

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Vesna P. Vasić

**KORELACIJA FIZIČKO-HEMIJSKIH
PARAMETARA I FITOHEMIJSKOG PROFILA
MEDLJKOVACA SA NJIHOVIM BILJNIM
POREKLOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Vesna P. Vasić

**CORRELATION OF PHYSICO-CHEMICAL
PARAMETERS AND PHYTOCHEMICAL
PROFILE OF HONEYDEW HONEYS WITH
THEIR BOTANICAL ORIGIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentor:

dr **Jelena Trifković**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr **Dužanka Milojković – Opsenica**, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr **Živoslav Tešić**, profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr **Vladimir Beškoski**, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr **Dražen Lušić**, vanredni profesor
Medicinski fakultet Univerziteta u Rijeci, Hrvatska

Datum odbrane:

U Beogradu, _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Jelene Trifković, vanrednog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Želela bih da se zahvalim mentorki prof. dr Jeleni Trifković na svestranoj pomoći i podršci u svim fazama izrade doktorske disertacije, kao i na korisnim sugestijama.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Draženu Lušiću i prof. dr Živoslavu Tešiću koji su mi obezbedili uzorke medljikovaca za izradu ove doktorske disertacije, a koji su zatim stručnim savetima i sugestijama doprineli njenom kvalitetu.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Vladimiru Beškoskom na pomoći prilikom eksperimentalnog dela i uvođenju u svet dvodimenzionalne gasne hromatografije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Dušanki Milojković-Opsenici na pokazanom interesovanju, stručnim savetima i sugestijama prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći u raznim fazama istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, a posebno dr Urošu Gašiću, dr Daliboru Stankoviću, dr Aleksandri Radoičić, dr Tomislavu Tostiju, mast. hem. Slađani Đurđić i nekadašnjim studentima, a sada već master hemičarima, Kristini Dacić, Ani Vukojičić i Jeleni Jović.

Veliku zahvalnost dugujem dragoj koleginici i drugarici dr Sanji Živković čija podrška datira još od osnovnih studija.

Posebnu zahvalnost dugujem Dušanu na bezrezervnoj podršci i savetima tokom doktorskih studija.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici na neizmernoj ljubavi, podršci i razumevanju. Hvala vam što me činite srećnom, što ste moj oslonac i što mi uvek dajete podstrek da ostvarim svoje snove.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojoj majci Velinki Vasić.

Vesna P. Vasić

Sažetak

Predmet istraživanja doktorske disertacije bilo je određivanje fizičko-hemijskih parametara i fitohemijskog profila medljikovaca u cilju definisanja biljnog porekla ove specifične vrste meda.

Na osnovu fizičko-hemijskih parametara potvrđena je autentičnost uzoraka u pogledu načina proizvodnje, uzorci potiču od sokova koje luče biljke, ili ekskreta insekata koji se hrane tim sokovima. U cilju određivanja autentičnosti prema biljnom poreklu, pet vrsta medljikovaca (*Abies alba* Mill., *Quercus ilex* L., *Quercus frainetto* Ten., *Acer monspessulanum* L. i crnogorice) okarakterisano je prema šećernom i fenolnom profilu, $\delta^{13}\text{C}$ vrednostima medljikovaca i proteina izolovanih iz medljikovaca, sadržaju esencijalnih i toksičnih elemenata, kao i sadržaju isparljivih jedinjenja. Za procenu antioksidativne sposobnosti primenjen je spektroskopski i elektrohemijski pristup. Metode multivarijantne analize korišćene su za dobijanje modela na osnovu kojih su identifikovani markeri biljnog porekla medljikovaca.

Rezultati potvrđuju mogućnost procene autentičnosti medljikovaca zasnovane samo na fenolnom profilu i antioksidativnoj sposobnosti, kao i prednost primene ciklične voltometrije za određivanje antioksidativnog potencijala fenolnih jedinjenja u odnosu na spektroskopske metode. Sadržaj elemenata je takođe omogućio klasifikaciju medljikovaca prema biljnom poreklu, dok među šećerima nije pronađen marker koji je specifičan za neku biljnu vrstu. Analiza stabilnih izotopa ugljenika potvrdila je da su uzorci autentični u pogledu proizvodnje meda i da su dobijeni iz C3 biljaka, kao i da vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ proteina izolovanog iz medljikovca mogu takođe biti dobar pokazatelj biljnog porekla. Medljikovci iz roda *Quercus* spp., *Quercus frainetto* i *Quercus ilex*, pokazali su jedinstven hemijski profil.

Ključne reči: medljikovac, autentičnost, fizičko-hemijski parametri, fitohemijski profil, multivarijantna analiza

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

Abstract

The main aim of this doctoral dissertation was to determine physico-chemical parameters and the phytochemical profile of the honeydew honeys in order to define the botanical origin of this specific type of honey.

Physicochemical parameters confirmed that samples were authentic with respect to honey production and originated from secretion produced by certain trees and other plants or from excretions of plant-sucking insects. Authentication according to botanical origin of honeydew honey, for five botanical types (*Abies alba* Mill., *Quercus ilex* L., *Quercus frainetto* Ten., *Acer monspessulanum* L. and conifers), was performed using sugars and phenolic profiles, $\delta^{13}\text{C}$ values of the honeydew honey and proteins isolated from the honeydew honey, the content of the essential and toxic elements as well as the content of the volatile compounds. Spectroscopic and electrochemical approaches were applied for evaluation of the antioxidant capacity. Multivariate chemometric analysis was used to obtain models for evaluation of markers of botanical origin.

The results confirmed the possibility of assessing the authenticity of honeydew honey based only on the phenolic profile and antioxidant capacity, as well as the advantage of applying cyclic voltammetry to determine the antioxidant potential of phenolic compounds in comparison with spectroscopic methods. Elements content enable the classification of honeydew honey according to botanical origin, while no chemical marker has been found within sugar compounds. Stable isotope carbon analysis confirmed that the samples were authentic with respect to honey production and were obtained from C3 plants, while the values of $\delta^{13}\text{C}$ of protein isolated from the honeydew honey could be a good indicator of botanical origin. *Quercus spp.* samples, *Quercus frainetto* and *Quercus ilex*, showed specific chemical composition.

Key words: honeydew honey, authenticity, physico-chemical parameters, phytochemical profile, multivariate analysis

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. Vrste meda.....	2
2.2. Autentičnost meda	2
2.3. Fizičko-hemijske karakteristike meda	3
2.3.1. Sadržaj vode.....	3
2.3.2. Električna provodljivost	3
2.3.3. Specifična optička rotacija	3
2.3.4. Ukupna kiselost.....	4
2.4. Hemijski sastav meda	4
2.4.1. Šećeri.....	4
2.4.2. Stabilni izotopi	5
2.4.2.1. <i>Calvin-Benson</i> i <i>Hatch-Slack</i> fotosintetski ciklus	6
2.4.3. Fenolna jedinjenja	7
2.4.4. Minerali i elementi u tragovima	8
2.4.5. Isparljiva jedinjenja	8
2.5. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava meda	9
2.5.1. Visokoeffikasna tečna hromatografija.....	9
2.5.2. Metoda masene spektrometrije stabilnih izotopa	10
2.5.3. Ultraljubičasta/Vidljiva spektroskopija.....	11
2.5.4. Ciklična voltometrija	11
2.5.5. Indukovano kuplovana plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom i indukovano kuplovana plazma sa masenom spektrometrijom	12
2.5.6. Dvodimenzionalna gasna hromatografija.....	13
2.6. Hemometrijske metode	13
2.6.1. <i>Kruskal-Wallis</i> test	14
2.6.2. Analiza glavnih komponenti	14
2.6.3. Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom	15
2.6.4. Nelinearna analiza glavnih komponenata.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DEO	16
3.1. Uzorci medljikovaca.....	16
3.2. Reagensi i materijali	16
3.3. Određivanje fizičko-hemijskih parametara.....	17
3.3.1. Određivanje sadržaja vode	17
3.3.2. Određivanje električne provodljivosti	17
3.3.3. Određivanje specifične optičke rotacije	18
3.3.4. Određivanje kiselosti.....	18
3.4. Analiza fenolnih jedinjenja.....	18
3.4.1. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja.....	18

