

# PROCJENA KVALITETE MEDA NA TRŽIŠTU REPUBLIKE HRVATSKE ODREĐIVANJEM FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA

---

**Kolić, Tea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:491067>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Tea Kolić

PROCJENA KVALITETE MEDA NA TRŽIŠTU REPUBLIKE HRVATSKE  
ODREĐIVANJEM FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Tea Kolić

PROCJENA KVALITETE MEDA NA TRŽIŠTU REPUBLIKE HRVATSKE  
ODREĐIVANJEM FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

**Mentor rada:** Izv.prof.dr.sc. Aleksandar Bulog, dipl.sanit.ing.

Diplomski rad obranjen je dana 18.06.2019. na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo

Primorsko-goranske županije, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Sandra Pavičić Žeželj, dipl.sanit.ing.
2. Doc.dr.sc. Željko Linšak, dipl.sanit.ing.
3. Izv.prof.dr.sc. Aleksandar Bulog, dipl.sanit.ing.

Rad ima 55 stranica, 6 slika, 8 tablica, 21 literaturni navod.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentoru izv.prof.dr.sc. Aleksandru Bulogu na prihvaćenom mentorstvu i pruženoj pomoći prilikom izrade rada te mr.sc. Sanji Klarić na pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela rada, obitelji, prijateljima i svima koji su mi pomogli u pisanju ovog diplomskog rada.

## **Sažetak**

Med je pčelinji proizvod koji se od davnina koristi kao hrana s blagotvornim djelovanjem na ljudski organizam. Iz ekonomskih razloga na tržištu se često pronalaze patvoreni uzorci meda koji mogu naštetiti ljudskom zdravlju i potrošače dovesti u zabludu glede njegove kvalitete.

U ovom radu analizirano je 29 uzoraka različitih vrsta meda na tržištu Republike Hrvatske u razdoblju od 2017. do 2018.godine. Analizirani su udio vode, električna vodljivost, HMF i napravljena je peludna analiza. Usporedbom rezultata s važećem propisima za med najviše nesukladnih uzoraka bilo je kod peludne analize (8 uzoraka), zatim kod električne vodljivosti (7 uzoraka), HMF-a (4 uzorka) te udjela vode (1 uzorak). Govoreći o vrsti meda, najmanje zadovoljavajući bio je med od kadulje s ukupno 4/5 nesukladna uzorka.

**Ključne riječi:** med, fizikalno-kemijski parametri, peludna analiza

## Summary

Honey is a bee product that has been used as a food for a long time with beneficial effect on the human body. For economic reasons, there are often found falsified honey samples on the market, which can affect human health and mislead consumers in terms of its quality.

In this study 29 samples of different honey types from the Croatian market has been analyzed in the period from 2017. to 2018. The analyzed parameters are water content, electrical conductivity, HMF, and pollen content. Comparing the results with current regulations for honey, pollen analysis had the most non-conforming samples (8 samples), than electrical conductivity (7 samples), HMF (4 samples) and water content (1 sample). Speaking of type of honey, the least satisfying was sage honey with total of 4/5 non-conforming samples.

**Key words:** honey, physico-chemical parameters, pollen analysis

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. MED .....	1
1.2. VRSTE MEDA .....	2
1.3. PROCES ZRENJA MEDA.....	3
1.4. KEMIJSKI SASTAV MEDA.....	4
1.4.1. Nektar .....	5
1.4.2. Pelud .....	6
1.4.3. Voda.....	7
1.4.4. Šećeri .....	8
1.4.5. Organske kiseline.....	11
1.4.6. Dušikovi spojevi .....	12
1.4.7. Vitamini .....	16
1.4.8. Minerali.....	17
1.4.9. Fenolni spojevi.....	18
1.4.10. Hlapljivi spojevi.....	19
1.4.11. Pigmenti.....	20
1.4.12. Lipidi.....	20
1.5. FIZIKALNA SVOJSTVA MEDA.....	21
1.5.1. Boja.....	21
1.5.2. Električna vodljivost .....	22
1.5.3. Gustoća .....	22
1.5.4. Viskoznost .....	23
1.5.5. Optička aktivnost .....	23
1.5.6. Indeks loma.....	24
1.5.7. Higroskopsnost.....	24
1.5.8. Osmotski tlak .....	25
1.5.9. Kristalizacija.....	25
1.6. OPASNOSTI U MEDU.....	27
1.6.1. Biološke opasnosti .....	27
1.6.2. Kemijske opasnosti .....	28
1.6.2.1. HMF .....	28
1.6.2.2. Policiklički aromatski ugljikovodici.....	28
1.6.3. Prirodne toksične tvari .....	29
1.6.3.1. Piroloidni alkaloidi .....	30
1.6.3.2. Grajanotoksin .....	30
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>30</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>31</b>

3.1.	ODREĐIVANJE UDJELA VODE .....	31
3.1.1.	Postupak.....	32
3.2.	ODREĐIVANJE ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI.....	33
3.2.1.	Postupak.....	33
3.3.	ODREĐIVANJE HMF-A .....	35
3.3.1.	Princip rada HPLC-a.....	35
3.3.2.	Postupak.....	36
3.4.	PELUDNA ANALIZA.....	38
3.4.1.	Postupak.....	38
3.5.	METODE OBRADE REZULTATA.....	41
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>53</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Med

Med je prirodno slatka, gusta, viskozna tvar koju čovjek koristi već tisućljećima, ne samo kao hranu već i kao lijek. Prvi podaci o tome sežu još u doba Indijanaca koji su med koristili za razvoj organizma i jačanje imuniteta. Kroz povijest je poznato još da se u staroj Grčkoj za vrijeme Olimpijskih igara med koristio kao izvor energije, za stimulaciju srca, smanjenja umora i iscrpljenost kod sportaša. Kod Egipćana služio je za održavanje ljepote i balzamiranje, a u Rimu za zaslađivanje vina (1).

Ayurvedska i Yunani medicina, poznate su već stoljećima, a med koriste kao glavni lijek za sve vrste bolesti, što i nije tako nevjerovatno jer je Hipokratu (ocu medicine) med bio najomiljeniji lijek (1).

Od 20.000 poznatih vrsta pčela, med proizvodi približno 8 vrsta koje su poznate pod nazivom pčele medarice ili lat. *Apis mellifera* (2). One med mogu proizvesti skupljanjem nektara medonosnih biljaka, sekreta sa živih dijelova biljaka ili slatkih izlučevina kukaca koji se hrane na biljkama. Nakon što skupe nektar, sekret ili izlučevine, pčele mu dodaju različite tvari u procesu probave, obrađuju te odlažu u stanice saća do sazrijevanja (3).

U Europskoj uniji (EU) godišnje se proizvede 250.000 tona meda. Ta količina meda čini samo 60 % potreba tržišta s prosječnom potrošnjom meda od 0,9 kg po glavi stanovnika godišnje. Ostatak od 40 % potrebne količine meda se uvozi.

U EU med je hrana koja se nalazi u prvih 10 proizvoda koje se najčešće patvore. Patvoreni med ne samo da ekonomski ugrožava pčelarstvo nego predstavlja rizik za javno zdravlje,

stoga je od velike važnosti stalno provoditi fizikalno-kemijske i druge analize nad kvalitetom meda (4).

Med koji se prodaje kao proizvod za sebe, ne smije sadržavati aditive niti bilo koje druge naknadno dodane tvari hrane, niti mu se smiju uklanjati njegove sastavne komponente, poput peludi. Kao i svaki drugi prehrambeni proizvod on mora udovoljavati propisima za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu meda (2).

Kako u EU tako i u Hrvatskoj zahtjevi za kvalitetu meda uređeni su s nekoliko propisa. U Hrvatskoj su to Pravilnik o medu (NN 053/2015) (5) i Pravilnik o izmjenama Pravilnika o medu (NN 047/2017) (6) te Pravilnik o kakvoći uniflornog meda (NN 122/2009) (7) i Pravilnik o izmjenama Pravilnika o kakvoći uniflornog meda (NN 14172013) (8). Pravilnici su skladu s Direktivom Vijeća 2001/110/EZ od 20. prosinca 2001. o medu (9) i Direktivom 2014/63/EU Europskog Parlamenta i Vijeća od 15. svibnja 2014. o izmjeni Direktive Vijeća 2001/110/EZ o medu (10) te Codex Alimentarius standardom za med (3).

## **1.2. Vrste meda**

Med se može podijeliti prema podrijetlu i prema načinu proizvodnje. Osnovne vrste meda prema podrijetlu su cvjetni med koji se još naziva i nektarni te medljikovac koji još dolazi pod nazivom medun ili šumski med (5).

Cvjetni med dobiva se od nektara biljaka, a medljikovac od izlučevina kukaca iz reda Hemiptera. Najčešće su to lisne uši, koje žive na živim dijelovima biljaka, sišu biljne sokove iz kojih iskorištavaju dušične tvari za vlastiti organizam te izlučuju mednu rosu ili medljku

koju pčele skupljaju. Medljikovac, osim skupljanjem medne rose može nastati i skupljanjem sekreta izravno s živih dijelova biljaka (5).

Prema načinu na koji se proizvodi, na tržištu možemo naći med u saću, med sa saćem, cijedeni med koji se dobiva ocjeđivanjem saća kojem su skinuti voštani poklopci, vrcani med, dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća, med dobiven prešanjem saća i filtrirani med dobiven na način da se tijekom uklanjanja stranih organskih i anorganskih tvari uklonio i značajan dio peludi. Na tržištu se još javlja i med za industrijsku upotrebu koji se kako mu sam naziv govori koristi u industriji ili kao sastojak neke hrane koja se dalje obrađuje. U ovu vrstu meda svrstavaju se svi oni medovi kojima nedostaje neko od karakterističnih svojstava za med (3).

### **1.3. Proces zrenja meda**

Pčele sakupljačice skupljaju nektar ili mednu rosu i prave med. To im omogućuje njihova anatomija. Pčele imaju posebnu složenu anatomiju za skupljanje nektara ili medne rose i njegovu obradu u probavnom sustavu. Usni aparati i medni želudac (medna vreća) pčele najvažniji su dijelovi za nastanak meda. One sišu nektar ili mednu rosu usnim aparatom. Maksimalno 25 mg nektara ili medne rose pohranjuju na dnu jednjaka u proširenoj regiji koja se naziva medni želudac. U mednom želudcu pčela usisani nektar miješa s izlučevinama dviju žlijezda, salivarnih i hipofaringealnih. Upravo te izlučevine sadrže enzime koji počinju kemijski mijenjati sastav nektara ili medne rose. Ti enzimi nazivaju se pčelinja invertaza i dijastaza koje razgrađuju saharozu iz nektara na glukozu i fruktozu te pčelinja glukozooksidaza koja oksidira glukozu u glukonsku kiselinu uz nastajanje vodikovog peroksida. Time se gotovo odmah po preuzimanju, nektar pretvara u med. Pčela sakupljačica dolazi do košnice gdje sadržaj iz želuca predaje pčeli preuzimačici ili „kućnoj“ pčeli. Ona također dodaje svoje

enzime nektaru te uzastopce (120-200x) ispušta i ponovno usisava kapljice nektara. Osim što dodatno obogaćuje nektar enzimima ovaj proces naziva se još i prvom fazom uklanjanja vode, gdje se udio vode smanjuje na 40-50 %. Nektar se nakon tog odlaže u saće, gdje pčela koja ga je odložila svojim mahanjem krila potiče strujanje zraka i isparavanje vode. Taj korak se ujedno smatra drugom fazom uklanjanja vode. Proces traje 5-6 dana i udio vode smanji se na 15-20 %. Nakon što su saće pune dozrelog meda pčele ih zatvaraju voštanim poklopcima (2).

#### **1.4. Kemijski sastav meda**

Generalno gledano med je po svom sastavu koncentrirana vodena otopina šećera. No proučimo li malo bolje sam sastav meda, on je puno više od tog. Njegova jedinstvena, ali varijabilna kombinacija sastojaka čini ga vrlo vrijednim dodatkom prehrani (11).

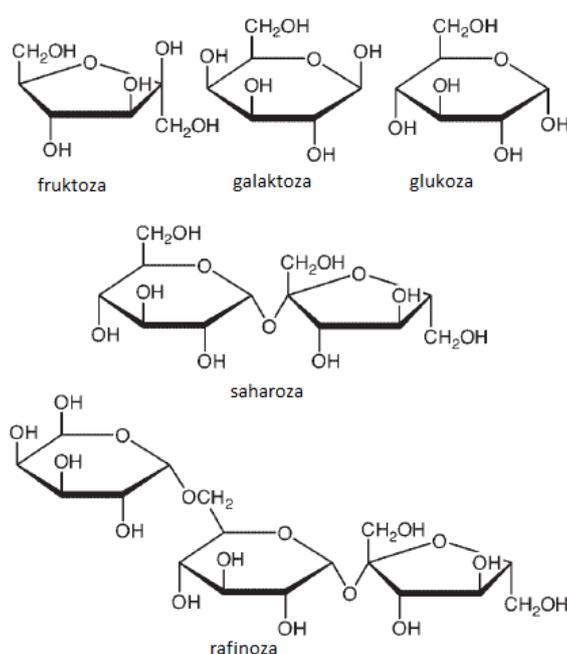
Glavne komponente meda su invertni šećeri glukoza i fruktoza, a mogu se naći i neki drugi šećeri, pelud i ostaci nektara, razni enzimi, organske kiseline i aminokiseline, polifenoli, flavonoidi, karotenoidi, vitamini i minerali te štetni produkti Maillardovih reakcija (11).

