuva, H.Z., Gilbert, J., Silici, S., Charlton, A., Dal, C., Gurel, N., Cimen, D. (2009). Profiling Turkish honeys to determine authenticity using physical and chemical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3911-3919.
- Serra Bonvehi, J., Gomez-Pajuelo, A., Gonell-Galindo, F. (1987). Composition, physicochemical properties and pollen spectrum of various single-flower honeys from Spain. *Alimentaria*, 185, 61-84.
- Serra Bonvehi, J., Ventura Coll, F. (1995). Characterization of citrus honey produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2053-2057.
- Sesta, G. (2006). Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37, 84-90.
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., Rege, D.V. (1997). Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity. *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge, 358-379.
- Sivakesava, S. Irudayaraj, J. (2001a). A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup. *Journal of Food Science*, 66, 787-792.

- Sivakesava, S. Irudayaraj, J. (2001b). Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 66, 972-978.
- Solayman, M. Islam, M.A., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M.I., Alam, N., Gan, S.H. (2016). Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 219-233.
- Soler, C., Gil, M.I., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A. (1995) Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. *Apidologie*, 26(1), 53-60.
- Soria, A.C., Martínez-Castro, I., Sanz, J. (2003). Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 26, 793-801.
- Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C., Crozier, A. (2006). On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 253-262.
- Stephens, J.M., Schlothauer, R.C., Morris, B.D., Yang, D., Fearnley, L., Greenwood, D.R., Loomes, K.M. (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry*, 120, 78-86.
- Suarez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J., Sancho, M.T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955, 207-214.
- Swallow, K.W. Low, N.H. (1994). Determination of honey authenticity by anionexchange liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 77, 695-702.
- Šugar, I., Gaži-Baskova, V., Trinajstić, I., Horvatić-Hodak, N., Lovrić, A., Horvatić, S., Kutleša, L. (1983). Vegetacijska karta SR Hrvatske, in: Botanički zavod Prirodoslovno-matematički fakultet (Ed.). Vojnogeografski institut Beograd, Zagreb.

- Tenore, G.C., Ritieni, A., Campiglia, A., Novellino, E. (2012). Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera ssp. sicula*). *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1955-1961.
- Terrab, A., Vega-Perez, J.M., Diez, M.J., Heredia, F.J. (2002). Characterization of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic mass spectrometric analysis of their sugar components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 179-185.
- Tewari, J., Irudayaraj, J. (2004). Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3237-3243.
- Tomás-Barberán, F.A., Grayer-Barkmeijer, R.J., Gil, M.I., Harborne, J.B. (1988). Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the *Labiatae*, the *Scrophulariaceae* and related families. *Phytochemistry*, 27, 2631-2645.
- Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485-496.
- Trautvetter, S., Koelling-Speer, I., Speer, K. (2009). Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie*, 40(2), 140-150.
- Truchado, P., Ferreres, F., Bottolotti, L., Sabatini, G., Tomás-Barberán, F.A. (2008). Nectar Flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8815-8824.
- Truchado, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7241-7248.
- Truchado, P., Vit, P., Heard, T.A., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F. (2015). Determination of interglycosidic linkages in O-glycosyl flavones by high-performance liquid chromatography/photodiode-array detection coupled to

- electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Its application to *Tetragonula carbonaria* honey from Australia. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29, 948-954.
- Tuberoso, C.I.G., Bifulco, E., Caboni, P., Cottiglia, F., Cabras, P., Floris, I. (2010). Floral Markers of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 384-389.
- Tuberoso, C.I.G., Bifulco, E., Caboni, P., Sarais, G., Cottiglia, F., Floris, I. (2011). Lumichrome and Phenyllactic Acid as Chemical Markers of Thistle (*Galactites tomentosa* Moench) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 364-369.
- Tuberoso, C.I.G., Bifulco, E., Jerković, I., Caboni, P., Cabras, P., Floris, I. (2009). Methyl Syringate: A Chemical Marker of Asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv.) Monofloral Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3895-3900.
- Voldrich, M. Rajchl, A, Cizkova, H. Cuhra, P. (2009). Detection of foreign enzyme addition into the adulterated honey. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, S280-S282.
- von der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(1), S18-S25.
- Vorlová, L., Čelechovská, O. (2002). Activity of Enzymes and Trace Element Content in Bee Honey. *Acta Veterinaria Brno*, 71, 375-378.
- Wabaidur, S.M., Ahmed, Y.B.H., Alothman, Z.A., Obbed, M.S., Al-Harbi, N.M., Al-Turki, T.M. (2015). Ultra high performance liquid-chromatography with mass spectrometry method for the simultaneous determination of phenolic constituents in honey from various floral sources using multiwalled carbon nanotubes as extraction sorbents. *Journal of Separation Science*, 38, 2597-2606.
- Wang, J., Kliks, M., Qu, W.Y., Jun, S.J., Shi, G.Y., Li, Q.X. (2009). Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10081-10088.