3.4.2. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja.....	19
3.4.3. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja.....	19
3.4.4. Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.....	20
3.5. Analiza šećera primenom visokoefikasne jonske hromatografije.....	21
3.5.1. Priprema uzoraka.....	21
3.5.2. Jonska hromatografija.....	21
3.6. Odnos stabilnih izotopa ugljenika.....	22
3.6.1. Izolovanje proteina.....	22
3.6.2. Metoda masene spektrometrije odnosa izotopa.....	22
3.7. ICP-OES i ICP-MS analiza elemenata.....	22
3.8. Analiza isparljivih komponenti primenom dvodimenzionalne gasne hromatografije.....	24
3.8.1. Priprema uzoraka.....	24
3.8.2. Dvodimezionalna gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom.....	24
3.9. Statistička obrada podataka.....	24
4. NAŠI RADOVI.....	26
4.1. Fizičko-hemijski parametri.....	26
4.1.1. Sadržaj vode.....	26
4.1.2. Električna provodljivost.....	27
4.1.3. Specifična optička rotacija.....	28
4.1.4. Slobodna kiselost.....	28
4.1.5. Laktonska kiselost i ukupna kiselost.....	29
4.1.6. pH vrednost.....	30
4.2. Šećerni profil medljikovaca.....	32
4.3. Odnos stabilnih izotopa ugljenika.....	35
4.4. Profil fenolnih jedinjenja u uzorcima medljikovaca.....	37
4.5. Kvantifikacija fenolnih jedinjenja.....	44
4.6. Antioksidativna aktivnost medljikovaca.....	47
4.7. Elementalni sastav medljikovaca.....	50
4.8. Ekstrakcija i GCxGC analiza isparljivih komponenti.....	54
4.9. Statistička obrada rezultata.....	56
4.9.1. Analiza fizičko-hemijskih parametara.....	56
4.9.2. Analiza šećernog profila.....	58
4.9.3. Analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika.....	60
4.9.4. Analiza sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.....	60
4.9.4.1. Analiza profila dobijenih cikličnom voltametrijom.....	62
4.9.5. Analiza elementalnog sastava.....	64
4.9.6. Analiza uticaja objedinjenih parametara na grupisanje medljikovaca.....	66
4.9.7. Klasifikacija medljikovaca tri odabrane biljne vrste (jela, hrast sladun, primorski hrast).....	68
4.9.8. Analiza medljikovaca u odnosu na godinu proizvodnje.....	72
4.9.9. Analiza isparljivih komponenata.....	72
5. ZAKLJUČAK.....	74

6. LITERATURA	75
7. PRILOG	83
8. BIOGRAFIJA	88

1. UVOD

Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela (1), med se definiše kao prirodna, slatka supstanca koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) preradom nektara biljaka, ili iz sokova sa živih delova biljaka, ili sakupljanjem ekskreta insekata koji se hrane sišući sokove sa živih delova biljaka, koje pčele sakupljaju, prerađuju i dodaju sopstvene specifične supstance, dehidriraju i odlažu u ćelije saća do sazrevanja.

Sastav i kvalitet meda variraju u zavisnosti od biljnog i geografskog porekla, načina proizvodnje i uslova rukovanja i skladištenja. Akumuliranje pojedinih fitohemikalija zavisi od klimatskih uslova (kao što su sunčeva svetlost i vlaga), geografskog regiona sa kojih pčele skupljaju nektar, odnosno medljiku i mednu rosu, zbog čega hemijski sastav meda koji potiče od određene biljne vrste može biti različit. Veliki varijabilitet hemijskog sastava meda otežava definisanje kriterijuma i standarda, stoga je razvoj pouzdanih analitičkih procedura za procenu autentičnosti, sistematsku karakterizaciju i klasifikaciju meda veoma važan u oblasti hemije hrane (2,3).

Proizvodnja meda je regulisana tržišnim pravilima ponude i potražnje. Kad god postoji velika razlika u ceni, postoji i mogućnost za nepoštenu zaradu novca: da se jeftiniji proizvod proda kao skuplji ili da se dodaju komponente niske vrednosti, kao što su zaslađivači (2). Stoga, utvrđivanje autentičnosti meda, kao jedne od najznačajnijih potvrda kvaliteta prehrambenih proizvoda, je neophodno kako u cilju zaštite potrošača tako i samih proizvođača. Jedan od načina za utvrđivanje autentičnosti, kako u pogledu načina proizvodnje tako i u pogledu biljnog i geografskog porekla, jeste formiranje baza podataka. Iz tog razloga Međunarodna komisija za med (*eng. International Honey Commission, IHC*) je u okviru studije više od 6500 uzoraka meda iz 21 zemlje definisala parametre kvaliteta glavnih evropskih monofloralnih medova (4). Međutim, med proizveden od medljike ili medne rose je u pomenutoj studiji naveden samo kao medljikovac, bez definisanja njegovog biljnog porekla. Sistematsko ispitivanje medljikovaca koje bi obuhvatilo kompletnu analizu hemijskog sastava definisanih biljnih vrsta do sada nije opisano u raspoloživoj literaturi. U najvećem broju radova ova specifična vrsta meda, dobijena od slatkog soka koji luče biljke ili insekti (*Hemiptera*) koji žive na biljkama, označava se samo kao medljikovac ili šumski med, bez naglašene biljne vrste koja je njegov dominantni izvor. U pomenutim radovima se hemijska svojstva medljikovaca upoređuju sa cvetnim medom, najčešće prema fizičko-hemijskim parametrima, sadržaju šećera, sadržaju elemenata i antioksidativnoj aktivnosti (5,6). U radovima u kojima je biljno poreklo ispitivanih uzoraka definisano, analiziran je manji broj najzastupljenijih vrsta koji su najčešće okarakterisani određenom klasom hemijskih jedinjenja. Takođe, u većini studija broj analiziranih uzoraka, kao i broj identifikovanih i kvantifikovanih parametara, je nedovoljan da bi se pouzdano okarakterisala pojedina biljna vrsta medljikovca (6,7).

S obzirom na činjenicu da je ispitivanje hemijskog sastava medljikovaca u sponu i da je u bazi podataka koji definišu parametre kvaliteta najzastupljenijih evropskih medova ova vrsta navedena kao jedinstvena grupa bez definisanog biljnog porekla (4), cilj ove disertacije je uspostavljanje jasnih kriterijuma za diferencijaciju i klasifikaciju pet biljnih vrsta medljikovca, jele (*Abies alba* Mill.), primorskog hrasta (*Quercus ilex* L.), hrasta sladuna (*Quercus frainetto* Ten.), primorskog javora (*Acer monspessulanum* L.) i crnogorice (uglavnom vrste iz familije Pinaceae, rodovi *Abies*, *Pinus*, *Picea* i *Cedrus*). Pronalaženje pouzdanih hemijskih markera biljnog porekla je teško usled složenog hemijskog sastava meda. Međutim, uzimajući u obzir do sada uočeni značaj hemijskog sastava za diferencijaciju cvetnog meda u odnosu na njegovo poreklo, očekivano je da bi komponente prisutne u malim količinama, kao što su fenolna jedinjenja, elementi i oligosaharidi, bilo moguće koristiti za procenu autentičnosti medljikovaca u pogledu njihovog biljnog porekla. Očekuje se da podaci dobijeni u okviru ove doktorske disertacije doprinesu projektu IHC-a koja radi na prikupljanju informacija važnih za određivanje parametara kvaliteta najvažnijih evropskih medova.

2. OPŠTI DEO

2.1. Vrste meda

Med proizvode pčele od različitih sekreta biljaka. U zavisnosti od sekreta biljaka koji je korišćen za sintezu meda, med se može podeliti na cvetni med i medljikovac (7).

Cvetni med proizvode pčele od nektara, sekreta koji izlučuju biljne žlezde nektarije unutar cveta. Prema poreklu nektara koji ulaze u njegov sastav cvetni med može biti monofloralni, ukoliko je u njegovom sastavu dominantan nektar određene biljne vrste, i polifloralni, ukoliko njegov sastav čine nektari više biljnih vrsta. Cvetni med nikada nije u potpunosti poreklom od jedne vrste nektara. Monofloralni med, osim dominantne biljne vrste uvek sadrži i nektare drugih biljnih vrsta (8).

Medljikovac je specifična vrsta meda koja ne potiče od nektara. Jedan od izvora medljikovca je medljika, slatka tečnost koju u vidu ekskremenata luče lisne i štitaste vaši sišući biljni sok. Lisne i štitaste vaši luče medljiku u obliku kapljica po listovima i drugim delovima biljaka, koje pčele kasnije sakupljaju i prerađuju u med. Drugi izvor medljikovca je tzv. medna rosa. To je sladunjav sok koji luči lišće nekih četinarskih i listopadnih vrsta drveća. Prilikom lučenja medne rose ne učestvuju ni nektarske žlezde ni lisne i štitaste vaši (9). Najzastupljenija je medljika četinara, najčešće jele (*Abies spp.*), smreke (*Picea spp.*), bora (*Pinus spp.*), hrasta (*Quercus spp.*), kestena (*Castanea sativa Miller*), bukve (*Fagus sylvatica L.*) i leske (*Corylus spp.*) (10).

Ranije se medljikovac smatrao neželjenim sastojkom cvetnog meda (11), međutim danas interesovanje za medljikovac raste zbog njegovog većeg antibakterijskog i antioksidativnog svojstva u odnosu na cvetni med (7). Saglasno povećanju interesovanju od strane potrošača raste i njegova cena. U Srbiji je medljikovac još uvek slabije poznat i manje zastupljen u proizvodnji, dok je na primer u Švajcarskoj, Nemačkoj, Grčkoj i Italiji veoma cenjen (4,12). Hrvatska takođe ima velike mogućnosti za proizvodnju medljikovca zbog velikih područja hrastovih šuma u Slavoniji i jelovih šuma u Gorskom Kotaru i Lici (12).