Sam sastav meda ne ovisi samo o vrsti meda već i o geografskom podrijetlu. Osim što se razlikuje od zemlje do zemlje, ista vrsta med čak i u istoj zemlji, ali različitim regijama može imati različit sastav. To je dakako najčešće rezultat različitih okolišnih čimbenika poput sastava tla, izvora nektara, klime, godišnjeg doba i sl. (11). Na sam sastav uvelike utječe i pčelarska praksa te uvjeti skladištenja meda (12).

Više različitih izvora nektara znači i veći raspon tvari u medu. Posljedično tome uniflorni medovi imati će manje bogat sastav, zbog veće dosljednosti jednom izvoru (2).

### 1.4.1. Nektar

Većina meda potječe od nektara, kojeg biljke izlučuju iz žlijezdi zvanih nektarije. Nektarije mogu biti cvjetne ukoliko se nalaze na cvijetu biljke ili ekstrakvjetne ukoliko se nalaze na nekom drugom dijelu biljke. Nektar je po svom sastavu vodena otopina šećera, aminokiselina, proteina, lipida, minerala i drugih komponenti. Točan sastav nektara značajno varira, ovisno o biljnim vrstama i okolišnim čimbenicima. Na primjer, ukupni sadržaj šećera u nektaru može biti u rasponu od 5–80 %. Vrste šećera također mogu varirati, a najčešći šećeri u nektaru, a posljedično tome i u medu prikazani su na Slici 1. zajedno s njihovim strukturama (2).



**Slika 1.** Strukture šećera koji se mogu naći u medu i nektaru (2).

U mnogim nektarima saharoza je glavni ili jedini šećer, dok su u nekim vrstama saharoza, glukoza i fruktoza prisutne u približno jednakim količinama. Tako je na primjer, u porodici Lamiaceae (menta) i Ranunculacea (žabnjak ljutić) saharoza dominantni šećer. Dok s druge

strane u porodicama Brassicaceae (senf, kupus) i Asteraceae (tratinčice, suncokreti) saharoze gotovo da i nema, a glukoza i fruktoza u različitim omjerima čine veći dio. Rafinoza i galaktoza, pronađeni su tek u nekoliko vrsta biljnih nektara i nisu široko rasprostranjeni (2).

Osim šećera u nektaru se nalaze još i aminokiseline, ali svega 0,002-4,8 %. Taj je udio premali da bi pčele zadovoljile svoje prehrambene potrebe za njima, stoga ih nadopunjavaju aminokiselinama iz peludi. Osim aminokiselina nektar je izvor lipida, organskih kiselina (uključujući askorbinsku kiselinu) i minerala. Sastav nektara uvelike određuje okus i kvalitetu gotovog meda (2).

#### **1.4.2. Pelud**

Pčele skupljaju pelud s vrhova cvjetova istodobno mu dodajući nektar. Peludi ili cvjetni praha smatra se vrlo bogatim izvorom hranjivih tvari za pčele. On se sastoji od vode, bjelančevina, šećera, škroba, masti, celuloze, mliječne kiseline, vitamina i pepela. Pelud nije pčelinji proizvod, on je sastavni dio cvijeta i služi za oprašivanje. Pčele od peludi prvenstveno rade matičnu mliječ i s njom hrane svoje ličinke i maticu. Boja peludi može varirati od žute, narančaste, crveno-smeđe, plave, pa sve do crne boje (1).

Melisopalinologija ili peludna analiza meda grana je palinologije, znanstvene discipline koja proučava pelud i spore. Melisopalinologija je od velike važnosti za kontrolu kvalitete meda. Med sadrži brojna peludna zrnca te spore gljivica, alge i voskove ovisno o tome čime se pčele najviše hrane. Svi ti faktori zajedno mogu nam dati dobru potvrdu geografskog i botaničkog podrijetla meda. Štoviše, peludna analiza pruža i neke važne informacije o vrcanju i filtriranju meda, fermentaciji, patvorenju i higijenskoj praksi (13).

### 1.4.3. Voda

Udio vode u medu jedan je od glavnih parametara za određivanje kvalitete meda (14). Udio vode ne smije biti veći od 20 % i zbog te činjenice mnogi kažu da je med jedina hrana koja se ne može pokvariti. To je djelomično točno. Zbog male vlažnosti i velikog osmotskog tlaka bakterije u medu ne mogu preživjeti što ga čini mikrobiološki sigurnim. Međutim, to ne vrijedi ukoliko je udio vode viši nego što bi trebao biti (2). Količina vode u medu ovisi o različitim čimbenicima kao što su botaničko i geografsko podrijetlo nektara, vrsta tla i klimatski uvjeti, sezona vrcanja, stupanj zrelosti, pčelarska praksa te uvjeti skladištenja. Ovisno o botaničkom podrijetlu varira količina vode, pa tako med od vrijeska, djeteline i jagodičastog bilja ima prirodno veći udio vode (14).

Med je higroskopan, što znači da lako navlači vodu iz atmosfere pogotovo ako nije skladišten na odgovarajući način. U tom slučaju on je podložan kvarenju i njegov rok trajanja je kraći. Veći udio vode i kao posljedica tog veća mogućnost kvarenja bit će i u slučaju kad je vrcan prerano, odnosno kad pčele nisu uspjele do kraja napuniti i zatvoriti svoje saće, što se pripisuje pogrešci pčelara (2).

Da bi se očuvala kvaliteta i nutritivna vrijednost meda, udio vode ne bi trebao prelaziti 20 % (3). Osim tog, veći udio vode olakšava kristalizaciju te fermentaciju prilikom koje dolazi do proliferacije kvasaca zbog nedovoljno visokog osmotskog tlaka, posljedično čega nastaju mliječna kiselina i alkohol što uvelike smanjuje rok trajanja meda, ali i nutritivnu vrijednost (15). Osim na fermentaciju i kristalizaciju, udio vode utječe i na boju, okus, gustoću i viskoznost (14).

**Aktivnost vode** ( $a_w$ ) je količina vode dostupna mikroorganizmima u određenoj namirnici, konkretno ovdje u medu. Šećeri u medu vežu jedan dio od ukupne količine vode i čine je nedostupnim mikroorganizmima za rast. Iz tog razloga aktivnost vode bolji je kriterij za

određivanje stupnja kvarenja meda od ukupne količine vode. Aktivnost vode definira se kao tlak vodene pare u nekoj hrani ( $p$ ) i tlak pare čiste vode ( $p_0$ ) na istoj temperaturi. Aktivnost čiste vode je 1 i dodatak bilo kojih tvari koji vežu vodu dovodi do toga da je  $p < p_0$ . Iz tog razloga aktivnost vode u nekoj hrani je uvijek niža od 1. U medu se kreće uglavnom od 0,49 do 0,65 iako u nekim vrstama meda može doseći vrijednost od 0,75. Potrebna aktivnost vode za razvoj mikroorganizama je oko 0,90 za bakterije, 0,80 za kvasac i 0,70 za plijesni. Vrijednosti ispod 0,60 inhibiraju rast svih osmofilnih kvasaca koje uzrokuju fermentaciju meda (14).

Aktivnost vode ovisi o sastavu šećera i kristalizaciji meda. Ona se može koristiti za predviđanje promjena u udjelu vode u medu, budući da med dobiva ili gubi vlagu ovisno o relativnoj vlažnosti okoline u kojoj se nalazi. Štoviše, aktivnost vode u medu koji je kristalizirani je veća nego kad je med u svom prirodnom tekućem obliku. To je iz razloga što tijekom procesa kristalizacije dolazi do oslobađanja vode koja je bila vezana na glukozu (14).

Ukupna količina vode redovito se koristi kao parametar procjene kvalitete meda iz razloga što pčelari sve češće, iz ekonomskih razloga dodaju vodu u med. Osim navedenog, aktivnost vode također bi trebala biti redovito kontrolirani parametar s obzirom da ukazuje na količinu vode dostupne mikroorganizmima za rast i razmnožavanje te posljedično vjerojatnost fermentacije, odnosno kvarenja meda (14).

#### **1.4.4. Šećeri**

Med je prezasićena otopina šećera u kojoj isti čine i do 95 % suhe tvari meda (12). Udio šećera izražava se u stupnjevima Brix-a ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), koji označava omjer mase otopljenog šećera i vode. Med ima oko 83  $^{\circ}\text{Bx}$ , što znači da na 100 g otopine sadrži 83 g šećera. Ova jedinica se

uobičajeno, osim za izražavanje šećera u medu, koristi i kod javorovog sirupa te fermentiranih i koncentriranih sokova (2).

Iako koncentracije fruktoze i glukoze nisu iznad granice zasićenja pojedinačno, (69g/100g H<sub>2</sub>O za fruktozu i 380g/100g H<sub>2</sub>O za glukožu), ukupna koncentracija šećera smatra se dovoljno visokom da se med može nazvati prezasićenom otopinom (2).

Većinu šećera, odnosno ugljikohidrata čine monosaharidi, na prvom mjestu fruktoza (32-44 %), nakon koje odmah slijedi glukoza (23-38 %). U nešto manjim koncentracijama može se naći još 45 različitih disaharida, trisaharida i ostalih oligosaharida (5-15 %); maltoza, saharoza, izomaltoza, nigerzoza, turanoza, trehaloza, gentobioza, laktoza, rafinoza, kojibioza, erloza, melezitoza, maltotrioza, panoza, izomaltotrioza i maltotetraoza (14).

Maltoza (7 %) i saharoza (1 %) su najvažniji disaharidi meda. Prisutnost velikih količina saharoze u medu ili medljikovcu može biti zbog nepotpune hidrolize pčelinjom invertazom, zbog botaničkog podrijetla, nezrelosti meda ili umjetnog hranjenja pčela. Na primjer, med od lavande (*Lavandula* spp.) i bora (*Borago officinalis*) prirodno sadrži veće količine saharoze. Melezitoza je glavni trisaharid meda, sintetizira je kukac koji proizvodi mednu rosu kroz svoj probavni sustav. Neki šećeri kao što je erloza, rezultat su enzima iz hipofaringealnih žlijezda pčela, a šećeri poput galaktoze, laktoze i rafinoze, smatraju se toksičnima za pčele jer one nemaju odgovarajuće enzime za njihovu probavu (14).

Zanimljivo je to što sastav šećera nije uvijek isti, čak ni u gotovom proizvodu. S vremenom se smanjuje količina fruktoze i glukoze (zbog enzimске aktivnosti i kiselog pH), a nastaju maltoza i drugi reducirajući disaharidi. Za stvaranje maltoze zaslužan je pH meda (3,9), a razlog zbog kojeg ne osjetimo tako niski pH je visok sadržaj šećera koji pritajuje kiselost. Jedna specifičnost glukoze je ta da će se ona istaložiti tijekom vremena, pogotovo ako je temperatura skladištenja niska (2). Razgradnja šećera, kiselinski katalizirana dehidracija

heksoze ili Maillardove reakcije gdje šećeri reagiraju s aminokiselinama dovodi do tamnjenja meda (14).

Isto kao i mnogi drugi parametri i vrste šećera variraju ovisno o botaničkom podrijetlu što može pomoći kod klasifikacije uniflornih vrsta medova. Šećeri se razlikuju kod meda i medljikovca, pa tako medljikovac sadrži niže razine monosaharida, a više trisaharida (uglavnom melezitose, erloze, rafinoze i maltotrioze). Med od vrijeska specifičan je po prisutnost erloze i nigeroze, a med od lavande po prisutnost saharoze i maltoze. Nadalje, med od avokada karakterizira prisutnost šećernog alkohola perzeitola. U cvjetnim medovima omjer fruktoze i glukoze je oko 1,0, dok u medljikovcima varira između 1,5 do 2,0. Omjer maltoze i izomaltoze visok je u medu od suncokreta dok je izrazito nizak u medljikovcu i medu od lipe (14).

Najvažnija fizikalno-kemijska i nutritivna svojstva meda, poput slatkoće, viskoznosti, granulacije, higroskopnosti, optičke aktivnosti šećera i energetske vrijednosti ovise o sastavu šećera. Štoviše, osmotski tlak prisutan zbog velike koncentracije šećera je važan antimikrobni faktor meda (14).

U gotovo svim vrstama meda, fruktoza je glavni šećer, ali postoje iznimke kao što su repica (*Brassica napus*), maslačak (*Taraxacum officinale*) i plavi kovrči (*Trichostema lanceolatum*), gdje je glukoza prisutna u većim količinama (14).

Propisi o kriterijima kvalitete medu utvrđuju minimalne granice za ukupnu fruktozu i glukožu, kao i maksimalna ograničenja za saharozu iz razloga što je sadržaj tih šećera povezan s zrelosti meda i može otkriti moguću patvorenost ili samo neadekvatnost. Međutim, kao što je spomenuto ranije, važno je uzeti u obzir da ovi parametri također mogu varirati ovisno i o botaničkom podrijetlu (14).

#### 1.4.5. Organske kiseline

Med sadrži organske kiseline, u ravnoteži s njihovim odgovarajućim laktonima. Organske kiseline čine manje od 0,5 % ukupne suhe tvari. Važne su za organoleptička svojstva meda (okus i aromu), boju i očuvanje trajnosti meda, otežavajući rast mikroorganizama. One ujedno doprinose i ukupnoj kiselosti meda i električnoj vodljivosti.