- Wang, J., Kliks, M.M., Jun, S., Jackson, M., Li, Q.X. (2010a). Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose, and maltose in honeys from different geographic regions using Fourier Transform Infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 75, C208-C214.
- Wang, J., Lu, D., Zhao, H., Jiang, B., Wang, J., Ling, X., Chai, H., Ouyang, P. (2010b). Discrimination and classification of tobacco wastes by identification and quantification of polyphenols with LC-MS/MS. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(7), 875-891.
- Wang, J., Qing, X.L. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins, (Chapter 3), In Taylor, S.L. (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, 89-137. Amsterdam, Holland: Elsevier. ISBN: 978-0-12-385989-1.
- Wang, J., Xue, X., Du, X., Cheng, N., Chen, L., Zhao, J., Zhen, J., Cao, W. (2014). Identification of Acacia Honey Adulteration with Rape Honey Using Liquid Chromatography-Electrochemical Detection and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 7, 2003-2012.
- White, J.W. (1980). Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63, 11-18.
- White, J.W. (1992). Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C-4 plant sugars in honey: Collaborative trial study, and evaluation of improved protein preparation procedure. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 75, 543-548.
- Wilkins, A.L., Lu, Y., Tan S.T. (1995). Extractives from New Zealand honeys: 5. Aliphatic dicarboxylic acids in New Zealand rewarewa (*Knightea excelsa*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 3021-3025.
- Wichtl, M. (2004). Tiliae flos - lime tree flower. In: Wichtl, M. (Ed.), *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, a Handbook of Practice on a Scientific Basis*, third ed. CRC Press, Stuttgart.

- Won, S.R., Lee, D.C., Ko, S.H., Kim, J.W., Rhee, H.I. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 41, 952-956.
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81(2), 159-168.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., Raymont, K. (2005). Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 38(6), 651-658.
- Zgórka, G., Głowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(1):79-87.
- Zhang, X.H., Wu, H.L., Wang, J.Y., Tu, D.Z., Kang, C., Zhao, J., Chen, Y., Miu, X.X., Yu, R.Q. (2013). Fast HPLC-DAD quantification of nine polyphenols in honey by using second-order calibration method based on trilinear decomposition algorithm. *Food Chemistry*, 138, 62-69.

7. PRILOG

Prilog 1. Rezultati polenske analize za lipov med.

Redni broj	Oznaka	<i>Tilia</i> , %	<i>Brassica</i> , %	<i>Robinia</i> , %	<i>Amorpha</i> , %
1	LH1	71	2	7	1
2	LH2	81	3	9	0
3	LH3	80	1	2	1
4	LH4	78	1	3	1
5	LH5	32	6	40	3
6	LH6	99	0	0	0
7	LH7	94	0	1	1
8	LH8	91	1	1	0
9	LH9	25	9	3	51
10	LH10	93	0	0	1
11	LH11	94	2	0	0
12	LH12	67	8	9	0
13	LH13	74	4	7	2
14	LH14	66	3	9	2
15	LH15	92	1	0	4
16	LH16	85	2	1	5
17	LH17	83	1	4	2
18	LH18	86	2	1	5
19	LH19	75	1	1	2
20	LH20	76	0	2	4
21	LH21	84	1	3	4
22	LH22	84	1	1	2
23	LH23	76	1	1	1
24	LH24	64	5	12	8
25	LH25	43	10	35	1
26	LH26	75	2	13	0
27	LH27	74	15	6	0
28	LH28	94	0	0	0

Prilog 2. Rezultati polenske analize za medove od žalfije.