2.2. Autentičnost meda

Autentičnost meda ima dva aspekta: autentičnost vezana za proizvodnju meda (dodatak šećera, uklanjanje ili dodavanje vode, zagrevanje i sl.) i autentičnost koja podrazumeva određivanje biljnog i geografskog porekla meda. Utvrđivanje autentičnosti meda je bitno kako bi potrošači dobili pouzdane informacije o poreklu i kvalitetu meda kao i zbog određivanja cene meda jer različite vrste meda imaju različitu tržišnu vrednost (13). Evropsko zakonodavstvo dozvoljava da deklaracija meda sadrži informacije o regionalnom, teritorijalnom ili topografskom poreklu proizvoda, pa čak i specifičnim kriterijumima vezanim za kvalitet (9). Stoga, postoji sve veći komercijalni interes za utvrđivanje autentičnosti meda.

Metodologija kontrole kvaliteta hrane, pa tako i meda, bi trebalo da se zasniva na parametrima koji ne podležu velikim promenama tokom prerade (14). Analiza monofloralnih vrsta meda i utvrđivanje njihovog biljnog porekla uključuje tri komplementarne metode: senzornu, melisopalinološku i fizičko-hemijsku analizu (9). Određivanje sastava polena i elemenata medljike, kao i senzorna analiza, su vremenski zahtevne metode koje mogu da realizuju osobe usko specijalizovane za takve vrste analiza (15). Zbog pomenutog ograničenja klasičnog pristupa, u poslednjih nekoliko decenija sprovedene su mnoge studije u cilju pronalaženja parametara koji bi omogućili lakše i pouzdano utvrđivanje biljnog porekla meda. U ovim istraživanjima, fizičko-hemijski parametri (16), sadržaj minerala (17), sadržaj ugljenih hidrata (18), kombinovano sa nekoliko hemometrijskih tehnika (19) su predloženi kao kriterijumi za procenu autentičnosti monofloralnih vrsta meda. Pored toga, postoje mnoge studije koje povezuju biljno poreklo sa nekim drugim svojstvima meda određenim njihovim hemijskim sastavom, poput sadržaja isparljivih

organskih jedinjenja (20,21), sadržaja flavonoida (22), aminokiselinskog sastava (23) ili odnosa stabilnih izotopa ugljenika i azota (24).

2.3. Fizičko-hemijske karakteristike meda

Među fizičko-hemijske parametre, koji se najčešće određuju prilikom provere kvaliteta meda, spadaju: sadržaj vode, električna provodljivost, specifična optička rotacija, slobodna, laktonska i ukupna kiselost i pH vrednost (5).

2.3.1. Sadržaj vode

Voda je, posle ugljenih hidrata, najzastupljeniji sastojak meda i njen sadržaj je uglavnom između 14% i 20%, dok u pojedinim slučajevima, kao što su med od vreska i med od trešnjinog drveta, može biti i do 23% (9). Sadržaj vode zavisi od mnogih faktora među kojima su: klimatski uslovi u toku proizvodnje meda, vlažnost i temperatura vazduha u košnici kao i uslovi prilikom prerade i čuvanja meda.

Postoje dve zvanične metode za određivanje sadržaja vode u medu: gravimetrijska metoda i određivanje indeksa refrakcije meda. Gravimetrijska metoda podrazumeva sušenje na temperaturi od 105 °C i merenje suvog ostatka, dok se određivanje indeksa refrakcije meda zasniva na principu po kojem se refraktivni indeks povećava sa povećanjem sadržaja čvrste supstance i sadržaj vode se u tom slučaju dobija upoređivanjem vrednosti očitano indeksa refrakcije sa referentnim vrednostima standarda (25).

2.3.2. Električna provodljivost

Električna provodljivost (EP) rastvora meda se definiše kao provodljivost 20% vodenog rastvora meda na 20 °C, gde se 20% odnosi na suhu supstancu meda. Određuje se korišćenjem električne konduktometrijske ćelije, a samo određivanje EP se zasniva na merenju električnog otpora, koji je recipročan vrednosti električne provodljivosti. Rezultat se izražava u milisimensima po centimetru (mS/cm) (5).

2.3.3. Specifična optička rotacija

Specifična optička rotacija (SR), $[\alpha]_D^{20^{\circ}C}$ je ugao rotacije polarizovane svetlosti meren na talasnoj dužini natrijumove D linije ($\lambda = 589,3$ nm) na 20 °C, u vodenom rastvoru 1 dm dubine, koji sadrži 1 $\frac{g}{mL}$ supstance. Specifična optička rotacija izračunava se prema formuli:

$$[\alpha]_D^{20^{\circ}C} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot p}$$

gde je:

α – očitana vrednost specifične ugaone rotacije

l – dužina polarimetrijske cevi, izražena u decimetrima

p – masa, izražena kao masa suve supstance.

Metoda se zasniva na svojstvu ugljenih hidrata, kao optički aktivnih supstanci, da skreću ravan polarizovane svetlosti. Merenjem ugla rotacije analiziranog vodenog rastvora meda dobija se specifičan ugao rotacije, koji se odnosi na sadržaj ugljenih hidrata (5).

2.3.4. Ukupna kiselost

pH vrednost se definiše kao negativan logaritam aktiviteta hidronijumovih jona u rastvoru. Slobodna kiselost (SK) predstavlja sadržaj slobodnih kiselina, izražen u meq/kg ili mmol/kg meda. Laktonska kiselost (LK) odgovara kombinovanoj kiselosti koja se ne može odrediti direktnom titracijom. Ukupna kiselost (UK) predstavlja zbir slobodne kiselosti i laktonske kiselosti.

Metoda određivanja slobodne kiselosti se zasniva na merenju pH vrednosti vodenog rastvora meda i titrovanju standardnim rastvorom natrijum-hidroksida (koncentracije $0,05 \frac{mol}{dm^3}$) do pH vrednosti 8,3. Laktonska kiselost se određuje dodavanjem viška standardnog rastvora natrijum-hidroksida i retitracijom standardnim rastvorom hlorovodonične kiseline (koncentracije $0,05 \frac{mol}{dm^3}$) (5).

2.4. Hemijski sastav meda

Med je složena smeša pretežno izgrađena iz ugljenih hidrata (70-80%, w/w) i vode (10-20%, w/w). Ostala jedinjenja koja ulaze u sastav meda su fenolna jedinjenja, mineralne soli, amino-kiseline, karboksilne kiseline, proteini, enzimi, hormoni, lipidi, vitamini, pigmenti, steroli i fosfolipidi. Iako je sadržaj tih jedinjenja u medu manji od 1% ona su uglavnom odgovorna kako za senzorna, tako i za nutritivna svojstva meda (7,26).

Dok hemijski sastav cvetnog meda zavisi od vrste nektara od kojeg je nastao, hemijski sastav medljikovca zavisi od vrste biljke koja luči mednu rosu kao i od insekata (*Hemiptera*) koji luče medljiku. Razlike u hemijskom sastavu cvetnog meda i medljikovca se uglavnom javljaju zbog prolaska slatkog biljnog soka preko crevnog trakta insekata (*Hemiptera*) usled čega medljikovac uvek sadrži i enzime njihovih pljuvačnih žlezda i creva. Invertaza, dijastaza, peptidaza i proteaza su identifikovane u medljikovcu, a ovi enzimi dovode do razlika u šećernom profilu medljikovca u odnosu na cvetni med. Medljikovci generalno sadrže više minerala, amino-kiselina i viših šećera, naročito melezitaze i rafinoze (6,27).

2.4.1. Šećeri

S obzirom da su ugljeni hidrati glavni sastojak meda sa udelom od 73-83%, med se u hemijskom smislu može definisati kao presićeni rastvor šećera. Monosaharidi, fruktoza i glukoza, čine oko 85-95% ukupnog sadržaja šećera u medu. Ostatak čine disaharidi, trisaharidi i neki viši oligosaharidi (7).

Fruktoza je najdominantniji šećer praćen glukozom u gotovo svim vrstama meda. Međutim, glukoza je prisutna u većim količinama u medu od uljane repice (*Brassica napus*) i medu od maslačka (*Taraxacum officinale*). Osim iz nektara, glukoza i fruktoza nastaju i kao rezultat enzimske hidrolize saharoze, u prisustvu invertaze. Sadržaj fruktoze i glukoze, kao i njihov odnos, je važan za uspostavljanje brojnih fizičkih karakteristika meda kao što su gustina, viskozitet, specifična optička rotacija, hidroskopnost i brzina kristalizacije. Kiselost meda je takođe povezana sa sadržajem glukoze koja se delovanjem glukoza-oksidge oksiduje u glukonsku kiselinu koja čini 70-90% organskih kiselina u medu. Tokom ove konverzije dolazi do formiranja vodonik-peroksida koji ima ulogu konzervansa (28,29).