Neke organske kiseline dolaze izravno iz nektara ili medne rose (limunska, jabučna i oksalna), no ipak većina njih rezultat je djelovanja pčelinjih enzima na šećere iz nektara i medne rose tijekom sazrijevanja i skladištenja (mravlja kiselina). Štoviše, tijekom skladištenja zbog djelovanja glukoza oksidaze, osmofilni kvasci proizvode alkohole i eventualno organske kiseline iz šećera u medu, što dovodi do sinteze kiselina kao što je octena kiselina, čije su razine mogući pokazatelji fermentacije meda (14).

Prvobitno se smatralo da su mravlja i limunska kiselina dominantne u medu. Međutim danas se zna da je to glukonska kiselina (2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanska kiselina) koja čini 70-90 % ukupnih organskih kiselina (2). Ona nastaje djelovanjem pčelinje glukoza-oksidaze, a dokazano je da metabolička aktivnost nekih bakterija iz roda *Gluconobacter* u crijevima pčela može proizvesti glukonsku kiselinu. Osim glukonske kiseline, u medu je pronađeno više od 30 različitih nearomatskih organskih kiselina, poput octene, maslačne, limunske, mravlje, mliječne, maleinske, jabučne, oksalne, fumarne, piroglutaminske, jantarne, piruvinske i vinske kiseline (14).

Organske kiseline u medu također ovise o botaničkom podrijetlu meda. Tako je na primjer, medljikovac karakterističan po niskim koncentracijama piruvinske, a viskom koncentracijama jabučne i jantarne kiseline (14).

Ukupnu kiselost meda čine slobodna i rezervna kiselost. Slobodna kiselost ovisi prvenstveno o organskim kiselinama, esterima i anorganskim ionima, kao što su fosfati, kloridi, sulfati i

nitriti, koji mogu proizvesti odgovarajuće kiseline. Slobodna kiselost važan je pokazatelj kvalitete meda stoga je uključena u propise za kontrolu kvalitete meda (14).

Pod pojmom rezervna (laktonska) kiselost misli se na laktone (uglavnom glukolaktone) koji su u ravnoteži sa svojim organskim kiselinama i čine rezervnu kiselost u slučaju pojave alkalnosti meda (14).

pH meda nije direktno povezan s kiselosti jer neke sastavnice meda imaju karakteristike pufera kao što su soli i neki mineralni spojevi. pH meda je u rasponu od 3,4 do 6,4, dovoljno nizak da inhibira razvoj mikroorganizama. Općenito, pH vrijednosti u medu od nektara variraju od 3,3 do 4,6. Izuzetak je kestenov med, gdje vrijednosti pH variraju od 5 do 6. pH medljikovca uglavnom ima više vrijednost (od 4,5 do 6,5) za razliku od cvjetnih vrsta meda, a razlog tome je bogatiji mineralni sastav (14).

#### **1.4.6. Dušikovi spojevi**

Sadržaj dušikovitih spojeva u medu nije visok. Uglavnom su to koloidi, proteini, slobodne aminokiseline i enzimi. 40-80 % svih dušikovitih spojeva otpada na proteine, nakon toga slijede slobodne aminokiseline te ostale frakcije (14).

**Proteini.** Med nije bogat proteinima. Ukupna količina proteina u medu varira od 0,1- 0,5 % , iako se mogu naći i vrste meda s većim udio proteina (1-2 %) kao što je med od vrijeska (14). Općenito se smatra da najveći dio svih aminokiselina u medu potječe od pčela (žlijezde slinovnice) i manjim dijelom od nektara, medne rose i peludi. U medu je identificirano oko 20 različitih vrsta neenzimskih proteina; albumini, globulini, proteaze i nukleoproteini. S tehnološkog stajališta veći udio proteina u medu je nepoželjan. Med od vrijeska zbog većeg sadržaja proteina daje želatinoznu konzistenciju koja otežava ekstrakciju i obradu samog

meda. Što je viša razina proteina, to je niža površinska napetost meda, čime se povećava sklonost pojave pjene, šljama i posljedično nastanka mjehurića. Prezreli, pregrijani i dugo godina skladišteni medovi imaju niži udio proteina nego što je to uobičajeno (14).

**Aminokiseline.** Slobodne aminokiseline u medu odgovorne su za neka poželjna svojstva meda kao što je antioksidacijsko djelovanje. Većina aminokiselina u medu nalazi se u vezanom obliku, dok je svega jedna petina u slobodnom. U medu je identificirano 26 vrsta različitih aminokiselina, a neke od njih su: prolin, glutaminska kiselina, alanin, fenilalanin, tirozin, leucin, izoleucin, lizin, metionin, histidin, arginin, aspartanska kiselina, triptofan, serin, valin, metionin, triptofan, serin, valin, metionin, tripsin i treonin (14).

Porijeklo aminokiselina meda može se pripisati i pčelinjem i biljnom podrijetlu (nektar, medna rosa i pelud). Budući da je glavni izvor u stvari pelud, karakteristike aminokiselina kao i one same mogu biti važne za botaničku klasifikaciju meda. Tako je na primjer arginin karakterističan za kestenov med, a triptofan za bagremov. Ipak, slobodne aminokiseline dodaju i pčele, što ponekad dovodi do velike varijabilnosti sadržaja aminokiselina u medu iz istog biljnog izvora (14).

Prolin je najzastupljenija slobodna aminokiselina u medu, u rasponu od 50 do 85 % ukupne količine svih aminokiselina. Uglavnom dolazi iz izlučevina pčela u procesu pretvorbe nektara ili medne rose u med, stoga ona nije dobar pokazatelj botaničkog podrijetla. No, prolin se može smatrati dobrim pokazateljem sadržaja enzima, konkretno invertaze, budući da su obje komponente povezane s procesom pretvorbe nektara u med. Poželjni sadržaj prolina u medu trebao bi biti veći od 200 mg/kg, no dogovorena minimalna vrijednost je 180 mg/kg. Neki znanstvenici smatraju prolin pokazateljem kvalitete meda. posebno što se tiče zrelosti meda i dodatka saharoze, jer su tada vrijednosti ove aminokiseline niže od minimalne potrebne (14).

**Enzimi.** Prirodni med sadrži male količine enzima, od kojih su najvažniji dijastaza, invertaza i glukoza-oksidaža. Ne tako važni za med, tu su još kisela fosfataza, katalaza i  $\beta$ -glukozidaža. Enzimi kao što su invertaza ili glukoza oksidaža uglavnom dolaze iz hipofaringealnim žlijezda pčela. Pčele dodaju ove enzime kako bi završile proces zrenja nektara u med. Neki enzimi kao što su katalaza i kisela fosfataža dolaze iz nektara, medne rose ili peludi, dok dijastaza potječe i od pčela i biljaka (14).

Enzimi su termolabilni spojevi koji se koriste kao pokazatelj starenja i pregrijavanja meda jer se njihova aktivnost starenjem i pregrijavanjem smanjuje. Sadržaj enzima ovisi i botaničkom podrijetlu meda, stupnju pčelinje aktivnosti tijekom pretvorbe nektara u med, vrsti pčele, prehrani, dobi i fiziološkom stadiju pčele (14).

Dijastaza (amilaza) je enzim meda s najboljom otpornošću na toplinu, pa se naširoko koristi kao pokazatelj svježine meda. Dijastaza hidrolizira škrob i dekstrine u manje ugljikohidrate. Njegova funkcija u medu nije poznata zbog činjenice da nektar ne posjeduje škrob, no pretpostavlja se da ona sudjeluje u probavi peluda kod pčela. Osim od pčela, dijastaza dolazi i iz biljnog izvora (nektar i medna rosa). Posljedično tome aktivnost dijastaze također ovisi i o botaničkom porijeklu meda, pa se tako zna da med od citrusa i ružmarina, između ostalog, ima nizak sadržaj prirodnih enzima (14).

Invertaza ( $\alpha$ -glukozidaža) je važan enzim meda, budući da nektar i mednu rosu pretvara u med, hidrolizirajući saharozu u fruktozu i glukozu. Štoviše, aktivnost transglikozilaze iz invertaze proizvodi neke oligosaharide u međukoracima pretvorbe nektara i medne rose u med. Invertaza je enzim koji med čini visoko energetsom hranom (14).

Fruktoza je šećer koji inhibira invertazu, za razliku od glukoze. Aktivnost invertaze se smanjuje s toplinom i tijekom skladištenja, pa se prema nekima smatra boljim pokazateljem kvalitete meda od dijastaze jer je osjetljivija na toplinsku obradu.

Neki nektari zahtijevaju manje vremena za pretvorbu do meda, pa će oni tako imati i niže razine invertaze. Vrijednosti invertaze mogu se izraziti u nekoliko jedinica. Kao broj invertaze (Hadorn broj, IN) ili kao invertaza po kg (Siegenthaler jedinice, US). Vrijednosti veće od 10 IN (73,5 US) podrazumijevaju svježi, ne toplinski obrađen med, a vrijednosti manje od 10 IN med s niskim invertaznim aktivnostima (14).

Glukoza-oksidaza razgrađuje glukozu na glukonolakton (polihidroksilna kiselina), koji zauzvrat daje glukonsku kiselinu, povećavajući kiselost meda i oslobađajući male količine vodikovog peroksida, spoja odgovornog za otpornost med na mikroorganizme. Ova reakcija je brža u nezrelom ili razrijeđenom medu te u košnici gdje je med još u procesu sazrijevanja. Prisutnost vodikovog peroksida štiti med od bakterija dok on ne sazrije, odnosno dok se ne postigne dovoljna koncentracija šećera koja će zbog osmotskog tlaka dalje sprječavavati rast mikroorganizama. Ovaj enzim osjetljiv je na svjetlost, vidljivo zračenje (uglavnom od 425 do 525 nm) i termičku obradu, kod koje se inaktivira na 60 °C (14).

Drugi važni enzimi prisutni u medu u nešto manjoj količini su katalaza i kiselna fosfataza, čiji su izvori uglavnom pelud, nektar i medna rosa. Katalaza pretvara vodikov peroksid proizveden glukoza-oksidadom u vodu i kisik. Kiselna fosfataza proizvodi organski fosfat iz anorganskih fosfata, pa bi se prisutnost organskih fosfata mogao koristiti kao indikator fermentacije meda. Aktivnost kisele fosfataze ovisi o pH meda. Što je pH viši, to je veća aktivnost kisele fosfataze, s optimalnim rasponom pH između 4,5 i 6,5. Aktivnost kisele fosfataze također se smanjuje tijekom skladištenja (14).

$\beta$ -glukozidaza je enzim iz izlučevina pčela koji hidrolizira glikozidne toksine unesene u pčele prilikom prikupljanja nektara i pretvara  $\beta$ -glukane u oligosaharide i glukozu. Na kraju, postoje još i neki enzimi kao što je proteaza koja hidrolizira proteine i polipeptide da bi se dobili peptidi niže molekularne mase i esteraze koji razgrađuju estere (14).

#### 1.4.7. Vitamini

Vitamini u medu uglavnom potječu od peludi, nektara ili medne rose koje pčele skupljaju (14). Količina vitamina u medu toliko je mala da se ta hrana ne može smatrati dobrim izvorom ovih hranjivih tvari (2). Sadržaj vitamina topivih u vodi viši je od količine vitamina topivih u mastima, jer med ne sadrži lipide, odnosno sadrži jako male količine. Najvažniji vitamin meda je vitamin C koji ima antioksidativni učinak. Nadalje, mogu se detektirati i vitamini skupine B u različitim koncentracijama te neki vitamini topljivi u mastima kao što su vitamini A, D, E i K koji su nađeni u malim količinama (14).

Koncentracije vitamina i detektirani vitamini prikazani su u Tablici 1 (2).

**Tablica 1.** Koncentracije vitamina prisutnih u medu (2).

VITAMINI	KONCENTRACIJA (ppm)
Riboflavin	0,63
Pantotenska kiselina	0,96
Niacin	3,2
Tiamin	0,06
Pirodoksin	3,2
Askorbinska kiselina	22

#### 1.4.8. Minerali

Sadržaj minerala u medu je raznovrstan, no generalno gledano nizak. U cvjetnom medu on je u rasponu od 0,02 do 0,3 % , dok u medljikovcu može dostići 1 % od ukupne količine suhe tvari. Na mineralni sastav utječu tlo, klimatski uvjeti, geografsko podrijetlo, kao i kemijski sastav nektara koji ovisi o botaničkom podrijetlu. Varijacije se također pojavljuju ovisno o vremenu i metodama vrcanja te raznolikosti ispaše pčela (14).

Minerali se nalaze u obliku soli otopljenih u vodi. Biljke ih upijaju preko korijena, kroz stabljike sve do cvijeta gdje se izlučuju u obliku nektara, peludi ili sokova koje sišu kukci. Najvažniji minerali pronađeni u medu su kalij, natrij, kalcij i magnezij. Manje zastupljeni elementi su željezo, bakar, mangan, klor, a u manjim količinama kao elementi u tragovima nađeni su bor, fosfor, sumpor, silicij, nikal, te krom, litij, olovo, kositar i cink. Kalij je glavni mineral u medu, a predstavlja 80 % ukupne količine minerala.

Tamni medovi u principu sadrže više minerala od onih svjetlijih, no najviše minerala ipak sadrže medljikovci. U Tablici 2. prikazane se prosječne koncentracije nekih od minerala koji su pronađeni u svjetlijim medovima (14).