Redni broj	Oznaka	Procenat <i>Salvia officinalis</i> polena u uzorcima meda od žalfije
1	SH1	manje od 3
2	SH2	16–45
3	SH3	3–15
4	SH4	3–15
5	SH5	3–15
6	SH6	16–45
7	SH7	3–15
8	SH8	16–45
9	SH9	3–15
10	SH10	16–45
11	SH11	manje od 3
12	SH12	3–15
13	SH13	3–15
14	SH14	3–15
15	SH15	16–45
16	SH16	3–15
17	SH17	3–15
18	SH18	16–45

Prilog 3. Antioksidativna aktivnost (RSA), ukupni fenoli (TPC) i sadržaj minerala (mg/kg) u medu od žalfije.

	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	SH12	SH13	SH14	SH15	SH16	SH17	SH18
RSA (μmol TE/g)	0,82	0,63	0,53	0,77	0,55	0,57	0,54	0,63	0,61	0,59	0,89	0,47	0,64	0,68	0,42	0,63	0,77	0,35
TPC (mg GAE/kg)	0,55	0,29	0,42	0,59	0,52	0,48	0,47	0,51	0,54	0,56	0,75	0,42	0,53	0,44	0,58	0,55	0,59	0,21
Al	0,09	0,43	0,43	0,42	0,14	0,02	–	0,26	0,50	0,27	0,39	–	0,31	0,88	0,06	0,26	0,15	0,11
As	–	–	–	–	–	–	–	0,01	–	–	–	–	–	–	–	0,01	–	–
B	1,27	2,38	1,13	1,29	1,88	2,76	2,11	2,60	1,91	1,39	2,09	2,20	2,17	1,77	3,03	2,14	1,45	1,68
Ba	0,05	0,09	0,08	0,07	0,08	0,07	0,06	0,08	0,07	0,06	0,07	0,08	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06
Ca	23,82	49,89	50,43	50,47	36,79	23,59	31,56	47,12	34,38	32,75	39,98	20,41	35,10	22,98	36,47	30,21	30,49	20,89
Co	–	–	–	0,01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Cr	–	–	–	–	–	–	–	0,01	0,01	0,01	0,01	–	0,01	0,01	–	–	–	–
Cu	0,10	0,30	0,19	0,13	0,22	0,20	0,28	0,17	0,23	0,15	0,22	0,22	0,17	0,19	0,31	0,15	0,12	0,11
Fe	0,25	0,93	0,53	0,53	0,46	0,44	0,27	0,85	0,37	0,48	2,28	0,40	2,49	0,81	0,20	0,38	0,25	0,50
K^a	2,15	1,28	1,84	2,04	1,31	0,84	0,91	0,98	1,03	1,12	1,87	0,59	1,30	0,73	1,21	1,15	2,11	0,68
Mg	5,02	26,41	11,76	10,12	7,93	7,93	8,90	25,90	8,04	11,19	8,79	5,94	7,11	9,96	10,52	7,15	5,73	10,17
Mn	0,20	0,77	1,06	0,60	0,28	0,14	0,24	1,06	0,37	0,30	0,64	0,17	0,32	0,27	0,28	0,33	0,27	0,19
Na	8,38	6,97	0,12	38,93	28,63	7,81	3,20	12,34	6,64	6,52	8,40	18,69	6,02	5,61	10,43	5,14	17,00	1,17

Prilog 3. Nastavak.

	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	SH12	SH13	SH14	SH15	SH16	SH17	SH18
Ni	0,02	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03	0,07	0,03	0,01	0,01	0,15
P	34,57	101,56	37,33	44,22	41,34	36,46	40,29	56,05	32,73	49,51	39,07	33,43	33,64	41,74	48,82	32,05	35,39	39,01
Pb	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,07	–	–	–	–	0,03	–	–
S	26,13	43,39	27,43	29,32	26,23	23,61	27,71	33,12	20,12	91,51	28,14	19,26	22,44	23,16	34,54	21,44	24,58	16,33
Sb	–	0,01	–	–	0,03	0,01	–	–	–	–	–	–	0,02	–	0,05	–	–	–
Se	0,02	0,03	0,04	0,06	0,06	0,03	0,05	0,07	0,01	0,05	0,04	0,05	0,02	–	0,05	0,04	0,05	0,04
Sr	0,02	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,01	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02
V	–	0,01	–	–	–	–	–	–	0,01	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Zn	1,12	0,69	1,16	1,42	1,03	0,20	0,57	0,59	0,87	1,08	7,19	0,27	2,22	0,24	0,49	1,23	0,78	5,89

^aKoncentracija kalijuma je izražena u mg/g. **TE** – Troloks ekvivalent; **GAE** – Ekvivalent galne kiseline.