Veliki sadržaj monosaharida i relativno velike količine disaharida u medu otežavaju hromatografsko odvajanje drugih saharida koji su manje zastupljeni u medu. Dodatni problem prilikom hromatografskog određivanja oligosaharida predstavlja prisustvo strukturno sličnih ugljenih hidrata kao i nedostatak komercijalnih standarda (6). Primenom gasne hromatografije identifikovano je 16 oligosaharida, od toga 11 disaharida (saharoza, maltoza, turanoza, kojibioza, palatinoza, laminariboza, gentiobioza, celobioza, izomaltoza, neotrehaloza, nigerzoza) i 5 trisaharida (erloza, izopanoza, panoza, maltotrioza, teanderoza) (30). Drugi trisaharidi, uključujući melezitazu,

izomaltotriozu, rafinozu i izomelezitozu, kao i tetrasaharidi, izomaltotetraoza, maltotetraoza, stahioza, fruktozil-izomelezitoza, α -4'-glukozil-erloza, α -6'-glukozil-erloza, identifikovani su visokoefikasnom tečnom hromatografijom i gasnom hromatografijom (31). Sadržaj oligosaharida u medljikovcu je veći u odnosu na cvetni med, naročito melezitoze (27,32).

Usled prisustva hiralnih jedinjenja, pre svega ugljenih hidrata, med je optički aktivan i ovo svojstvo može da se iskoristi za razlikovanje medljikovca od cvetnog meda. Medljikovci su desnorotatorni, a cvetni medovi su levorotatorni. Naime, specifična optička rotacija fruktoze je $-92,4^\circ$, glukoze $+52,7^\circ$, saharoze $+66,5^\circ$, maltoze $+130,4^\circ$, melezitoze $+88,2^\circ$ i erloze $+121,8^\circ$. Kako je u cvetnom medu dominantna fruktoza, koja ima negativnu specifičnu optičku rotaciju, ukupna specifična optička rotacija ove vrste meda je negativna. Medljikovac sadrži manje količine fruktoze u odnosu na cvetni med, a veće količine oligosaharida (uglavnom trisaharida) što rezultuje njegovom pozitivnom specifičnom optičkom rotacijom (7,33).

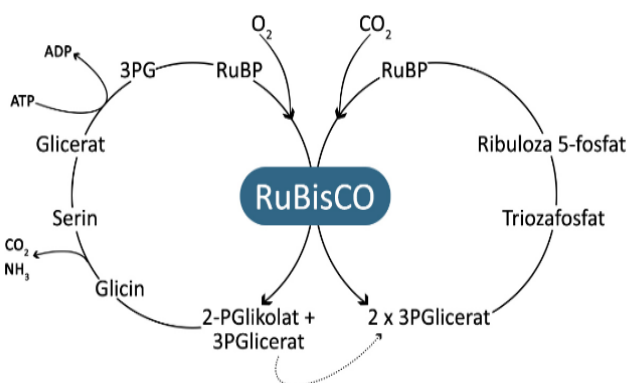
Definisanje šećernog profila meda je koristan pristup za utvrđivanje autentičnosti u pogledu načina proizvodnje. Med se može falsifikovati dodavanjem različitih vrsta skrobnih sirupa, među kojima se najčešće koriste glukozni i visokofruktozni sirupi koji se dobijaju hidrolizom kukuruznog, krompirovog ili pirinčanog skroba. Sadržaj saharoze u šećernom sirupu može biti i 40 puta veći od sadržaja saharoze u prirodnom medu. Maltoza i maltotriozna su obično prisutne u visokoj koncentraciji u šećernim sirupima (29,8 g/100 g i 6,5 g/100 g, redom), dok koncentracije maltoze i maltotrioze u medu nisu toliko visoke. Ovi šećeri se mogu koristiti kao markeri za otkrivanje falsifikata. Sadržaj maltoze u prirodnom medu uglavnom je manji od 30 mg/g. Maltoza u nekim medovima koji potiču iz određenih biljaka može biti i do 50 mg/g. Odnos fruktoza/glukoza, maltoza/izomaltoza, saharoza/turanoza i maltoza/turanoza može se upotrebiti za procenu mogućeg falsifikovanja meda sa glukoznim ili visokofruktoznim sirupima (28).

2.4.2. Stabilni izotopi

Izotopi su oblici istog elementa koji imaju različit broj neutrona u jezgri. Za razliku od radioaktivnih izotopa, stabilni izotopi se ne raspadaju. Stabilni izotopi većine elemenata postoje u više oblika. Vodonik (H), kiseonik (O) i ugljenik (C) imaju po dva stabilna izotopa: ^2H i ^1H , ^{18}O i ^{16}O , ^{13}C i ^{12}C , redom. Mala razlika u masi utiče na to da se izotopi ponašaju drugačije tokom prirodnih bioloških, meteoroloških i geoloških procesa. Koncentracija stabilnih izotopa se izražava kao odnos manje zastupljenog i više zastupljenog izotopa, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ i $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, a najviše se koristi veličina δ ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$), koja predstavlja relativno odstupanje odnosa datih izotopa u nekom materijalu od odnosa u standardnom materijalu, izraženo u promilima (‰). Odnos stabilnih izotopa se uvek određuje u odnosu na izotopske standarde u cilju otklanjanja bilo kakve predrasude ili sistematske greške u merenjima. Prema definiciji, standard za neki izotop ima δ vrednost 0‰. Svi materijali koji sadrže više težeg izotopa imaju pozitivne δ vrednosti, a oni koji imaju više lakšeg izotopa imaju negativne δ vrednosti. Za svaki izotop je određen međunarodni primarni standard (34).

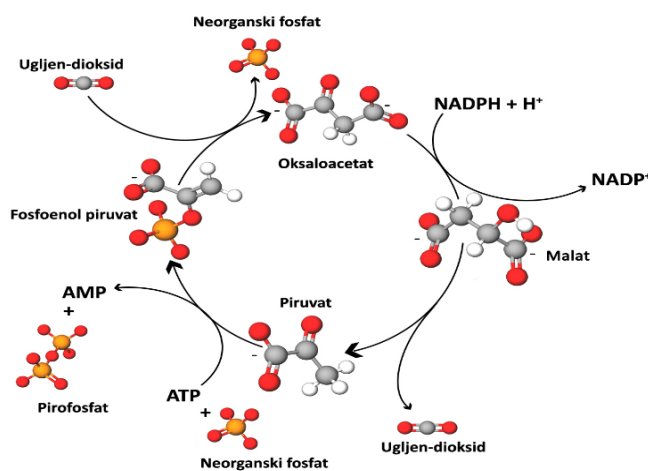
2.4.2.1. Calvin-Benson i Hatch-Slack fotosintetski ciklus

Analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika je korisna u otkrivanju krivotvorenja meda pomoću sirupa od šećerne trske ili kukuruznog sirupa (13,35–38). Naime, izotopski odnos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ukazuje na fotosintetski ciklus tokom kojeg biljke koriste i fiksiraju CO_2 . U *Calvinov-Benson* (C3) ciklusu fotosinteze atmosferski CO_2 ulazi u ciklus preko ribuloza-1-5-difosfata, formirajući intermedijer od šest atoma ugljenika. Nastali intermedijer se brzo raspada na dva molekula 3-fosfoglicerata koji se konvertuje u ugljeni hidrat pomoću ribuloza-1,5-difosfatne karboksilaze (**Slika 1**).



Slika 1. Calvin-Benson fotosintetski ciklus

U *Hatch-Slack* (C4) fotosintetskom ciklusu atmosferski CO_2 ulazi u ciklus preko fosfoenolpiruvata, formirajući oksalsirćetnu kiselinu, koja se zatim konvertuje u malat i aspartat (**Slika 2**).



Slika 2. Hatch-Slack fotosintetski ciklus

Biljke koje su izvori medljike i nektara sintetišu svoje šećere putem *Calvin*-ovog metaboličkog puta, dok šećeri u kukuruzu i šećernoj trski nastaju putem *Hatch-Slack* metaboličkog puta. S druge strane, postoje biljne vrste koje imaju metamorfozirane listove i koje imaju nisku transpiraciju. Takve vrste se nazivaju sekuletne, a zbog specifičnog načina metabolizma ugljenika kod ovih biljaka njihov metabolički put se naziva CAM (*Crassulacean acid metabolism*). Biljke sa ovim tipom metaboličkog puta učestvuju i u C3 i u C4 ciklusu (39).