Med se smatra potencijalnim pokazateljem onečišćenja okoliša. Kao rezultat bioakumulacije u biljkama na periferiji urbanih i industrijskih područja, kao i na velikim raskrižjima u medu su pronađeni tragovi nekih mineralnih spojeva i teških metala koji se smatraju indikatorima onečišćenja (14).

**Tablica 2.** Prosječne koncentracije nekih minerala u svjetlijim medovima (14).

MINERALI	KONCENTRACIJA (ppm)
Kalij	205
Sumpor	58
Klor	52
Kalcij	49
Fosfor	35
Magnezij	19
Natrij	18
Željezo	2,4
Bakar	0,3
Magnezij	0,3

#### **1.4.9. Fenolni spojevi**

Potencijalna ljekovita svojstva meda pripisuju se bioaktivnim spojevima koji imaju antioksidativno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje. Većinu tih tvari u medu čine fenolni spojevi, te enzimi (katalaza, glukoza oksidaza), organske kiseline, produkti Maillardovih reakcija (melanoidini), aminokiseline, proteini, vitamini (kao što su askorbinska kiselina, alfa-tokoferol), derivati karotenoidina ( $\beta$ -karoten, prekursor vitamina A) i drugi spojevi kao što su vodikov peroksid, metilglioksal, rojalizin i acetilkolin koji se nalaze u nešto manjim koncentracijama (14).

Fenolni spojevi dijele se u nekoliko skupina ovisno o strukturnim značajkama. U medu su uglavnom nalaze flavonoidi, fenolne kiseline i derivati fenolne kiseline. Fenolne kiseline

sadrže molekule s jednim fenolnim prstenom. One su ne-flavonoidni polifenolni spojevi, derivati benzojeve i cimetne kiseline. Flavonoidi su biljni fenolni pigmenti. Oni sadrže nekoliko fenolnih hidroksilnih grupa vezanih za strukture prstena. Ovisno o strukturnoj složenosti flavonoida, dijele na flavonole, flavone, flavanoli, flavanoni, izoflavone, antocijanine i halkone (14).

Glavni flavonoidi koji potječu od biljaka su aglikoni. Pretvorba prirodnih glikozida prisutnih u nektaru u odgovarajuće aglikone koji su prisutni u medu posljedica je djelovanja enzima iz pčelinjih žlijezda slinovnica. Isprva se smatralo da su u medu prisutni samo aglikoni, ali su 2008. godine prvi put otkriveni flavonoidni glikozidi. Razlog tome je postojanje flavonoidnih ramnozida i rutinozida u nektaru nekih biljaka koji se ne mogu hidrolizirati ni jednim enzimom pčela. Više od 90 % flavonoida u medu uglavnom dolazi iz propolisa. Flavonoidi koji potječu od propolisa relativno su lipofilni, a nalaze se u medu u promjenjivim količinama, ovisno o stupnju onečišćenja propolisa u košnici i pčelinjem vosku i ne ovise o botaničkom podrijetlu. Međutim, smatraju se korisnima za identifikaciju zemljopisnog podrijetla. U područjima s umjerenom klimom, flavonoidi potječu iz eksudata pupoljka topole. U područjima gdje topole nisu autohtone biljke, kao u području Ekvadora, tropa i vrlo sušnih područja, flavonoidi gotovo i da nisu prisutni. Sadržaj polifenola u tamno obojenim medovima (kao što je vrijes) obično je viši nego u svjetlijim vrstama meda (poput citrusa). Još jedna karakteristika tamnih vrsta meda je ta da sadrži više derivata fenolne kiseline, a manje flavonoida za razliku od svjetlijih gdje je situacija obrnuta (14).

#### **1.4.10. Hlapljivi spojevi**

Različite vrste meda imaju različite, specifične organoleptičke karakteristike. U medu je identificirano više od 600 spojeva male molekularne težine, a njihova koncentracija odredit će

aromu i okus meda. Neke od tih aromatičnih tvari su aldehidi, esteri, ciklički spojevi te osim hlapljivi spojeva, šećeri, masne kiseline, aminokiseline, tanini, fenoli i dr. (14).

Sve te navedene tvari potječu iz biljaka, od pčela ili iz okoliša. Neki alkoholi i razgranati aldehidi su najvjerojatnije rezultat metabolizma mikroba, dok su derivati furana i pirana produkti Maillardovih reakcija nastalih tijekom termičke obrade meda i skladištenja (14).

Aromatske tvari u medu, kao i hlapljivi kemijski spojevi, pokazali su se učinkovitim u procjeni vrste meda i geografskog podneblja. Pa je tako metil-antranilat marker za citrusni med, feniloctena kiselina za med od vriješaka, a derivati acetofenona za kestenov med (14).

#### **1.4.11. Pigmenti**

Pigmenti su odgovorni za boju meda. Najvažniji su polifenoli, karotenoidi, ksantofil i antocijani koji mogu biti topivi u vodi ili u mastima. Od drugih spojeva u medu, boji meda mogu doprinijeti šećeri, minerali i aminokiseline (14).

#### **1.4.12. Lipidi**

U medu su nađene jako male količine lipidnih spojeva, svega 0,04 %. Tu spadaju gliceridi, steroli, fosfolipidi te palmitinska, oleinska, laurinska, miristička, stearinska i linolna masna kiselina. Svi ti spojevi u med dopijevaju iz biljaka ili ostataka voska (14).

## **1.5. Fizikalna svojstva meda**

Navedeni kemijski sastav meda uvelike utječe na njegova fizikalna svojstva. S obzirom na to, med kao koncentrirana otopina šećera ima visok indeks loma (oko 1,49) i veliku viskoznost. Tu se još kao fizikalne karakteristike ističu miris i okus meda koji se pripisuju šećerima, kiselinama i hlapljive komponentama meda, boja te mnoga druga fizikalna svojstva zbog kojih se med nerijetko koristi kao sastojak hrane ili sama hrana (2).

### **1.5.1. Boja**

Boja je fizikalno svojstvo meda koje potrošači prvo percipiraju (14). Med može imati niz različitih boja ovisno o godišnjem dobu kad je vrcan, vrsti nektara i medne rose, kvaliteti tla, periodu sazrijevanja te pčelarskoj praksi prilikom obrade koja može imati, pa i najizraženiji učinak na boju (2). Boja meda može varirati od bezbojne ili svjetlo žute, do tamno žute, gotovo crne boje, ponekad s zelenkastim ili crvenkastim odsjajem (14). Odakle dolazi boja nije još sigurno. No, svakako se može pretpostaviti da na nju utječe jačina pigmenta, pelud, karotenoidi, ksantofili, antocijani, minerali, aminokiseline, polifenoli te flavonoidi (14).

Tamni med ima viši sadržaj minerala, dekstrina i polifenola te veću kiselost i intenzitet od svjetlijeg meda. Boja tamnog meda snažno je povezana s koncentracijama Cd, Fe i Pb, dok je boja svijetlog meda povezana s koncentracijama Al i Mg. Osim navedenog na ovo svojstvo još utječe i kristalizacija. Kristalizirani med uglavnom je svjetliji nego kad je u svom izvornom tekućem obliku, a to dakako ovisi o veličini samih kristala, odnosno sitniji kristali uvijek daju bljeđi izgled (14).

Koliko će med biti taman, ovisi o početnoj boji, kemijskom sastavu, zagrijavanju te uvjetima skladištenja. Komponente u sastavu meda koje mogu utjecati na tamnjenje su šećeri, sadržaj dušika, slobodne aminokiseline i vlaga, sve one uvjet su za neke od reakcija. Maillardovim

reakcijama, odnosno reakcijama između aminokiselina i šećera u kiseloj sredini dolazi do stvaranja melanoidina, fruktoza u kiselom mediju postaje nestabilna te dolazi do procesa karmelizacije šećara, hidrolizom makromolekula dolazi do stvaranja koloida te nastaju reakcije oksidacije askorbinske kiseline, polifenola i lipida. Sve one, manje ili više, utječu na boju (14).

Pčelarske prakse također može utjecati na boju meda. Upotreba starih češljeva, izloženost svjetlosti tijekom skladištenja meda ili korištenje neprikladnih ambalaža koje bi mogli dovesti do reakcija između derivata taninskih kiselina i oksidiranih polifenola sa solima željeza dovode do toga da med potamni (14).

U nekim zemljama boja meda utječe na cijenu, što ovi o željama potrošača. Općenito, svjetliji medovi lakše postižu veće cijene na tržištu, ali postoje neke zemlje poput Njemačke, Švicarske, Grčke i Turske gdje se preferiraju tamni medovi i medljikovci (14).

### **1.5.2. Električna vodljivost**

Električna vodljivost je sposobnost nekog materijala da provodi električnu struju. U medu je ona izravno povezano s botaničkim porijeklom meda, kao i sa mineralnim sadržajem i anorganskim spojevima te jednim dijelom s organskim kiselinama, proteinima i drugim tvarima kao što su šećeri, šećerni alkoholi i peludna zrna, koji mogu djelovati kao elektroliti (14).

### **1.5.3. Gustoća**

Gustoća je svojstvo meda koje uvelike ovisi o visokom sadržaju šećera. Izražava se specifičnom težinom, a vrijednosti su povezane sa sadržajem vode, temperaturom i

koncentracijom suhe tvari. Gustoća se linearno smanjuje povećavanjem temperature ili sadržaja vode, a linearno raste s povećanjem sadržaja suhe tvari. Srednja vrijednost relativne gustoće u medu na 20 °C varira od 1,40 do 1,44 g/ml, ovisno o vrsti meda. Zbog varijacija u gustoći meda koji je već pohranjen u spremnicima, za određivanje gustoće promatraju se različiti slojevi meda, pri čemu gornji sloj ima manju gustoću i veći udio vode i posljedično tome treba uzeti u obzir da je skloniji fermentaciji (14).

#### **1.5.4. Viskoznost**

Viskoznost meda važna je za rukovanje, preradu, skladištenje i senzorička svojstva. Ona ovisi o botaničkom porijeklu, vlazi, temperaturi, omjeru fruktoze i glukoze, granulaciji meda i kemijskom sastavu. Što je veća temperatura i sadržaj vode, a što je manji sadržaj polisaharida, to je niža viskoznost meda. Neki spojevi poput dekstrina, proteina i druge koloidne tvari povećavaju viskoznost meda. Kristalizacija meda faktor je koji uvelike povećava viskoznost, a zajedno s površinskom napetosti odgovorna je za stvaranje pjene u medu. Što je med viskozniji, fluidnost čestica u njemu je manja. To može utjecati na procese prerade, na primjer homogenizaciju u raznim pripravcima, ograničavajući njezinu uporabu u prehrambenoj industriji. Ovo je jedan od razloga zbog kojeg je upotreba meda u praha postala sve češća opcija u raznim industrijama, posebno u pekarskoj industriji (14).

#### **1.5.5. Optička aktivnost**

Optička aktivnost je svojstvo zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti zbog sastava šećera. Svaki šećer ima svoju specifičnu optičku rotaciju. Fruktoza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u lijevo, pokazujući negativnu optičku rotaciju, dok na primjer glukoza zakreće u

desno i ima pozitivnu optičku aktivnost. Ukupna vrijednost optičke aktivnosti ovisi o koncentraciji pojedinih šećera u medu. Cvjetne vrste meda obično sadrže veći udio fruktoze, pa im je optička aktivnost negativna, dok s druge strane, medljikovci koji sadrže više glukoze i oligosaharida (uglavnom melezitoze i erloze) imaju pozitivnu optičku aktivnost. Dodatak konvencionalne saharoze u med, dovodi do tog da ravnina polarizirane svjetlosti zakreće u desno, što je eventualni pokazatelj patvorenja meda (14).

#### **1.5.6. Indeks loma**

Indeks loma je optičko svojstvo meda koje varira između 1,504 i 1,481. Veći indeks loma znači veći sadržaj suhe tvari, odnosno niži sadržaj vode (14).

#### **1.5.7. Higroskopnost**

Med je izrazito higroskopan proizvod, koji zbog visokog sadržaja šećera (uglavnom fruktoze) lako apsorbira i zadržava vodu iz okoline. Koliko će brzo apsorbirati vodu ovisi o tome na kojoj se temperaturi nalazi i koliki je sadržaj vode u zraku te relativnoj vlažnosti. Ovo svojstvo obavezno je uzeti u obzir prilikom pakiranja, skladištenja i industrijske uporabe. Razlog tome je što ukoliko med navuče previše vode, postaje sklon fermentaciji, odnosno kvarenju. No, ponekad je higroskopnost i poželjno svojstvo. Primjer tome je kad se koristi kao dodatak nekom drugom proizvodu, tada je poželjno da održava mekoću i vlažnost tog proizvoda (14).

### **1.5.8. Osmotski tlak**

Za visoki osmotski tlak u medu zaslužni su ponajviše šećeri. Ova osobina meda, zajedno s niskim pH, organskim kiselinama, vodikovim peroksidom koji nastaje djelovanjem glukoze oksidaze i još nekim faktorima zaslužna je za otpornost meda na bakterije, stabilnost te vijek trajanja (14).

### **1.5.9. Kristalizacija**

Kristalizacija meda je prirodni i složeni proces u kojem se glukoza, koja je manje topljiva od fruktoze, odvaja od vode i istaloži iz prezasićene otopine, pretvarajući se u kristale glukoza monohidrata (14).

Vrste meda koje su bogate fruktozom kao što su bagrem i kadulja, mogu izbjeći proces kristalizacije duže vrijeme, za razliku od medova bogatih glukozom u koje spadaju maslačak i repica, koji često kristaliziraju već neposrednog nakon vrcanja, a ponekad još i u saću (14).