Prilog 4. Polifenoli (mg/kg), *TPC* (mg GAE/kg), *RSA* ($\mu\text{mol TE/g}$), šećeri, šećerni alkoholi (g/kg) i minerali (mg/kg) u medovima od nane, vreska i majčine dušice.

Uzorak	MH1	WSH	WSH2	WSH	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
Botaničko poreklo	Nana	Vresak			Majčina dušica				
Polifenoli (mg/kg)									
GaA	0,26	–	0,15	0,15	0,12	0,12	0,14	0,13	0,12
GC	0,29	0,51	0,32	0,15	–	0,57	–	0,22	0,40
PrA	0,68	1,10	0,95	0,38	2,25	0,63	0,25	0,23	0,23
EGC	0,14	0,15	0,07	0,08	0,14	0,12	0,19	0,13	–
C	–	–	0,09	0,06	–	–	0,04	0,01	–
ChA	0,67	0,14	0,25	0,06	–	0,07	0,08	0,03	–
HBA	1,63	2,03	1,69	1,52	3,77	3,91	1,38	3,36	3,68
EC	0,19	–	0,02	0,02	–	–	–	0,18	–
GCG	1,83	0,80	1,12	0,95	0,77	2,56	0,95	1,09	0,87
EGCG	0,88	0,66	1,14	1,06	0,74	1,24	0,83	1,28	1,31
CaA	1,17	0,33	1,10	0,29	0,36	0,51	1,02	0,34	0,27
GeA	–	–	–	–	0,06	–	0,22	–	–
CoA	3,23	3,12	9,87	1,68	0,93	1,84	7,26	7,13	1,08
FeA	0,33	1,37	3,17	1,28	0,19	0,72	0,27	0,17	0,19
RoA	–	0,02	0,27	0,03	0,05	1,35	–	0,70	0,24
AbA	1,22	1,47	1,29	1,01	0,23	1,08	0,58	1,49	0,63
QUE	0,37	0,10	0,28	0,07	0,10	0,13	0,06	0,05	0,04
RES	0,55	–	–	–	0,24	0,07	–	–	–
KAE	0,32	0,10	0,27	0,06	–	–	–	–	–
PNB	2,27	0,15	1,63	–	0,39	1,07	2,91	0,45	0,16
HES	1,01	–	0,58	–	–	0,11	1,38	–	–
PNS	0,33	–	0,22	–	–	–	0,04	–	–
CHR	1,46	0,15	0,91	0,03	0,13	0,17	1,38	0,25	0,06
PNC	1,05	–	0,67	–	–	0,17	1,25	0,11	–
GLN	0,36	–	0,22	–	–	–	0,07	–	–
TPC	677,3	204,35	487,24	322,07	120,3	225,9	170,8	246,6	277,3
RSA	1280,	418,72	1362,8	727,73	416,2	266,7	463,9	436,2	309,4

Prilog 4. Nastavak.