U biljkama koje učestvuju u *Calvin-Benson* fotosintetskom ciklusu, vrednost $\delta^{13}\text{C}$ se kreće od - 21 ‰ do - 32 ‰, dok kod biljaka koje učestvuju u *Hatch-Slack* (C4) ciklus fotosinteze, vrednost $\delta^{13}\text{C}$ kreće se od -21 ‰ do -19 ‰ (36). Vrednost $\delta^{13}\text{C}$ u čistom medu je između - 22,5 do -27,4 ‰ sa prosekom -25,4 (40). Pčele koje proizvode med uglavnom koriste biljke koje učestvuju u C3 ciklusu fotosinteze. Kada je vrednost $\delta^{13}\text{C}$ negativnija od -23,5 ‰, kaže se da je med "čist" (37,41). Primenom IRMS tehnike može se odrediti procenat dodatog šećera. Vrednost za δ ‰ zaslađivača je -9,7‰ što je srednja vrednost odnosa stabilnih izotopa ugljenika ($\delta^{13}\text{C}$) u kukuruznom sirupu (31,36). S druge strane, dodatak pirinčanog sirupa predstavlja sve veći problem jer pirinač spada u C3 biljke tako da pomoću IRMS trenutno nije moguće detektovati prisustvo pirinčanog sirupa u medu (42).

2.4.3. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su veoma rasprostranjeni proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka sa izraženim antioksidativnim dejstvom zbog kojeg se smatraju bitnim u prevenciji i lečenju mnogih bolesti. Poznato je više od 8000 fenolnih jedinjenja, koja se po svojoj strukturi veoma razlikuju, od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline do visokokondenzovanih jedinjenja kao što su tanini (43).

Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline i flavonoidi.

Fenolne kiseline su jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu, a nastaju iz acetata biosintetskim putem preko šikiminske kiseline.

U praksi su pojmom fenolkarbonskih kiselina obuhvaćene dve vrste metabolita:

derivati benzoeve kiseline (C₆-C₁),

derivati cimetine kiseline (C₆-C₃).

Najzastupljeniji derivati benzoeve kiseline su: galna, eleginska, *p*-hidroksi-benzoeva, vanilinska, protokatehinska i siringinska kiselina, dok su među derivatima cimetine kiseline najzastupljenije *p*-kumarinska, kofeinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Ova jedinjenja mogu se naći u rastvorenom obliku kao konjugati sa šećerima, kao i vezana za ćelijski zid (43).

Flavonoidi su po hemijskoj strukturi heterociklična jedinjenja. Kod njih se osnovni skelet sastoji iz dva benzenova prstena koja su međusobno vezana tročlanim nizom (C₆-C₃-C₆ jedinjenja). U flavonoide spadaju: flavoni i flavanoni, flavanoli i dihidroflavanoli, izoflavoni i izoflavanoni, halkoni i dihidrohalkoni, auron, antocijanini, katehini, leukoantocijanidini, biflavoni i proantocijanidini. Posebno je značajna antioksidativna sposobnost fenolnih flavonoida izolovanih iz biljaka, gde se ističe kvercetin koji se nalazi u većini biljnih vrsta (44).

Ukupan sadržaj flavonoida u medu je 2-10% od ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (45). Flavonoidi koje se najčešće mogu naći u medu su pinocembrin, apigenin, kamferol, kvercetin, galangin, krisin, pinobanksin, luteolin i hesperitin (7,46). Od fenolnih kiselina prisutne su galna, kofeinska, kumarinska, ferulinska i elaginska kiselina, i njihovi estri. Osim estara navedenih kiselina zastupljeni su i neki drugi estri kao što su npr. metil-siringat i metil-4-hidroksibenzoat (7,47).

Flavonoidi koji se najčešće mogu naći u medljikovcu su luteolin, hesperitin, pinobanksin, rutin i katehin (7). Osim pinobanksina, koji je pronađen i u cvetnim medovima i u medljikovcu iz Slovenije (48), ostali navedeni flavonoidi bi mogli da se smatraju karakterističnim za medljikovce iz Brazila (49).

U studiji o cvetnim medovima i medljikovcima iz Turske glavna fenolna jedinjenja pronađena u *Quercus robur* L. bili su rutin, protokatehinska kiselina, galna kiselina i *p*-hidroksi-benzoeva kiselina, dok su u *Pinus brutia* L. glavna fenolna jedinjenja bili katehin, protokatehinska kiselina, *p*-hidroksi-benzoeva kiselina i vanilinska kiselina. Galna kiselina je predložena kao marker za razlikovanje ove dve biljne vrste jer je detektovana samo u *Quercus robur* i to u prilično visokoj

koncentraciji od 82,49 µg/g. Odsustvo galne kiseline u *Pinus brutia* je primećeno i u drugim studijama (45,50).

Za procenu antioksidativnog potencijala fenolnih jedinjenja primenjuje se veliki broj antioksidativnih testova kao što su ABTS (eng. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), FRAP (eng. ferric-reducing ability of plasma), TRAP (eng. total peroxy radical-trapping antioxidant parameter), PSC (eng. peroxy scavenging capacity), DPPH (eng. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging capacity assay). Ovakvi testovi imaju određena ograničenja u pogledu različitih radikala koji se u njima koriste kao i zbog upotrebe radikala koji se ne nalaze u ljudskom organizmu. S obzirom da fenolna jedinjenja prolaze kroz brojne biohemijske reakcije u organizmima ova činjenica bi mogla da objasni zašto fenolna jedinjenja i biljni ekstrakti pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost u *in vitro* ispitivanjima dok to nije uvek slučaj kada se rade *in vivo* ispitivanja. Takođe, *in vitro* ispitivanje antioksidativne aktivnosti meri samo antioksidativnu aktivnost prema jednoj vrsti radikala, a ne za sve reaktivne vrste (43).

2.4.4. Minerali i elementi u tragovima

U medu su zastupljeni i razni makro- i mikroelementi u prosečnom rasponu od 0,02 do 1,03%. Tamniji medovi kao što su medljikovac, med od kestena i vreska sadrže veću količinu minerala u poređenju sa svetlijim medovima kao što su med od limuna, lavande i ruzmarina (6). Najzastupljeniji metal u medu je kalijum, a prisutni su i Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Zn i Mn (51).

Minerali iz zemljišta mogu posredstvom korena biljke da dospeju do cveta i ostalih delova biljke od kojih pčele prave med, pa se samim tim mogu naći i u medu. Sadržaj elemenata u medu se često koristi kao indikator kvaliteta, biljnog i geografskog porekla, ali može i da ukaže na stepen zagađenja područja odakle su pčele prikupile nektar, medljiku ili mednu rosu (17,51,52).

Analizom medova iz Španije utvrđeno je da medljikovci sadrže veću količinu minerala u poređenju sa cvetnim medovima i da se mineralni sadržaj može koristiti za razlikovanje cvetnih medova od medljikovaca (53). Isto tako, *Fernandez-Torres* i saradnici (54) su primenili multielementalnu analizu za klasifikaciju meda iz Španije. Analizirali su sadržaj Zn, P, B, Mn, Mg, Cu, Ca, Ba, Sr, Na i K i zaključili da koncentracije Zn, Mn, Mg i Na u medovima od eukaliptusa, ruzmarina, vreska i narandže pokazuju zavisnost od biljnog porekla ispitivanog meda. *Terrab* i saradnici (55) su uspeli da na osnovu koncentracije K, Mg, Mn, Fe, Zn i Cu izvrše klasifikaciju meda od eukaliptusa i medljikovca iz Maroka.

U mnogim studijama o medu dokazana je veza između sadržaja teških metala u zagađenom okruženju i njihovog sadržaja u medu proizvedenog u tom okruženju (7). Zbog specifičnog načina odlaganja medljike na površini lišća biljke, kao i korenskog sistema koji kod drvenastog bilja prodire dublje u zemljište u odnosu na cvetnice, medljikovac je više izložen kontaminaciji iz okruženja u poređenju sa cvetnim medom. Mnogi autori su pronašli veći sadržaj metala u medljikovcu u poređenju sa cvetnim medom proizvedenim na istom području (56,57). Prema nekim autorima, sadržaj teških metala je između dva i tri puta veći u medljikovcu nego u cvetnom medu, iako su oba tipa meda proizvedena u identičnom okruženju (58). Iz tih razloga analiza metala u medljikovcima se može smatrati dobrim indikatorom zagađenja životne sredine. Prisustvo industrijskih zagađivača u blizini gradova i razvijeni transport doprinose zagađenju životne sredine, a samim tim doprinose i povećanju sadržaja metala u medu proizvedenom na takvom području. Čak i ako se pčelinje zajednice ne nalaze u području sa visokim rizikom od antropogenog zagađenja životne sredine, klimatski faktori (kao što je na primer vetar) mogu dovesti do zagađenja životne sredine (59).

2.4.5. Isparljiva jedinjenja

Aroma je veoma bitno svojstvo meda koje potiče od isparljivih supstanci prisutnih u nektaru ili mednoj rosi. Pored toga, medonosne pčele mogu da proizvedu mirisne komponente ili ove komponente mogu nastati tokom termičke obrade i skladištenja meda, kao i pčelarske prakse. Dakle,

aroma meda značajno zavisi od vrste biljke i zrelosti meda (60). Medljikovac ima intenzivniji ukus u poređenju sa cvetnim medom (61).