Ovaj proces može biti nepoželjan za pčelare, budući da neki potrošači misle ukoliko se med iskristalizira da je patvoren ili razrijeđen (14).

Kristalizacija utječe na boju meda i teksturu, dok okus i sve ostale karakteristike ostaju očuvane. U principu, kristalizirani med nije pokvareni proizvod, ali ako dođe do nehomogene kristalizacije, koncentracija šećera u gornjem dijelu se smanjuje, povećavajući sadržaj vlage zbog čega može doći do fermentacije (14).

Kristalizacija ovisi o temperaturi, viskoznosti, sadržaju vode, šećerima (uglavnom sadržaju glukoze i melezitose), sadržaju dekstrina i prisutnost čestica koje mogu djelovati kao jezgre kristalizacije (proteini i drugi koloidi, peludna zrnca, prašina i druge suspendirane čestice, kvasac, vosak, propolis ili mjehurići zraka). Temperatura od 5–7 °C pogoduje stvaranju jezgri

kristalizacije, dok je za sam proces kristalizacije optimalan temperaturni raspon između 10 i 18 °C s najpogodnijom temperaturom od 14 °C. Na niskim temperaturama, kristalizacija se usporava, jer unatoč smanjenju topljivosti šećera (koja pogoduje kristalizacije) dolazi do povećanja viskoznosti meda, koje otežava difuziju glukoze i pokretnost kristala u medu. Isto tako temperature veće od 25 °C omogućuju otapanje kristala glukoze te smanjuju mogućnost kristalizacije. Nagle promjene temperature dovode do stvaranja kristala glukoze koji pak povećavaju pokretljivost mjehurića zraka, koji se ponašaju kao katalizatori kristalizacije (14). Što se tiče sadržaja vode, optimalni udio vode je između 15 i 18 %. Previsok sadržaj vode usporava kristalizaciju, jer je manja zasićenost meda šećerima. Međutim, glukoza se može lako istaložiti, a fruktoza ostati na površini, što će zbog njene velike higroskopnosti ubrzati proces fermentacije. Što je sadržaj glukoze (više od 28-30 %) i melezitose (više od 10 %) veći, kristalizacija je brža. Fruktoza i maltoza djeluju kao inhibitori kristalizacije jer povećavaju topljivost glukoze (14).

Postupci dekantiranja, filtracije ili centrifugiranja (gdje se uklanjaju nečistoće iz meda, mjehurići zraka i druge nepoželjne tvari), skladištenje pri temperaturama smrzavanja te uklanjanje jezgri kvasaca i glukoze procesom pasterizacije smanjuju brzinu kristalizacije. Broj kristalizacijskih jezgri u medu određuje količinu kristala. Što je više jezgri kristalizacije veći je broj kristala, veličina kristala manja, a sam proces kristalizacije brži (14).

Kristalizirani med je moguće vratiti u tekuće stanje zagrijavanjem. Međutim, zagrijavanje u neprikladnim uvjetima može dovesti do inaktivacije enzima, gubitka okusa i arome, potamnjene boje te stvaranja hidroksimetilfurfurala (HMF), uz posljedično smanjenje kvalitete meda. Danas se proučava nova metoda rastapanja meda pri niskim temperaturama uporabom ultrazvučnih valova za ubrzavanje samog procesa. Problem kod ovog procesa je neujednačena rekristalizacija (14).

## **1.6. Opasnosti u medu**

Opasnosti u medu nisu česte, no ipak postoje. Od bioloških opasnosti u medu se mogu naći bakterije, gljivice, kvasci ili pak sporogene bakterije, koje su najčešće (12). Osim navedenih bioloških opasnosti, tu su i neke kemijske. Pa su tako u medu nerijetko nađeni veterinarski lijekovi, teški metali, PCB-i i PAH-ovi iz okoliša, HMF kao rezultat pretjeranog zagrijavanje meda tijekom vrcanja ili jednostavno neke prirodne, ali otrovne tvari s medonosnih biljaka kao što su na primjer tutin (iz biljke *Coriaria arborea* na Novom Zelandu) i grajanotoksin (iz nektara rododendrona i azaleja). (2)

### **1.6.1. Biološke opasnosti**

Najčešće biološke opasnosti u medu su spore *Clostridium botulinum* i kvasci, odnosno plijesni. One mogu preživjeti uvjete koje stvara med, a da niti jedan drugi mikroorganizam ne može (2). Izvori kontaminacije bakterijama dijele se na dvije vrste. Prva vrsta su takozvani primarni izvori koji uključuju pelud, probavni trakt pčela, prašinu, zrak, tlo ili nektar. Druga vrsta su sekundarnim izvori, odnosno pčelari. Ovaj izvor uključuje način rukovanja medom, kros kontaminaciju, opremu s kojom se med obrađuje i prostorije u kojima se to radi. Primarni izvori kontaminacije ne mogu se s lakoćom kontrolirati, no zato sekundarni mogu (12).

Što se tiče gljiva i kvasaca, u medu su najčešće gljive iz carstva *Penicillium* i kvasci iz carstva *Mucor*. Oni zajedno, odgovorni su za fermentaciju meda koja je najčešće potaknuta većim udjelom vode (12).

## **1.6.2. Kemijske opasnosti**

### **1.6.2.1. HMF**

Kvaliteta meda može biti podvrgnuta određenim promjenama tijekom obrade i tijekom skladištenja. Prevelike temperature bitno dovode do gubitka enzimskih aktivnosti i stvaranja hidroksimetilfurfurala (HMF-a), cikličkog aldehida koji nastaje razgradnjom šećera, dehidracijom heksoza u mediju niskog pH te u manjoj mjeri u Maillardovim reakcijama. Prisutnost prekomjerne količine HMF u medu smatra se dokazom pregrijavanja i podrazumijeva gubitak svježine (11). Visoke vrijednosti HMF-a prirodno su prisutne u medu iz toplih klimatskih područja, odnosno iz tropskih i suptropskim zemalja. Koncentracija HMF-a povećava se osim tijekom toplinske obrade i skladištenja, dodatkom komercijalno proizvedenih šećera, odnosno kod krivotvorenja meda. Na sadržaj HMF-a utječe i uporaba metalnih spremnika, pH, određene vrste pčela, te botaničko podrijetlo biljaka (14). Niski pH, veliki udio vode, šećeri (najviše fruktoza), aminokiseline (npr. alanin) te minerali (kao što su magnezij, mangan, željezo i cink) ubrzavaju nastanak HMF-a (14).

Europska regulativa dopušta maksimalni sadržaj HMF od 40 mg/kg. HMF se određuje u uzorcima meda tijekom kontrole kvalitete, ali ne daje nikakve podatke o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu (16).

### **1.6.2.2. Policiklički aromatski ugljikovodici**

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) su sveprisutni organski zagađivači okoliša s potencijalno mutagenim i karcinogenim svojstvima. Nastaju uslijed nepotpunog izgaranja organske tvari iz antropogenih izvora (industrija, rafinerije nafte, metalurgija, grijanje kućanstava ili emisije iz automobila) ili prirodnim procesima izgaranja (poput vulkanskih erupcija ili šumskih požara) (14).

2008. godine skupina znanstvenika dokazala je da je med proizveden u planinskim i ruralnim područjima manje zagađen od meda iz urbanih mjesta (14).

Zbog svoje hidrofobne kemijske strukture, PAH-ovi se lako akumuliraju u lipofilnim medijima, a s obzirom da je med polarni prehrambeni proizvod nije prikladan supstrat za nakupljanje ovih spojeva. No, ipak PAH-ove nalazimo u medu. Izvori ovih spojeva u medu su mnogi. Na prvom mjestu su biljke, koje ukoliko se nalaze na zagađenom tlu kroz korijen i stabljiku akumuliraju PAH-ove u nektar koji pčele skupljaju. Tu se kao izvor ubraja i zrak u kojem se nalaze suspendirane čestice PAH-ova, a pčele ih svojim letom pokupe. Još jedan od razloga onečišćena meda je pčelarska praksa upuhivanja dima u košnice prije ili za vrijeme vrcanja (14).

Toksičnost PAH-ova ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Identificirano je oko 100 PAH-ova, a najpoznatiji je benzo(a)piren (14).

Postoje još mnogi kemijski zagađivači okoliša koji mogu dospjeti u med. Česta pojava su tako pesticidi i antibiotici bilo da su korišteni izravno na pašnjake pčela i same pčele ili indirektno na okoliš oko njih (14).

### **1.6.3. Prirodne toksične tvari**

Prirodne toksične spojeve većinom sintetiziraju biljke. Oni su njihov kemijski obrambeni mehanizam protiv biljojeda. Glavni toksični spojevi nekih vrsta su pirolizidni alkaloidi (PA) i polihidroksilni ciklički ugljikovodici (diterpenoidi), poznati i kao grajanotoksini. Kada pčele skupljaju nektar i pelud s biljaka koje sintetiziraju ove toksine, mogu ih prenijeti do svojih krajnjih proizvoda, kao što je med (14).

### **1.6.3.1. Pirolizidni alkaloidi**

Pirolizidni alkaloidi (PA) pronađeni su u oko 6000 biljnih vrsta. Neke od vrsta koje sadrže te alkaloidne su neven i tratinčica iz porodice Asteraceae (glavočika), suncokret i gavez iz porodice Boraginaceae (boražinovke), oleandar iz porodice Apocynaceae (zimzelenovke), te rodovi bagrema i mimoza iz porodice Fabaceae (mahunarke).

Ove toksične tvari imaju hepatotoksično, genotoksično, mutageno i kancerogeno djelovanje, s naglaskom na jetru. O razini toksičnosti ovisi i koncentracija PA u medu, a kakva će ona biti ovisi o njenom sadržaju u biljci. Različite biljke, različite građe, u različito godišnje doba i na različitim lokacijama imaju drugačiji sadržaj PA. Ovi alkaloidi otkriveni su u različitim vrstama meda s različitih lokacija i još uvijek nije jasno dolaze li ove tvari prvenstveno iz nektara ili je ipak glavni krivac pelud. Osim u medu, PA se u sličim koncentracijama pronalaze i u medljikovcu (14).

### **1.6.3.2. Grajanotoksin**

Grajanotoksini (GrTx) su toksični spojevi koje prirodno sadrže biljke iz porodice Ericaceae (vrjesovke) u koju spadaju brusnica, borovnica, rododendron, azeleji i dr.

Med koji sadrži ovaj neurotoksin naziva se još i „ludi med“, a naziv je dobio po tome što trovanje rezultira vrtoglavicom, mučninom, slinjenjem, hipotenzijom, srčanim poremećajima, mišićnom slabosti, problemima s disanjem i nesvjesticom. Ovi simptomi su posljedica inaktivacije natrijevih kanala u staničnim membranama što vodi do trajne depolarizacije neurona (14).

Ovi neurotoksini variraju od jedne biljne vrste do druge. U rododendronu je tako nađeno 60 različitih vrsta grajanotoksina, među kojima su najtoksičniji GrTx III, GrTx II i GrTx I.

Međutim, ne proizvode sve vrste rododendrona grajanotoksine. Med se uglavnom dobiva iz nektara vrsta *R. ponticum* i *R. luteum* koje nisu toksične (14).

Iako su u svijetu pronađeni različiti slučajevi trovanja, to se najčešće događa u istočnoj regiji Crnog mora u Turskoj, gdje se med rododendrona koristi kao alternativna medicina za liječenje želučanih bolova, hipertenzije, šećerne bolesti i kao seksualni stimulans. Danas je u mnogim zemljama svijeta prodaja ovog meda ograničena što je uvelike smanjilo slučajeve trovanja (14).

## **2. Cilj istraživanja**

Zbog nedovoljne istraženosti kvalitete meda, čestog patvorenja te stalnog povećanja unosa i uvoza meda na tržište Republike Hrvatske, cilj ovog rada bio je odrediti udio vode, električnu vodljivost, HMF te udio peludnih zrnaca u svrhu procjene kvalitete meda. Analizirani uzroci meda podrijetlom su iz različitih dijelova Hrvatske, a obrađeni su rezultati uzoraka prikupljenih kroz 2017. i 2018. godinu. Dobivene vrijednosti uspoređene su s važećim zahtjevima propisa o medu.

### 3. Materijali i metode

U svrhu ovog istraživanja analizirano je ukupno 29 uzoraka meda s područja cijele Republike Hrvatske, od čega:

- 8 uzoraka cvjetnog meda
- 7 uzoraka medljikovca
- 5 uzoraka meda od bagrema (*Robinia Pseudoacacia L.*)
- 5 uzoraka meda od kadulje (*Salvia officinalis L.*)
- 3 uzorka meda od lipe (*Tilia spp.*)
- 1 uzorak meda od kestena (*Castanea sativa Mill.*)

26 uzorka obrađeno je prema gotovim nalazima iz baze podataka Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije tijekom 2017. i 2018. godine, a 3 uzorka (medljikovac, med od lipe i med od kestena) su prikupljeni osobno i analizirani u NZZJZ PGŽ na Odjelu za zdravstvenu ekologiju.

U medu su analizirana 3 fizikalno-kemijska parametra (udio vode, električna vodljivost i HMF) zajedno s peludnom analizom.

#### 3.1. Određivanje udjela vode

Udio vode u medu jedan je parametara koji se gotovo uvijek određuje prilikom analize kvalitete meda. On nam ukazuje na stupanj zrelosti meda, vjerojatnost kvarenja, moguće patvorenje te utječe na organoleptička svojstva.