Uzorak	MH1	WSH1	WSH2	WSH3	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
Botaničko poreklo	Nana	Vresak			Majčina dušica				
Šećeri i šećerni alkoholi (g/kg)									
ERY	0,07	0,09	0,04	0,03	0,17	0,17	0,07	0,16	0,11
SOR	0,05	0,10	0,15	0,17	0,47	0,86	0,17	0,28	0,09
TRE	3,05	12,02	15,04	17,22	3,38	0,62	0,69	1,49	1,48
ARA	0,09	0,09	3,54	3,49	0,02	0,02	0,05	0,06	0,04
GLU	240,19	314,92	313,73	263,33	328,46	319,84	326,00	297,68	293,48
FRU	317,11	493,25	470,95	447,55	474,74	486,29	452,28	506,67	504,35
SUC	12,28	8,65	11,71	16,09	15,11	15,96	17,06	19,54	15,30
TUR	0,27	0,72	1,38	1,67	0,03	0,04	0,09	0,17	0,17
GLY	0,05	0,13	0,26	0,30	0,16	0,23	0,25	0,11	0,17
GAL	0,05	0,03	0,18	0,07	0,56	0,11	0,04	0,04	0,10
iMAL	1,87	5,88	7,58	9,79	8,08	7,63	8,32	6,64	2,64
iMALt	1,33	1,98	0,89	3,79	1,30	1,55	1,85	0,68	0,74
MAL	5,50	5,11	6,98	8,83	21,86	21,31	20,76	14,59	6,48
MALt	0,05	0,04	0,06	0,05	0,33	0,34	0,39	0,07	0,18
SUM	581,96	843,03	832,47	772,38	854,66	854,98	828,03	848,18	825,33
F/G	1,32	1,57	1,50	1,70	1,45	1,52	1,39	1,70	1,72
M/iM	2,94	0,87	0,92	0,90	2,70	2,79	2,50	2,20	2,45

Prilog 4. Nastavak.

Uzorak	MH1	WSH1	WSH2	WSH3	TH1	TH2	TH3	TH4	TH4
Botaničko poreklo	Nana		Vresak				Majčina dušica		
	Minerali (mg/kg)								
Al	0,12	3,41	0,10	–	0,32	1,01	–	1,29	0,37
B	0,45	–	–	–	–	–	1,01	–	–
Ba	0,31	0,06	0,06	0,04	0,06	0,09	0,02	0,04	0,07
Ca	102,21	47,75	54,66	54,6	60,9	62,86	28,84	60,5	58,76
Cd	–	0,01	–	–	0,01	–	–	–	–
Co	–	0,01	–	0,01	–	–	–	–	0,01
Cr	0,01	0,04	0,02	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,05
Cu	0,13	0,39	0,3	0,26	0,17	0,10	0,10	0,05	0,06
Fe	0,67	1,57	1,16	1,59	3,05	1,55	1,29	1,68	1,2
K^a	1,35	1,01	1,15	1,05	0,69	0,51	1,08	0,7	0,67
Li	–	–	–	–	0,01	–	–	–	–
Mg	26,99	21,2	18,54	17,94	21,82	14,92	10,88	5,76	7,56
Mn	5,28	1,07	0,66	0,25	0,20	0,15	0,09	0,08	0,09
Mo	–	–	–	0,01	0,01	–	0,01	–	–
Na	91,17	80,94	79,47	71,00	132,71	106,04	124,8	135,4	111,53
Ni	0,06	0,18	0,03	0,10	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03
P	65,94	75,49	73,18	67,12	46,16	53,42	48,94	32,09	40,22
Pb	0,02	–	–	–	0,06	–	–	–	–
S	37,72	55,95	38,63	33,64	45,6	37,71	28,67	27,65	25,13
Sb	–	–	–	0,01	–	0,02	–	–	0,03
Se	0,06	0,08	0,04	0,09	0,03	0,08	0,07	0,12	0,05
Sr	0,14	0,04	0,03	0,03	0,23	0,14	0,05	0,15	0,07
V	0,01	–	–	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	–
Zn	0,57	0,32	1,92	0,13	1,54	0,51	1,18	–	0,25

^aKoncentracija kalijuma je izražena u mg/g..

8. BIOGRAFIJA

Uroš Gašić je rođen 24. novembra 1986. godine u Šapcu. Osnovnu školu završio je u Mehovinama i Vladimircima, a srednju školu (gimnazija, prirodno-matematički smer) u Šapcu. Školske 2005/06. godine upisao se na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, a diplomirao u septembru 2011. godine sa prosečnom ocenom 7,67 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Master akademske studije pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisao je 2011. godine kod mentora prof. dr Živoslava Tešića, a završio 2012. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Master tezu pod naslovom "Određivanje polifenolnog profila i geografskog porekla livadskog meda iz Srbije" odbranio je u septembru 2012. godine sa ocenom 10. Iste godine upisao je doktorske akademske studije pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i položio sa najvišim ocenama sve planom i programom predviđene ispite.