Najzastupljenija isparljiva jedinjenja identifikovana u medu mogu se svrstati u tri klase organskih jedinjenja: terpeni, norizoprenoidi i derivati benzena. Određena jedinjenja iz navedenih klasa su predložena kao potencijalni markeri biljnog porekla, dok se jedinjenja poput nekih aldehida i razgranatih alkohola povezuju sa metabolizmom mikroorganizama, a derivati furana i pirana sa uslovima skladištenja i termičkom obradom meda (62). Metil-antranilat je predložen kao marker za karakterisanje meda od agruma, dok su 3,9-epoksi-1,4(8)-*p*-mentadien (etar lipe), *trans*-8-*p*-menten-1,2-diol i tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2*H*-piran (*cis*-oksid ruže) predloženi kao markeri meda od lipe. Naef i saradnici (63) su u cvetu i medu od lipe identifikovali monoterpenske kiseline 4-izopropenilcikloheksa-1,3-dien-1-karboksilnu kiselinu i 4-(1-hidroksi-1-metiletil)-cikloheksa-1,3-dien-1-karboksilnu kiselinu (21,47). Nekoliko derivata benzena (kao što su npr. benzaldehid, 2-feniletanol i benzil-alkohol) se ne mogu smatrati potencijalnim biomarkerima zato što su prisutni u visokim koncentracijama u svim vrstama meda (7). Kao markeri biljnog porekla meda od planike predloženi su α -izoforon, β -izoforon i 4-oksoizoforon, dok su različiti norizoprenoidi identifikovani i u ekstraktima meda od eukaliptusa (64).

2.5. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava meda

Utvrđivanje biljnog i geografskog porekla meda može se postići ispitivanjem senzornih svojstava, melisopalinološkom analizom i analizom fizičko-hemijskih parametara (8). Međutim, senzorna i melisopalinološka analiza su vremenski zahtevne metode koje zahtevaju visoko-obučene stručnjake.

Poslednjih godina velika pažnja se posvećuje razvijanju analitičkih metoda koje u kombinaciji sa hemometrijskim pristupom mogu da se koriste za procenu biljnog i geografskog porekla meda. Neke od tih analitičkih metoda su: karakterizacija osnovnih fizičko-hemijskih parametara (7,65), određivanje fenolnih jedinjenja primenom tačne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (66), analiza minerala primenom indukovanu kuplovane plazme sa masenom spektrometrijom (67), analiza ugljenih hidrata primenom tačne hromatografije (68), određivanje isparljivih komponenata primenom dvodimezionalne gasne hromatografije (69).

2.5.1. Visokoefikasna tačna hromatografija

Hromatografske metode se zasnivaju na različitoj migraciji rastvorenih supstanci kroz sistem koji se sastoji od dve faze, od kojih je jedna mobilna, a druga stacionarna faza. Sistemi kod kojih je mobilna faza tečnost karakteristični su za tačnu hromatografiju (*eng. Liquid chromatography, LC*). Pojava visokoefikasnih materijala koji su korišćeni za stacionarne faze i istovremeno poboljšanje instrumentacije koje je omogućilo da pune mogućnosti tog materijala dođu do izražaja, doveli su do razvoja visokoefikasne tačne hromatografije (*eng. High performance liquid chromatography, HPLC*). Kako se HPLC razvijala, veličina čestica materijala korišćenih za stacionarne faze postojala je progresivno sve manja. Danas se kao stacionarne faze najčešće koriste porozne čestice od silika-gela, sfernog ili nepravilnog oblika, nominalnog prečnika 10, 5 ili 3 μm . Primena čestica veličine manje od 2 μm zahteva upotrebu višeg pritiska od onog koji se koristi kod HPLC-a, što je dovelo do razvoja ultraefikasne tačne hromatografije (*eng. Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC*) (70,71).

Silika-gel je najčešće primenjivani sorbent u tačnoj hromatografiji na čijoj površini je prisutno nekoliko različitih funkcionalnih grupa: slobodne silanolne, reakciono sposobne silanolne grupe međusobno povezane vodoničnim vezama, vicinalne silanolne grupe i siloksanske grupe. Adsorpciona svojstva silika-gela određena su prisustvom navedenih silanolnih grupa koje predstavljaju aktivne centre u procesu hromatografskog odvajanja. Kao moguće interakcije koje određuju retenciju supstanci koje se odvajaju mogu da se javi vodonične veze, dipol-dipol i druge

elektrostatičke interakcije. Na jačinu navedenih interakcija utiče broj efektivnih silanolnih grupa, struktura odvajanih supstanci kao i eluciona moć upotrebene mobilne faze. Silanolne grupe na površini silika-gela mogu se hemijski modifikovati reakcijom sa različitim hlorosilanima. Najčešće se koriste sorbenti sa dimetil-(C2), butil-(C4), oktil-(C8), dodecil-(C12), oktadecil-(C18), 3-cijanopropil-(CN), 3-aminopropil-(NH₂) i diol-grupama. Svojstva hemijski modifikovanih silika-gelova zavise od karakteristika organskog modifikatora kao i od fizičkih svojstava upotrebjenog silika-gela (72).

Mala veličina čestica stacionarne faze dovodi do velikog otpora protoku fluida, tako da mobilna faza mora da se pumpa kroz kolonu pod visokim pritiskom. Kolona i ostali dodatni delovi (cevi, ventili, priključci, itd.) moraju da budu od materijala koji izdržava visoke pritiske, a hemijski je otporan na rastvarače koji se koriste kao mobilna faza. Kao mobilne faze koriste se voda, organski rastvarači ili puferi. U slučaju nepolarnih stacionarnih faza koriste se polarni rastvarači, dok u slučaju polarnih stacionarnih faza nepolarni rastvarači obezbeđuju razdvajanje (70,72).

Razdvojeni analiti se detektuju preko odgovarajućeg detektora. Uloga detektora je da neprekidno prati sastav mobilne faze koja je propuštena kroz stacionarnu fazu. Detektor daje električni signal koji može biti proporcionalan nekom svojstvu kompletne mobilne faze (rastvarač + rastvorak) ili svojstvu samog rastvorka. Idealan detektor bi trebalo da ima visoku osetljivost, linearnost u što širem opsegu i da bude nedestruktivan (70).

U svakodnevnoj analitičkoj praksi značajna je i jonska hromatografija kod koje su jonoizmenjivačke smole smeštene u kolone ili kao mikronski porozni polimerni slojevi ili kao sloj smole na poroznim česticama silika-gela (70,72). Prilikom analize šećera najviše se primenjuje visokoefikasna jonska hromatografija sa elektrohemijskim detektorom (HPAEC-PAD) (73).

S obzirom da med predstavlja složen matriks sa visokom koncentracijom šećera i vrlo niskom koncentracijom fenolnih jedinjenja, analiza fenolnih jedinjenja primenom visokoefikasne tečne hromatografije obično zahteva prethodno uklanjanje šećera i drugih ometajućih jedinjenja. Ovi koraci su dugotrajni i mogu dovesti do gubitka analita prisutnih u tragovima. Najčešće korišćeni detektori su DAD i UV/VIS, koji međutim nisu pogodni za identifikaciju komponenti koje pokazuju slične UV/VIS spektre (74). Iz tog razloga, za hromatografsku analizu fenolnih jedinjenja u medu sve više se primenjuju druge analitičke tehnike sa većim stepenom selektivnosti i osetljivosti. Tako je, na primer, za identifikaciju i kvantifikaciju flavonoidnih aglikona u medu iz Slovenije korišćena HPLC-DAD spregnuta sa masenim spektrometrom sa elektrosprej-jonizacijom (HPLC-DAD-ESI-MS) (75). UHPLC-ESI-MS/MS je korišćena za analizu fenolnih jedinjenja u cvetnim medovima i medljikovcima (76). Nekoliko istraživača je identifikovalo i kvantifikovalo fenolna jedinjenja u medu koristeći HPLC-ESI-MS/MS bez prethodnih procedura prečišćavanja ili koncentrovanja (7,74). Detekcija pomoću masene spektrometrije ima prednosti pružanja detaljnijih strukturnih informacija o eluiranim jedinjenjima. Osetljivost i selektivnost detekcije mogu biti povećane korišćenjem tandem MS-a, pri čemu dolazi do veće fragmentacije prekursora i jona proizvoda, što znači da se mogu dobiti dodatne informacije neophodne za identifikaciju fenolnih jedinjenja (74).

2.5.2. Metoda masene spektrometrije stabilnih izotopa

IRMS aparat je specijalno dizajniran da precizno meri male razlike u zastupljenosti izotopa kao što su ²H/¹H, ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N i ¹⁸O/¹⁶O. Uzorci se prevode u osnovne gasove kao što su H₂, CO₂, N₂ i CO (u zavisnosti od sastava ispitivanog materijala), a IRMS zatim meri odnos jona koji odgovara tim gasovima. Odnos izotopa meri se u odnosu na internacionalni standard koji definiše skalu merenja za pojedinačne izotope pri čemu je potrebno koristiti dobro okarakterisan standard čiji je odnos izotopa određen u odnosu na primarni materijal (77).