Određivanje udjela vode refraktometrom ne daje uvijek najtočnije rezultate, no, zbog jednostavnosti, brzine i lake ponovljivosti ova metoda se koristi u gotovo svim laboratorijima (17).

### **3.1.1. Postupak**

Za određivanje udjela vode korišten je radni postupak NZZJZ PGŽ, koji je u skladu s IHC (International Honey Commission) metodama (17).

Korišteni pribor, oprema i kemikalije:

- Destilirana voda
- Stakleni štapić
- Termometar
- Refraktometar

Zaprimljeni uzorak meda u originalnoj ambalaži dobro se izmiješa staklenim štapićem. Nakon miješanja, medu se izmjeri i zapiše očitana temperatura. Refraktometar se pripremi tako da se dobro očisti prizma te se staklenim štapićem uzorak meda prenese na tako očišćenu i osušenu prizmu gdje se nakon 2 minute očita indeks refrakcije. Mjerenje se ponavlja 2 puta, a za krajnji rezultat uzima se srednja vrijednost. Na temelju dobivenog indeksa refrakcije očita se količina vode (% ili g/100g) pomoću Tablice za izračun količine vode u medu koja se može pronaći u navedenoj literaturi (17). Ukoliko temperatura odstupa od 20 °C za svaki stupanj veći od 20 °C dobivenoj vrijednosti indeksa refrakcije doda se 0,00023, a za stupanj manje oduzme ista vrijednost (17).

## **3.2. Određivanje električne vodljivosti**

Električna vodljivost meda prvenstveno je povezana s sadržajem minerala i organskih kiselina te svim ostalim tvarima navedenim u točki 1.5.2. koje se ponašaju kao elektroliti. Električna vodljivost meda mjeri se u otopini u kojoj se nalazi 20 % suhe tvari meda. a jedinica za mjerenje je mS/cm (17).

### **3.2.1. Postupak**

Metoda određivanja električne vodljivosti pripada akreditiranim metodama NZZJZ PGŽ te se provodi prema uputama IHC-a (18).

Korišteni pribor, oprema i kemikalije:

- Odmjerna tikvica od 100 ml, čaše, lijevak,..
- Analitička vaga
- Vodena kupelj
- Instrument SevenMulti Mettler Toledo, Švicarska
- Elektroda Mettler Toledo In Lab 730
- Potvrđeni referentni materijal od 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (za kalibriranje instrumenta)
- Destilirana voda

Nakon što se odredi udio vode u uzorku meda prema postupku navedenom u točki 3.1. i ta vrijednost oduzme od 100 dobije se količina suhe tvari u medu. Na osnovu te vrijednosti, pomoću formule izračuna se količina meda koju je potrebno izvagati i otopiti u 100 ml destilirane vode, da bi dobili 20 %-tnu otopinu suhe tvari meda.

### **Formula za izračunavanje potrebne količine meda:**

$$G_x = \frac{100 * X}{T_s}$$

$G_x$  = količina meda koja nam je potrebna za dobivanje 100 mL vodene otopine u kojoj je otopljeno 20 g suhe tvari meda.

$X$  = količina suhe tvari meda (u gramima) koju želimo otopiti u destiliranoj vodi (20 g)

$T_s$  = vrijednost ukupne suhe tvari (drugačija za svaki med)

### **Priprema uzorka**

Otopiti dobivenu količinu meda ekvivalentnu 20 g suhe tvari u destiliranoj vodi te prebaciti u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuniti destiliranom vodom do oznake. 40 mL otopine uzorka prelići u čašu i kratko staviti u vodenu kupelj na 20 °C kako bi se postigla željena temperatura. Elektrodu prije mjerenja isprati s ostatkom otopine, uroniti u čašu i očitati elektrovodljivost u  $\mu\text{S}/\text{cm}$  kako je prikazano na Slici 2. Mjerenje se provodi 3 puta i iz dobivenih vrijednosti izračuna se srednja vrijednost. Rezultat se izražava u  $\text{mS}/\text{cm}$  na 3 značajne znamenke. Ukoliko je mjerenje provedeno na različitim temperaturama, radi se korekcijski faktor. Za temperature veće od 20 °C očitana vrijednost se umanjuje za 3,2 % za svaki °C, a za temperature manje od 20 °C vrijednost se uvećava za 3,2 % za svaki °C (17).



**Slika 2.** Mjerenje električne vodljivosti

### **3.3. Određivanje HMF-a**

HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography) ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti jedan je od načina na koji možemo odrediti HMF u medu (17). Ova metoda bazira se na IHC definiranim metodama za određivanje HMF-a u medu (17) i prema tome je akreditirana u NZZJZ PGŽ (18).

HPLC je oblik kromatografije koji se koristi za kvantitativno određivanje analita, u ovom slučaju HMF-a u medu. Određivanje koncentracije ovog cikličkog aldehida bitan nam je pokazatelj svježine meda i pčelarske prakse (14).

#### **3.3.1. Princip rada HPLC-a**

HPLC se sastoji od mobilne faze (uzorka ili analita otopljenog u otapalu) koja se pomoću pumpe pod visokim tlakom kreće kroz stacionarnu fazu (kromatografsku kolonu), a uzorak se prenosi strujom plina (najčešće helija ili dušika). HPLC ima sposobnost razdvajanja i identificiranja bilo kojeg uzorka, odnosno analita koji se može otpiti u nekom otapalu. Zbog

svoje velike razine detektabilnosti HPLC je metoda koja se koristi posvuda, od raznih industrijskih do znanstvenih područja (19).

Retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja uzorka u koloni ovisit će o interakciji između stacionarne faze, molekula traženog spoja i mobilne faze. Analiti koji imaju manji stupanj interakcije sa stacionarnom fazom, a veći s mobilnom brže će se kretati kroz kolonu, odnosno stupac i obrnuto (19).

U ovom radu korišten je HPLC s UV detektorom na kromatografskoj koloni obrnutih faza. Pik (signal) detektiranog analita uspoređivao se s pikom standarda poznate koncentracije, nakon čega se odredila koncentracija traženog analita metodom vanjskog standarda prema referentnom materijalu koristeći se kalibracijskim pravcem. Mjerna jedinica za prikaz rezultat je mg/kg (17).

### **3.3.2. Postupak**

Korištene kemikalije:

- Deionizirana voda elektrovodljivosti  $<0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$
- Metanol HPLC čistoće
- HMF referentni materijal
- Standardna otopina HMF-a koncentracije 1000 mg/l (STOCK standard, A), standardna otopina HMF-a koncentracije 100 mg/L (standardna otopina B) i standardne otopine HMF-a koncentracija 1 mg/L, 5 mg/L i 10 mg/L.

Korištena oprema:

- HPLC uređaj koji sadrži: pumpu, jedinicu za degaziranje pokretne faze, jedinicu za automatsko injektiranje uzorka, UV/VIS detektor, fluorescentni detektor, jedinicu za kontrolu i upravljanje sustava, kromatografsku kolonu, kromatografsku pretkolonu, računalo
- Elektronska analitička vaga
- Uređaj za pripremu jako čiste vode

- Vakuum pumpa s uređajem za filtriranje i otplinjavanje otapala
- Hladnjak

Korišteni pribor:

- Graduirane pipete: 1 mL, 5 mL, 1 mL
- Odmjerne tikvice: 50 mL, 100 mL
- Čaša: 50 mL
- Ljevak
- Filter za filtraciju pokretne faze, 47 mm, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$
- Filter za filtraciju uzorka, 15 mm, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$
- Plastična šprica s injekcijskom iglom za filtraciju uzorka od 2 mL
- Staklene bočice s čepom (vialke), 2 mL

### **Priprema standardnih otopina**

Prvi korak kod HPLC metode je priprema standardnih otopina. Za STOCK standard izvažuje se 0,0500 g referentnog materijala te se otopi u odmjerne tikvici od 50 mL s deioniziranom vodom. Za pripremu standardne otopine B otpipetira se 10 mL otopine A i razrijedi s deioniziranom otopinom u odmjerne tikvici od 100 mL. Za pripremu standardne otopine HMF-a koncentracije 1 mg/L pipetira se 1 mL otopine B u odmjernu tikvicu od 100 mL te razrijedi i nadopuni vodom do oznake, za otopinu koncentracije 5 mg/L pipetira se 5 mL otopine B te razrijedi i nadopuni vodom u odmjerne tikvici od 100 mL i za pripremu otopine koncentracije 10 mg/L postupak je isti kao i za prethodna dva osim što se otpipetira 10 mL otopine B (17).

Za izradu kalibracijskog pravca potrebno je odrediti koncentracije HMF-a u standardnim otopinama od 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L i 10 mg/L, odnosno odrediti njihove apsorbance (A). Apsorbance se određuju koristeći UV spektrofotometar na 285 nm s vodom kao slijepom probom. Dobivena koncentracija standardnih otopina mora odgovarati teoretskoj koncentraciji (17).

## **Priprema uzorka**

Uzorak meda za određivanje na HPLC-u mora biti u obliku bistre i filtrirane vodene otopine. Najprije se izvaže 10 g uzorka meda u čašu od 50 ml i dobro otopi s približno 25 mL deionizirane vode nakon čega se nadopuni do oznake s vodom. Takav uzorak se filtrira kroz filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Filtrirani uzorak stavi se u kivete te se približno 20  $\mu\text{L}$  injektira u kromatograf. Svaki uzorak priprema se u dvije paralele, a svaka paralela injektira se jedanput. U slučaju kad je koncentracija HMF vrlo velika ( veća od koncentracijskog područja određivanja) uzme se manja količina uzorka ili se napravi veće razrjeđenje (17).

Sadržaj HMF-a u uzorku izračunava se uspoređivanjem odgovarajuće površine pika uzorka s površinom pika standardne otopine. Odnos između koncentracije HMF-a u uzorku i površine pika je linearan. Rezultat se izražava na 3 značajne znamenke, a u slučaju da je manji od 2,00 mg/kg (granice kvantifikacije) prikazuje se kao: <2,00 mg/kg (17).

## **3.4. Peludna analiza**

Korištena metoda za peludnu analiza izrađena je i usvojena još 1978. godine od strane ICPPR-a (The International Commission for Plant-Pollinator Relationships). Ova metoda imala je kao i svaka druga u početku brojne nedostatke oko preciznosti identifikacije peludi. Zbog velike usvojenosti metode 1999. godine grupa znanstvenika iz IHC odlučila je uskladiti i poboljšati parametre preciznosti ove metode. 2003. godine donesen je konačni postupak provedbe ove metode i on se provodi sve do danas (13).

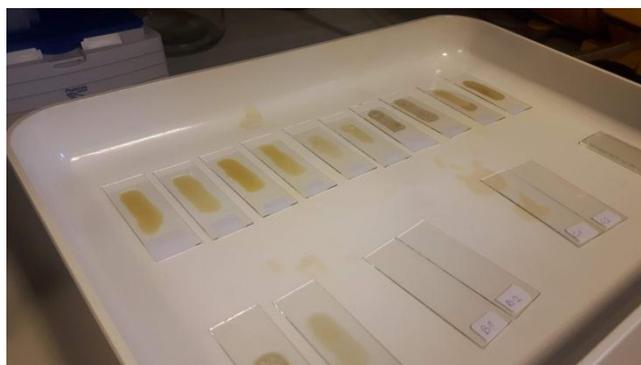
### **3.4.1. Postupak**

Korišteno pribor, oprema i kemikalije:

- Centrifugalna epruveta
- Pipeta
- Predmetno i pokrovno stakalce
- Centrifuga
- Svjetlosni mikroskop
- Glicerinski gel
- Fuksin
- Destilirana voda

### **Priprema uzorka**

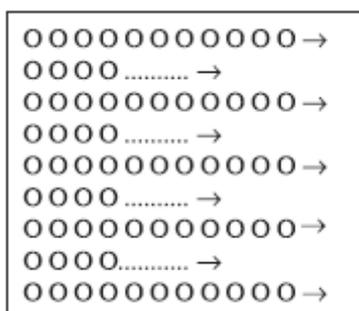
Izvaže se 10 g uzorka u centrifugalnu epruvetu veličine 50 mL. Doda se 20 mL destilirane vode i mučka se dok se med ne otopi. Otopina se stavi 10 min na 3000 o/min. Odlije se supernatant. U epruvetu se pipetom doda 20 mL destilirane vode te se ostatak šećera otapa ispuštanjem i uvlačenjem otopine van i unutra pipete. Nakon tog uzorak se ponovno stavi na centrifugu 5 min na 3000 o/min. Nakon završenog centrifugiranja odlije se supernatant, a sediment se nanese na predmetno stakalce da se osuši. Na osušeni sediment stavi se pokrovno stakalce i na rub njega nanese nekoliko kapi otopljenog glicerinskog gela u kojeg je dodan fuksin. Sve se ostavi se još neko vrijeme da se osuši (13).



**Slika 3.** Peludni sediment na predmetnom stakalcu

### Brojanje peludnih zrnaca i određivanje botaničkog podrijetla.

Za ispravnu identifikaciju peludi i točan broj potrebno je prebrojati najmanje 300 peludnih zrnaca. Povećanje pod mikroskopom ovisit će o gustoći peludnih zrnaca (od 400x do 1000x). Nakon utvrđene gustoće i glavnog tipa peludi počinje se s brojanjem. Vidno polje podijeli se u 5 paralelnih ekvidistantnih linija ravnomjerno raspoređenih s jednog ruba vidnog polja na drugi, sve dok se ne prebroji 500 (ili manje) zrna. Na Slici 4. prikazana je matrica koja osigurava ispravno brojanje peludnih zrnaca (13).