Od juna 2009. godine bio je zaposlen kao tehnički saradnik, a od avgusta 2012. godine radi kao stručni saradnik na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U okviru izrade diplomskog i master rada učestvovao je u realizaciji eksperimentalnih vežbi na kursovima iz različitih oblasti analitičke hemije. Uspešno je završio nekoliko naprednih kurseva teče hromatografije i masene spektrometrije. Bio je angažovan na inovacionom projektu br. 451-03-2802-IP Tip 1/78. Član je Srpskog hemijskog društva od 2011. godine (Sekcija za hemiju hrane), kao i Kluba mladih hemičara Srbije. Od aprila 2017. član je Nadzornog odbora AKUD "Branko Krsmanović" (Krsmanac).

U toku svog naučno-istraživačkog rada, bavi se određivanjem šećernog i polifenolnog profila različitih namirnica (med, vino, grožđe, bobičasto voće i sl.) pomoću jonske hromatografije sa elektrohemijским detektorom i tečne hromatografije spregnute sa masenim detektorom visoke rezolucije. Pored toga, bavi se analizom odnosa stabilnih izotopa u različitim pićima i namirnicama, a takođe i primenom i razvojem novih analitičkih tehnika za ispitivanje meda, voća, povrća, vina i drugih alkoholnih pića, a sve u cilju utvrđivanja njihove autentičnosti, botaničkog i geografskog porekla.

Uroš Gašić je koautor dvadeset dva naučna rada u renomiranim međunarodnim časopisima, devet radova u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), sedam radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), tri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i tri rada u međunarodnim časopisima (M23). Koautor je jednog poglavlja u knjizi međunarodnog značaja (M14), kao i više od trideset saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima. Prvi autor je na pet naučnih radova (svih pet se bave analitikom meda) i jednom je bio autor za korespondenciju (*Journal of AOAC International*). Ukupan broj citata (izvor: *Google Scholar*, *Scopus* i *Web of Science*): 230 (*h* indeks 7); bez autocitata: ~ 200 (*h* indeks 6). Bio je recenzent osam naučnih radova u časopisu *Food Chemistry* (međunarodni časopis izuzetnih vrednosti (M21a)).

Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije

1. Naučni radovi

1.1. M21 – Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu

1.1.1. Gašić, U., Natić, M., Mišić, D., Lušić, D., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž., Lušić, D. [Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey](#). *Journal of Food Composition and Analysis* (2015), 44, 128-138. DOI: 10.1016/j.jfca.2015.08.008. ISSN: 0889-1575 (Impact factor 2015, **2.780** - Chemistry, Applied (15/71), Food Science & Technology (21/124))

1.2. M22 – Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu

1.2.1. Gašić, U., Šikoparija, B., Tosti, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. [Phytochemical Fingerprints of Lime Honey Collected in Serbia](#). *Journal of AOAC International* (2014), 97(5), 1259-1267. DOI: 10.5740/jaoacint.SGEGasic. ISSN: 1060-3271 (Impact factor 2013, **1.385** - Food Science & Technology (59/122))

1.3. M23 – Rad objavljen u međunarodnom časopisu

1.3.1. Gašić, U., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž. [Polyphenols as Possible Markers of Botanical Origin of Honey](#). *Journal of AOAC International* (2017), Article in press. ISSN: 1060-3271 (Impact factor 2015, **0.918** - Food Science & Technology (78/125))

2. Saopštenje sa naučnog skupa

2.2. M 32 – Predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

2.2.1. Tešić, Ž., Milojković-Opsenica, D., Trifković, J., Natić, M., Gašić, U., Šikoparija, B., Dojčinović, B. [Modern analytical methods in characterisation of linden honey](#), 44th Apimondia International Apicultural Congress, September 29th-October 4th, 2013, Kyiv, Ukraine. Book of abstract, 301.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Фитохемијски маркери ботаничког и географског порекла меда”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 08.05.2017

Урош Јасић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора __Урош М. Гашић_____

Број индекса __ДХ41/2012_____

Студијски програм __доктор хемијских наука_____

Наслов рада „Фитохемијски маркери ботаничког и географског порекла меда” __

Ментор __ др Живослав Тешић, редовни професор_____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 08.05.2017.

Урош М. Гашић

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Урош М. Гашић

Број индекса ДХ41/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Фитохемијски маркери ботаничког и географског порекла меда”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 08.05.2017

Урош Гашић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.