IRMS je maseni detektor na koji mogu biti povezani razni instrumenti koji omogućavaju pretvaranje uzoraka u osnovne gasove koje je detektor sposoban da odredi. Prilikom analize meda elementalni analizator (*eng. elemental analyzer*, EA) vrši sagorevanje uzoraka na visokim

temperaturama bez prethodnog razdvajanja određenih komponenata. Nakon sagorevanja dolazi do razdvajanja gasova pomoću hromatografske kolone. Tako prečišćeni gasovi ulaze u detektor. Analiza se može prikazati u nekoliko koraka: prvo se dešava sagorevanje ili termalna konverzija uzorka pomoću elementalnog analizatora, zatim nastali gasovi prelaze u izvor jona na masenom spektrometru, pri čemu dolazi do jonizacije molekula gasova koja je praćena razdvajanjem i detekcijom jona na masenom spektrometru, a na kraju se vrši vrednovanje dobijenih rezultata (77).

EA-IRMS metoda se može koristiti za različite materijale. Čvrste supstance se unose u elementalni analizator pomoću kalajnih kapsula (za analizu C/N) ili srebrnih kapsula (za analizu O/H), dok se tečni uzorci direktno unose u sistem. Temperatura reaktora je između 900 i 1050 °C, ali toplota koja se oslobodi sagorevanjem kalajnih kapsula povisi temperaturu na oko 1800 °C. U izvoru jona masenog spektrometra, molekuli gasa se jonizuju u interakciji sa snopom elektrona. Nakon jonizacije, nastali joni napuštaju izvor i grupišu se prema visokoj voltaži. Pored određene voltaže na putanju jona ima uticaj i jačina magnetnog polja. Za merenje odnosa stabilnih izotopa ugljenika i azota potrebna su tri kolektora koji su specifični za skupljanje m/z 28 i 29 ili m/z 44, 45 i 46 ili univerzalni trostruki kolektor. Svaki je povezan sa svojim pojačivačem čija se težina meri precizno. Svaki pojačivač ima različitu težinu tako da proizvodi različite signale (77).

LC-IRMS metoda funkcioniše kao sistem za preparativnu hromatografiju. Injektovan uzorak se, pomoću tečne hromatografije, razdvaja na sastavne komponente (u slučaju meda na osnovne šećere) pre ulaska u reaktor za sagorevanje. Tako detektovani signali dolaze posebno od glukoze, fruktoze i saharoze (38).

Ova tehnika je jedna od novijih i efikasnijih za određivanje porekla šećera u uzorcima meda, pogotovo za dokazivanje adulteracija sa šećerom poreklom od šećerne repe.

2.5.3. Ultraljubičasta/Vidljiva spektroskopija

Ultraljubičasta/Vidljiva (UV/VIS) spektroskopija obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetnog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm. S obzirom da veliki broj organskih jedinjenja ne apsorbuje u ovom delu spektra ova metoda u poređenju sa drugim strukturnim metodama ima daleko manju primenu za strukturna određivanja. Uglavnom se koristi kao komplementarna metoda za identifikaciju onih delova molekula koji apsorbuju u navedenoj oblasti. Međutim, u slučaju konjugovanih jedinjenja i aromata UV/VIS spektri pružaju veoma korisne informacije o strukturi ispitivanog jedinjenja (78).

UV/VIS spektrofotometar se sastoji od svetlosnog izvora iz koga se svetlost deli na referentni i analitički zrak, monohromatora, detektora i uređaja za pojačanje, merenje i beleženje signala. Kao izvor zračenja koriste se volframova lampa, za vidljivu oblast, dok se za blisku ultraljubičastu oblast koristi deuterijumska lampa (78).

S obzirom da fenolna jedinjenja u svojoj strukturi sadrže konjugovane aromatične prstenove ona apsorbuju u UV/VIS delu spektra. S druge strane, prisustvo supstituenta u molekulu flavonoida, dovodi do batohromnog (pomeranje apsorpcionih maksimuma ka većim talasnim dužinama) ili hipsohromnog pomeranja (pomeranje apsorpcionih maksimuma ka manjim talasnim dužinama). Za flavonoide su karakteristična dva elektronska prelaza: prelaz I koji je karakterističan za prsten B koji se javlja na talasnoj dužini od oko 550 nm, i prelaz II koji je karakterističan za prsten A koji se javlja na talasnoj dužini od oko 250 nm. U literaturi su navedene talasne dužine oba prelaza za veliki broj flavonoida (79,80).

2.5.4. Ciklična voltametrija

Danas su elektrohemijske metode pronašle široku primenu u oblasti analitičke hemije zbog njihove brzine i jednostavnosti. Prednosti ovih metoda su širi linearni raspon i veća osetljivost.

Ciklična voltametrij, kao jedna od elektrohemijskih metoda koja se najčešće primenjuje, se zasniva na povratnoj linearnoj promeni elektrodnog potencijala od početne do vrednosti za krajnji potencijal, zatim do vrednosti potencijala gašenja, pri čemu vrednost potencijala gašenja ne mora da bude identična početnom potencijalu. Na ovaj način omogućeno je određivanje potencijala karakterističnih za fenolna jedinjenja ispitivanih uzoraka medljikovaca u širokom opsegu potencijala. Polazni oksidacioni potencijal je najčešće elektrodni na kojem se ne odigrava proces oksidacije, a u toku snimanja dolazi do pomeranja elektrodnog potencijala prema pozitivnijim vrednostima. S druge strane, za proces redukcije polazi se od elektrodnog potencijala na kojem nema redukcije, a u toku snimanja dolazi do pomeranja elektrodnog potencijala prema negativnijim vrednostima. Nakon postizanja konačne vrednosti elektrodnog potencijala, dolazi do vraćanja elektrodnog potencijala do potencijala gašenja (79,81).

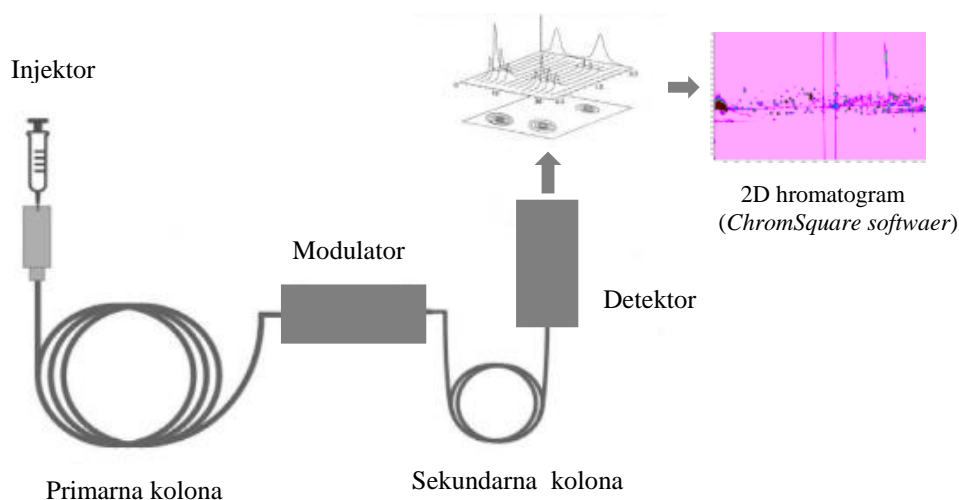
U voltametrijskim eksperimentima najčešće se upotrebljavaju tri elektrode od kojih je jedna radna, jedna pomoćna i jedna referentna. Referentna elektroda se postavlja blizu radne elektrode i sadrži *Luggin-Haber*-ovu kapilaru da bi se smanjio gubitak otpora, dok su radna i pomoćna elektroda dovoljno razdvojene. Za voltametrijska ispitivanja može se koristiti veliki broj rastvarača i pomoćnih elektrolita, a izbor prvenstveno zavisi od rastvorljivosti analita (81).