**Slika 4.** Matrica za brojanje peludnih zrnaca (13).

Botaničko podrijetlo meda određuje se prema vrsti peludi koje u ukupnom postotku ima najviše dok je za geografsko podrijetlo potrebna analiza cijelog spektra peludnih zrnaca s poznavanjem flore određenih geografskih područja (13).

### **3.5. Metode obrade rezultata**

Prilikom obrade rezultata u ovom radu korišten je osim tabličnog i grafički prikaz dobivenih rezultata. U tabličnom prikazu računata je srednja vrijednost ( $S$ ) na način da su se zbrojile vrijednosti svih uzoraka meda za svaki parametar pojedinačno i zbroj podijelio s ukupnim brojem uzoraka. Za grafički prikaz korišten je Microsoft Excel 2010 program, a odabran je stupčasti oblik grafikona.

## 4. Rezultati

**Tablica 3.** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara i peludne analize cvjetnog meda

Uzorak (cvjetni med)	Udio vode (%)	Električna vodljivost (mS/cm)	HMF (mg/kg)	Peludna analiza	Zemlja porijekla
<b>A1</b>	18,2	0,256	26,24	zadovoljava	Hrvatska
<b>A2</b>	19,0	0,797	3,0	zadovoljava	Hrvatska
<b>A3</b>	/	0,352	33,8	zadovoljava	Mješavina meda iz država članica EU i država koje nisu članice EU
<b>A4</b>	/	0,433	62,4	zadovoljava	Hrvatska
<b>A5</b>	/	0,521	59,4	zadovoljava	Mješavina meda iz Mađarske i Argentine
<b>A6</b>	16,8	0,455	34,7	zadovoljava	Hrvatska
<b>A7</b>	1,0	0,214	20,1	zadovoljava	Mješavina meda iz država članica EU i država koje nisu članice EU
<b>A8</b>	17,4	0,814	6,50	zadovoljava	Hrvatska
<b>Minimalna vrijednost</b>	1,0	0,214	3,0		
<b>Maksimalna vrijednost</b>	19,0	0,814	62,4		
<b>Srednja vrijednost (S)</b>	14,5	0,480	30,7		

**Tablica 4.** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara i peludne analize bagremovog meda

UZORAK (bagremov med)	Udio vode (%)	Električna vodljivost (mS/cm)	HMF (mg/kg)	Peludna analiza	Zemlja porijekla
<b>B1</b>	18,0	0,285	20,47	zadovoljava	Mješavina meda iz država članica EU i država koje nisu članice EU
<b>B2</b>	16,2	0,119	<2	zadovoljava	Hrvatska
<b>B3</b>	/	0,352	/	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>B4</b>	/	0,110	15,8	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>B5</b>	/	0,168	50,2	zadovoljava	Kina
<b>Minimalna Vrijednost</b>	16,2	0,110	<2		
<b>Maksimalna vrijednost</b>	18,0	0,352	50,2		
<b>Srednja vrijednost (S)</b>	17,1	0,207	28,8±2		

**Tablica 5.** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara i peludne analize meda od kadulje

<b>UZORAK (med od kadulje)</b>	<b>Udio vode (%)</b>	<b>Električna vodljivost (mS/cm)</b>	<b>HMF (mg/kg)</b>	<b>Peludna analiza</b>	<b>Zemlja porijekla</b>
<b>C1</b>	15,0	1,232	<2	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>C2</b>	15,4	1,205	<2	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>C3</b>	14,7	0,511	13,32	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>C4</b>	/	0,322	/	zadovoljava	Hrvatska
<b>C5</b>	14,8	1,210	<2	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>Minimalna vrijednost</b>	14,7	0,322	<2		
<b>Maksimalna vrijednost</b>	15,4	1,232	13,32		
<b>Srednja vrijednost (S)</b>	15,0	0,896	13,32±6		

**Tablica 6.** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara i peludne analize meda od lipe

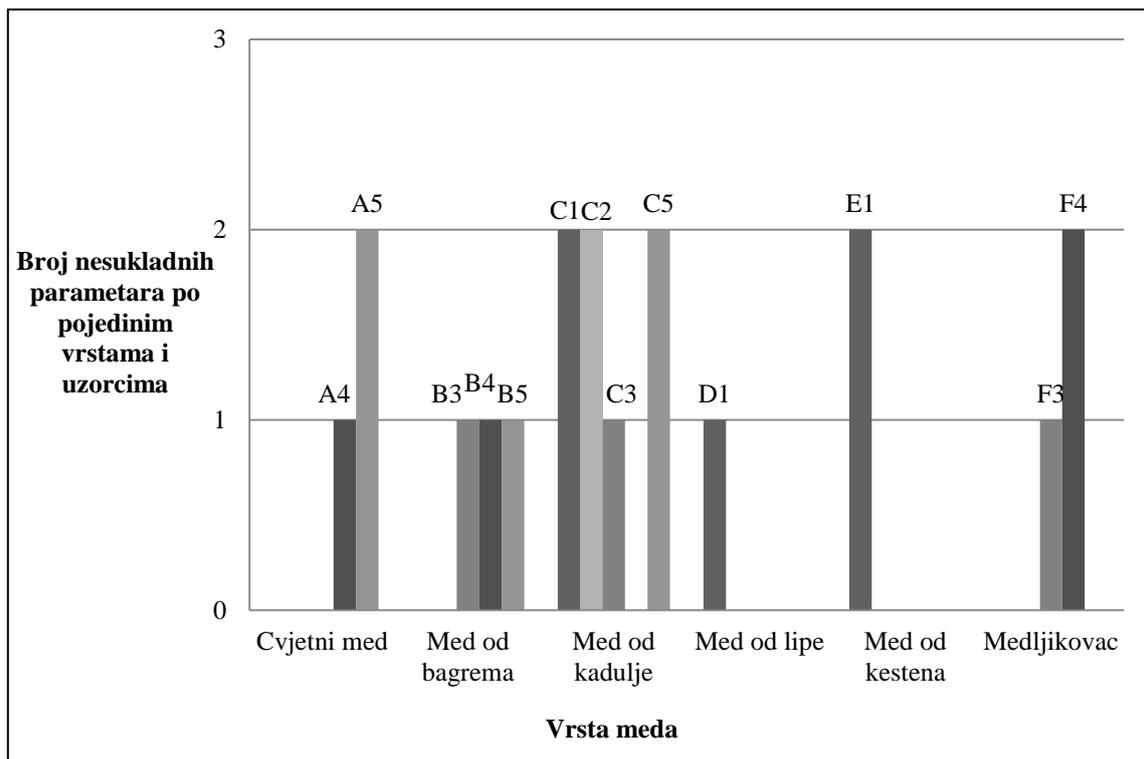
UZORAK (med od lipe)	Udio vode (%)	Električna vodljivost (mS/cm)	HMF (mg/kg)	Peludna analiza	Zemlja porijekla
<b>D1</b>	/	0,249	20,0	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>D2</b>	/	1,069	<2	zadovoljava	Hrvatska
<b>D3</b>	17,6	0,744	17,7	zadovoljava	Hrvatska
<b>Minimalna vrijednost</b>	17,6	0,249	<2		
<b>Maksimalna vrijednost</b>	17,6	1,069	20,0		
<b>Srednja vrijednost (S)</b>	17,6	0,687	18,85±4		

**Tablica 7.** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara i peludne analize meda od kestena

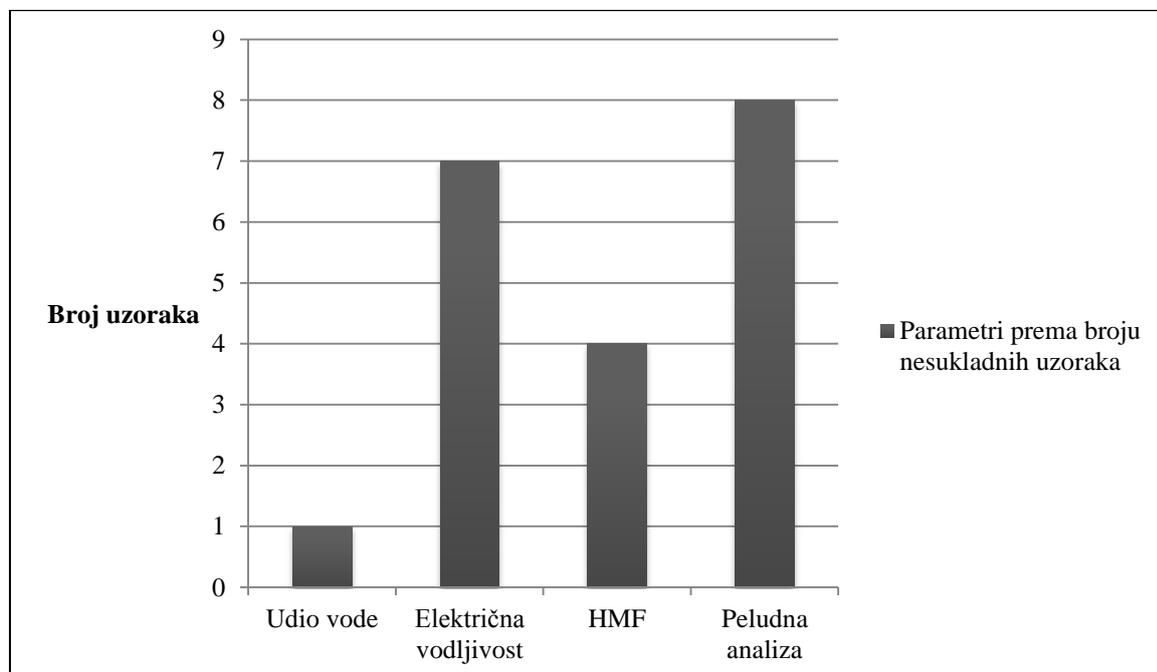
UZORAK (med od kestena)	Udio vode (%)	Električna vodljivost (mS/cm)	HMF (mg/kg)	Peludna analiza	Zemlja porijekla
<b>E1</b>	22,4	0,148	30,6	zadovoljava	Hrvatska
<b>Minimalna vrijednost</b>	22,4	0,148	30,6		
<b>Maksimalna vrijednost</b>	22,4	0,148	30,6		
<b>Srednja vrijednost (S)</b>	22,4	0,148	30,6		

**Tablica 8.** Rezultati fizikalno-kemijskih parametara i peludne analize medljikovca

UZORAK (medljikovac)	Udio vode (%)	Električna vodljivost (mS/cm)	HMF (mg/kg)	Peludna analiza	Zemlja porijekla
<b>F1</b>	18,5	0,935	2,33	zadovoljava	Hrvatska
<b>F2</b>	17	0,815	2,74	zadovoljava	Hrvatska
<b>F3</b>	14,5	0,789	21,4	zadovoljava	Hrvatska
<b>F4</b>	18,5	0,536	112	ne zadovoljava	Hrvatska
<b>F5</b>	18,0	1,084	2,64	zadovoljava	Hrvatska
<b>F6</b>	15,8	1,884	<2	zadovoljava	Hrvatska
<b>F7</b>	13,8	1,738	<2	zadovoljava	Hrvatska
<b>Minimalna vrijednost</b>	13,8	0,536	<2		
<b>Maksimalna vrijednost</b>	18,5	1,884	21,4		
<b>Srednja vrijednost (S)</b>	16,6	1,111	28,2±4		



**Slika 5.** Grafički prikaz svih nesukladnih uzoraka prema broju parametara koje ne zadovoljavaju



**Slika 6.** Grafički prikaz parametara prema broju nesukladnih uzoraka

## 5. Rasprava

Med je produkt pčelinje aktivnosti, koji zbog svog bogatog nutritivnog sastava doprinosi očuvanju ljudskog zdravlja. Sastav meda ovisi ponajviše o botaničkom i geografskom podrijetlu dok na samu kvalitetu meda utječe mnogo više čimbenika (2).

**Udio vode** u medu vrlo je bitan pokazatelj otpornosti meda na fermentaciju i kristalizaciju (14). Dopuštena količina vode regulirana je Pravilnikom o medu i ona iznosi najviše 20 % za sve vrste meda, osim za med od vrijeska (*Calluna vulgaris*) i med za industrijsku uporabu gdje je dopuštena količina vode najviše 23 % te med za industrijsku uporabu od vrijeska, najviše 25 % (5).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da samo jedan uzorak meda od kestena (Tablica 7.) prelazi dopušteni udio vode u medu dok su svi ostali uzorci sukladni Pravilniku. Srednje vrijednosti za udio vode kreću se: 14,5 % za cvjetni med, 17,1 % za bagremov med, 15,0 % za med od kadulje, 17,6 % za med od lipe i 16,6 % za medljikovac.

**Električna vodljivost** parametar je koji ne ukazuje nužno na samu kvalitetu meda već i na vrstu, odnosno podrijetlo (2). Pravilnikom o medu i ostalim važećim propisima, uređeno je da električna vodljivost svih vrsta meda mora iznositi najviše 0,8 mS/cm, dok za med od kestena i medljikovac mora iznositi najmanje 0,8 mS/cm. Niti jednim propisom nisu definirane granične vrijednosti za električnu vodljivost meda od planike, vrijesa, eukaliptusa, lipe, vrijeska, manuke i čajevca i one se smatraju iznimkama. Rezultati električne vodljivosti za uzorke cvjetnog meda iz Tablice 3. prikazuju da samo jedan uzorak prelazi maksimalno dozvoljenu vrijednost za električnu vodljivost dok ostatak uzoraka zadovoljava sa srednjom vrijednosti od 0,480 mS/cm. Nadalje, iz Tablice 5. vidljivo je da 3 uzorka meda od kadulje ne odgovaraju dopuštenim vrijednostima ( $S=0,896$  mS/cm), u Tablici 7. prikazan je rezultat za uzorak kestena s vrijednosti manjom od zadane (0,149 mS/cm). Nesukladna su bila još 2 uzorka medljikovca čiji su rezultati prikazani u Tablici 8., a čija je  $S= 1,111$  mS/cm. Ostali

uzorci odgovaraju Pravilniku za vrijednosti električne vodljivosti, pa je tako srednja vrijednost za uzroke bagremovog meda 0,207 mS/cm (Tablica 4.) i uzorke lipe 0,687 (Tablica 5.). Nesukladni uzorci u ovom slučaju nisu svi nužno bili loše kvalitete. Kod cvjetnog meda (uzorak A8), peludnom analizom dobiven je podatak da 80 % peludnih zrnaca pripada kestenu koji posljedično povećava električnu vodljivost meda. Nesukladni uzorci meda od kadulje ujedno nisu zadovoljili ni peludnu analizu prema Pravilniku o kakvoći uniflornog meda (7) što je slučaj i kod uzorka medljikovca (F4) iz čega možemo zaključiti da električna vodljivost uvelike ovisi i o botaničkom izvoru meda. Taj navod ipak ne potvrđuje uzorak meda od kestena gdje je udio peludnih zrnaca kestena bio 98 %, a vrijednost za električnu vodljivost manja od propisane.

**Određivanje HMF** vrlo je bitan parametar pri ocjenjivanju kvalitete nekog meda jer ukazuje na njegovu svježinu i pčelarsku praksu prilikom zagrijavanja (2). Najviša dopuštena vrijednost za HMF je 40 mg/kg, osim za med za industrijsku upotrebu. Za vrste meda koji potječu iz regija s tropskom klimom i mješavine takvih vrsta dopušta se najviše 80 mg/kg (5), no takvih uzoraka nije bilo u ovom istraživanju. Iz Tablica 3., 4., i 8, vidljivo je da sveukupno 4 uzorka meda ne zadovoljavaju vrijednosti propisane za količinu HMF u medu. Od toga 2 uzorka cvjetnog meda, 1 uzorak bagremovog meda i 1 medljikovac. Svi ostali uzorci ne prelaze graničnu vrijednost i udovoljavaju propisima, no može se uočiti da je veliki broj uzoraka prilično blizu granične vrijednosti od 40 mg/kg (S za cvjetni med 30,7 mg/kg, S za bagremov med 28,8±2 mg/kg, S za med od kadulje 13,3±6 mg/kg, za med od lipe 18,85±4 mg/kg, kestena 30,6 mg/kg i medljikovac 28,2± 4 mg/kg) što se ne može smatrati zadovoljavajućim.

**Peludna analiza** vrlo je bitna za uniflorne vrste meda koje prilikom stavljanja na tržište moraju udovoljavati zahtjevima Pravilnika o kakvoći uniflornog meda (7). Za analizirane uniflorne vrste meda u ovom radu granične vrijednosti udjela peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu moraju biti za: bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) 20 %, za kadulju (*Salvia*

officinalis L.) 15 %, iznimno 10 % uz karakteristična svojstva mirisa, okusa i boje za tu biljnu vrstu, za lipu (*Tillia spp.*) 15 %, iznimno 10 % kao i za kadulju te za kesten 85 %. Peludnu analizu nisu zadovoljila ukupno 2 uzorka bagremovog meda ( Tablica 4.), 4 uzorka meda od kadulje (Tablica 5), 1 uzorak meda od lipa (Tablica 6) te jedan uzorak medljikovca (Tablica 8) u kojem nije nađeno dovoljno peludnih zrnaca za klasifikaciju meda niti spora da bi se mogao deklarirati kao medljikovac.

Iz slike 5. može se iščitati da najveći broj uzoraka (ukupno 8) ne zadovoljava zahtjeve propisa za peludnu analizu, nakon čega slijedi električna vodljivost, HMF te udio vode. Iz Slike 4. gdje su prikazani svi uzorci koji nisu bili sukladni po nekom parametru, može se zaključiti da je najviše nesukladnosti bilo kod uzoraka deklariranih kao med od kadulje, gdje propise nisu zadovoljila ukupno 4 uzorka od analiziranih 5.

Znanstvenici s Agronomskog fakulteta u Zagrebu proveli su analizu fizikalno-kemijskih svojstava meda s područja Dalmacije u razdoblju od 2014. do 2015. godine. Istraživanje je provedeno na 171 uzorku meda. Prosječni udio vode za uzroke cvjetnog meda u 2014. godini bio je 17,5 % , za med od kadulje 16,2 %, za medljikovac 16,4 %, a u 2015. godini 16,9 % za cvjetni, 15,6 % za med od kadulje i 16,0 % za medljikovac (20). Dobiveni rezultati u 2014. godini za cvjetni med znatno su viši nego u ovom istraživanju, za med od kadulje neznatno viši u obje godine, dok se za uzorke medljikovac može reći da je srednja vrijednost udjela vode bila ista u obje godine, odnosno neznatno niža nego u ovom istraživanju.

Vrijednosti za električnu vodljivost u radu s Agronomskog fakulteta za područje Dalmacije u 2014. godini bile su 0,57 mS/cm za cvjetni med, 0,27 mS/cm za kadulju i 1,27 mS/cm za medljikovac te 0,49 mS/cm, 0,27 mS/cm i 1,01 mS/cm u 2015. godini (20). Usporedivši to s rezultatima ovog istraživanja može se reći da je razlika jedino kod meda od kadulje čije su

vrijednosti za električnu vodljivost znatno više u ovom radu što se pripisuje neodgovarajućem peludnom sastavu uzoraka.

Istraživanje provedeno na području Bosne i Hercegovine u razdoblju od 2016. do 2017. godine također možemo usporediti s ovim radom. Na 78 uzorka s područja cijele BiH napravljene su fizikalno-kemijske analize. Rezultati prosječnog udjela vode su sljedeći: za cvjetni med 16,86 %, za med od kadulje 17,49 %, med od lipe 16,71 %, kestenov med 16,63 % i medljikovac 15,54 % (21). Rezultati za cvjetni med i kadulju viši su za otprilike 2 % na području BiH, dok su za med od lipe i medljikovac niži za otprilike 1 %. S obzirom da je samo jedan nesukladni uzorak kestenova meda u ovom radu, nije relevantan za uspoređivanje. Što se tiče srednje vrijednosti za električnu vodljivost na području BiH ona je za cvjetni med iznosila 0,31 mS/cm, za kadulju 0,17 mS/cm, za med od lipe 0,16 mS/cm med od kestena 0,48 mS/cm i medljikovac 0,27 mS/cm (21). Prema rezultatima dobivenima u ovom istraživanju može se zaključiti da su vrijednosti električne vodljivosti uzoraka cvjetnog meda približno iste, meda od kadulje i lipe te medljikovca znatno više u ovom istraživanju, dok vrijednosti za kestenov med nisu sukladne niti u jednom radu.

Srednje vrijednosti HMF-a na području BiH bile su sljedeće: 30,79 mg/kg za cvjetni med, 44,67 mg/kg za med od kadulje, 24,25 mg/kg za lipu, 32,37 mg/kg za kestenov med i 18,37 mg/kg za medljikovac (21). Nedvojbeno se može zaključiti da su vrijednosti HMF u uzorcima meda s područja Hrvatske i BiH visoke. Za cvjetni i kestenov med gotovo pa iste, za med od kadulje i lipe vrijednosti su više na području BiH a kod medljikovca HMF je viši u uzorcima s Hrvatskog tržišta.

## 6. Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- S obzirom na zahtjeve propisa o medu, od ukupno 29 analiziranih uzoraka meda na tržištu Republike Hrvatske od kojih je bilo 8 uzoraka cvjetnog meda, 5 uzoraka bagremovog meda, 5 uzoraka meda od kadulje, 3 uzorka meda od lipe, 1 uzorak kestenov meda i 7 uzoraka medljikovca, nesukladno je bilo njih 13, od čega najviše uzoraka meda od kadulje.
- Od svih analiziranih parametara, kao parametar s najviše nesukladnih uzoraka pokazala se peludna analiza s ukupno 8 nesukladnih uzoraka, nakon koje slijede električna vodljivost sa 7 nesukladnih uzoraka, HMF s 4 i udio vode s 1 nesukladnim uzorkom.
- Prema dobivenim rezultatima kvaliteta meda na tržištu Republike Hrvatske pokazala se nezadovoljavajućom s obzirom na to da je gotovo pa polovina uzoraka bila nesukladna po jednom ili više parametara.
- Vrlo je bitno stalno provoditi nadzor na pčelarima, njihovim proizvodima te uvezenim uzorcima meda kako bi se očuvalo zdravlje potrošača i kako se ne bi zavaravali glede kvalitete proizvoda koji kupuju.

## 7. Literatura

1. Forjan F. Med: Hrana i lijek. Bjelovar: Čvor; 2012.
2. Ball D.W. The Chemical Composition of Honey. *Journal of Chemical Education*. 2007; 84: 10.
3. Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standard for Honey, Codex Stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2, 1-7, 2001.
4. Franić Z., Branica G. Long-term Investigations of <sup>134</sup>Cs and <sup>137</sup>Cs Activity Concentrations in Honey from Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2019; 102(1).
5. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o medu. *Narodne Novine* 2015; 055
6. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o o izmjenama Pravilnika o medu. *Narodne Novine*. 2017; 047.
7. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o kakvoći uniflornog meda. *Narodne Novine*. 2009; 122.
8. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o izmjeni Pravilnika o kakvoći uniflornog meda. *Narodne Novine*. 2013; 141.
9. Vijeće Europske Unije. Direktiva vijeća 2001/110/EZ od 20. prosinca 2001. o medu. *Službeni list Europske Unije*. 2002; L10:47-52, 2002.
10. Europski parlament, Vijeće Europske Unije. Direktiva 2014/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 15. svibnja 2014. o izmjeni Direktive Vijeća 2001/110/EZ o medu. *Službeni list Europske unije*. 2014; L164:1-5.
11. Mouhoubi-Tafinine Z., Ouchemoukh S., Bachir bey M., Louaileche, H., Tamendjari, A. Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. Bejaia. *International Food Research Journal*. 2018; 25(3): 1044-1050
12. Zahedi Namini N., Mousavi M.H., Mahmoudi R., Hassanzadeh P. Hygienic quality of the honey samples produced in the Iran in comparison with international standards. *International Food Research Journal*. 2018; 25(3): 982-988.

13. Von Der Ohe W, Persano L., Piana M.L., Morlot M., Martin P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. 2004; 35.
14. Machado De-Melo A.A., Bicudo de Almeida-Muradian L, Sancho M.T., Pascual-Maté A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey. *Journal of Apicultural Research*, 2017.
15. 10. Yang M., Gao Y., Liu Y., Fan X., Zhao K., Zhao Sh. Broadband Dielectric Properties of Honey: Effect of Water Content. *J. Agr. Sci. Tech*. 2018; 20: 685-693.
16. Bakirdere S., Yaroglu T., Tirik N., Demiroz M., Karaca A. Analysis of some physical, chemical and microbiological aspects of honey samples produced and consumed in Turkey. *FCA UNCUYO*. 2018; 50(1): 263-271.
17. International Honey Commission. Harmonised methods of the International Honey Commission. International Honey Commission. 2009.
18. Hrvatska akreditacijska agencija. Potvrda o akreditaciji 1127. 2007-2022.
19. The Linde Group. Analytical methods. High performance liquid chromatography (HPLC). The Linde Group. 2019.
20. Rončević A., Svečnjak L., Bubalo D., Prđun S.. Fizikalno-kemijska svojstva meda s područja Dalmacije. *Fisheries, Game Management and Beekeeping*. 2018; 06.
21. Ćirić J., Sando D., Spirić D., Janjić J., Bosković M., Glisic M. Characterisation of Bosnia and Herzegovina honeys according to their physico-chemical properties during 2016–2017. Institute of Meat Hygiene and Technology. Beograd. 2018.

## **ŽIVOTOPIS**

Zovem se Tea Kolić. Rođena sam u Ogulinu 29.12.1995. godine. Nakon završene osnovne škole upisala sam Opću gimnaziju u Ogulinu, koju sam pohađala od 2011. do 2014. godine. Nakon završene srednje škole upisala sam preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstvo na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu.

Na drugoj godini studiranja počela sam raditi kao demonstrator na kolegiju Biologije, a iste godine prijavila sam se na Erasmus+ program. Na trećoj godini, nakon što sam uspješno prošla prijavu za Erasmus+ program, 3 mjeseca studirala sam na fakultetu Escola Superior de Saúde (Porto, Portugal) gdje sam uspješno položila sve predviđene kolegije. 2017. godine nakon što sam se vratila iz Porta završila sam preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva u Zagrebu i iste godine upisala diplomski studij Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

Na drugoj godini diplomskog studija, istraživački diplomski rad odlučila sam napisati kod izv.prof.dr.sc. Aleksandra Buloga, dipl.sanit.ing., zbog sadržaja i kvalitete njegovog rada prilikom održavanja kolegija.