2.5.5. Indukovano kuplovana plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom i indukovano kuplovana plazma sa masenom spektrometrijom

Indukovano kuplovana plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom (ICP-OES) i indukovano kuplovana plazma sa masenom spektrometrijom (ICP-MS) se smatraju naprednim tehnikama za brzu i preciznu analizu elementalnog sastava. Obe tehnike se zasnivaju na atomizaciji i ekscitaciji uzoraka u izvoru plazme. Upotreba plazme je nadmašila plamenu apsorpcionu spektroskopiju koja za pobuđivanje koristi plamen (jer je mali broj elemenata koji mogu da se pobude u plamenu), a nadmašila je i atomsku apsorpcionu spektroskopiju za koju je potrebna posebna lampa sa šupljom katodom od elementa koji želimo da odredimo (82,83). Kvantifikacija ICP-OES-om se zasniva na merenju pobuđenih atoma i jona na karakterističnim talasnim dužinama za elemente koji se mere. S druge strane, ICP-MS meri masu atoma masenom spektrometrijom (MS). Zbog razlike u detekciji elemenata, donja granica detekcije za ICP-MS se može izraziti u $\frac{\text{ng}}{\text{L}}$, dok se donja granica za ICP-OES može izraziti u $\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$. Dakle, ako je koncentracija elemenata ispod ili blizu donje granice detekcije ICP-OES-a, onda je ICP-MS instrument izbora. ICP-OES se uglavnom koristi za uzorke sa visokom ukupnom količinom rastvorenih čvrstih supstanci ili suspendovanih čvrstih supstanci i stoga je robusnija za analizu podzemnih voda, otpadnih voda, zemljišta i čvrstog otpada. Može se koristiti i za analizu pitke vode. S druge strane, ICP-MS je posebno pogodna tehnika za analizu uzoraka sa niskim koncentracijama elemenata od interesa. Kod ICP-OES-a dovoljni su samo analitički reagensi i u odnosu na ICP-MS je jeftinija metoda i predstavlja metodu izbora kada elementi nisu prisutni u nižim koncentracijama. S druge strane, ICP-MS kao tehnika ima nedostatak koji se ogleda u neželjenim spektralnim i ne-spektralnim interferencijama, koje bi mogle uticati na elementni sastav uzoraka. Visoka koncentracija organske komponente matriksa često dovodi do interferencije matriksa i/ili spektralnih interferencija od poliatomskih jona. Ovi efekti mogu biti eliminisani ili bar umanjani upotrebom alternativnih izotopa i/ili jednačina za korekciju interferencije (83). ICP-OES i ICP-MS su često korišćene metode u analizi elementalnog sastava meda (59,67,84).

2.5.6. Dvodimenzionalna gasna hromatografija

Dvodimenzionalna gasna hromatografija (GC×GC) je relativno nova analitička metoda koja se u velikoj meri koristi u analizi raznih kompleksnih uzoraka. Ova metoda nudi veću osetljivost i unapređenu rezoluciju u poređenju sa jednodimenzionalnom gasnom hromatografijom, a dvodimenzioni hromatogrami dodatno olakšavaju identifikaciju pojedinih klasa jedinjenja. Princip rada je baziran na kontinuiranom eluiranju gasno-hromatografske kolone i periodičnom reinjektovanju eluenta u sledeću kolonu sa drugačijim svojstvima. Primarna kolona je najčešće nepolarna i razdvajanje je povezano sa različitim tačkama ključanja, dok je sekundarna kolona najčešće polarna i razdvajanje se vrši na osnovu polarnosti. Modulator omogućava da uzorak bude podvrgnut razdvajanju u obe kolone, odnosno fizički povezuje primarnu i sekundarnu kolonu i omogućava periodično sakupljanje eluenta i injektovanje (85). Šematski prikaz 2D gasnog hromatografa kuplovanog sa masenim spektrometrom dat je na **Slici 3**.



Slika 3. Šematski prikaz GCxGC gasnog hromatografa kuplovanog sa masenim spektrometrom

U poređenju sa jednodimenzionalnom gasnom hromatografijom, GCxGC obezbeđuje poboljšanu rezoluciju, manju pozadinsku hemijsku interferenciju i poboljšanu granicu detekcije, posebno u sistemima gde se koristi kriogeni metod sakupljanja H/C, kao rezultat kriogenog efekta zamućenja ili refokusiranja. Zbog poboljšane rezolucije koja je omogućena GCxGC-om, dužina pripreme uzorka je smanjena ili u potpunosti eliminisana. Na ovaj način se izbegava problem gubitka analita tokom pripreme uzorka, što je posebno važno kada je količina uzorka ograničena. Zbog dodatne selektivnosti obezbeđene drugom kolonom i dobrim razdvajanjem pikova, a sa dobro odabranim ortogonalnim mehanizmima razdvajanja, GC×GC omogućava karakterisanje velikog broja jedinjenja u jednoj hromatografskoj analizi. Ova tehnika se uspešno primenjuje za analizu jedinjenja u različitim namirnicama kao što su: biber (86), ulje (87), riba (88), grožđe (89) i med (90).

2.6. Hemometrijske metode

Hemometrija je hemijska disciplina koja koristi matematičke i statističke metode u cilju optimizacije eksperimentalnih uslova i analize skupova podataka kroz obradu osnovnih statističkih parametara, uočavanje odgovarajućih obrazaca prepoznavanja i konstruisanje regresionih modela (91). U cilju određivanja autentičnosti prirodnih proizvoda u smislu njihovog biljnog i geografskog porekla, od hemometrijskih metoda se najčešće koriste metode za diferencijaciju kao što su analiza glavnih komponenata (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) i klasteraska analiza (eng. *Cluster analysis*, CA). Među klasifikacionim tehnikama, linearna diskriminantna analiza (eng. *Linear*

discriminant analysis, LDA) zauzima značajno mesto (92,93). Uzimajući u obzir činjenicu da je med složen prirodni proizvod koji sadrži veliki broj različitih jedinjenja, diferencijaciju i klasifikaciju prema biljnom poreklu je teško izvršiti kada se posmatra samo jedan tip parametara ili jedna klasa jedinjenja, a ne kombinovanje nekoliko grupa parametara. Fizičko-hemijski parametri su dali mnogo bolje klasifikacione rezultate kada se primenjuju samostalno, dok bi sve ostale parametre trebalo kombinovati kako bi se izveli pouzdani zaključci (6). Poslednjih godina, upotreba metode nosećeg vektora (*Support Vector Machine*, SVM) i hibridnih tehnika, kao što je metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom (*eng. Partial Least Square Discriminant Analysis*, PLS-DA) su sve više u upotrebi (94–97).

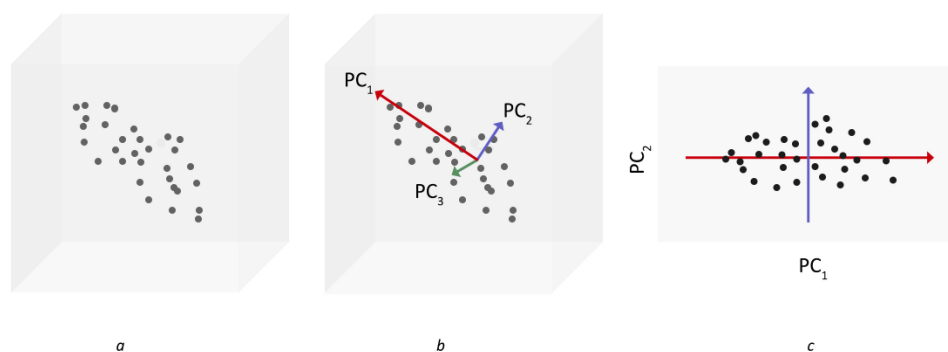
2.6.1. *Kruskal-Wallis* test

Kruskal-Wallis test je neparametrijski test koji se zasniva na rangiranju podataka i poređenju celokupne populacije. Nakon rangiranja redosled vrednosti u transformisanim skupovima biće isti kao i u originalnim skupovima podataka, s tim što nije isključeno da skup koji je imao manju srednju vrednost ili medijanu, nakon rangiranja dobije veće srednje vrednosti ili medijane u odnosu na drugi skup sa kojim se poredi. Nulta hipoteza *Kruskal-Wallis* testa je da poređeni skupovi imaju jednake srednje vrednosti rangiranih podataka (98).

2.6.2. Analiza glavnih komponenti

Termin analiza glavnih komponenti se odnosi na metod analize podataka u cilju dobijanja jednostavnijeg linearnog multivariacionog modela složenih grupa podataka. Analiza glavnih komponenti je multivarijantna metoda za određivanje linearnih latentnih varijabli (komponentata) i može se shvatiti kao metoda pomoću koje se formira novi koordinatni sistem sačinjen od međusobno normalnih latentnih varijabli usmerenih na pravac najvećeg varijabiliteta među podacima. PCA je često prvi korak u analizi multivarijantnih podataka, u cilju otkrivanja obrazaca i odnosa između izmerenih parametara (99).

Svaka glavna komponenta je linearna kombinacija originalnih promenljivih. Nakon dobijanja glavnih komponenti vrši se njihova redukcija, odnosno one se svode na manji broj kao što je prikazano na **Slici 4**.



Slika 4. Nastajanje i redukcija glavnih komponenti

- a) trodimenzionalni set podataka, b) tri ortogonalne glavne komponente koje obuhvataju varijansu, c) projekcija seta podataka PC1 i PC2, odbacujući PC3

Prva glavna komponenta (PC1) predstavlja pravac među varijablama koji na najbolji način odražava relativno rastojanje između objekta i opisuje maksimum varijabiliteta među podacima. Druga (PC2) predstavlja pravac normalan na PC1 kojim se opisuje maksimum preostalog varijabiliteta među podacima. Ostale glavne komponente su normalne na prethodne i njihov pravac pokriva varijanse među podacima projektovane na posmatrani pravac. Ukupan broj glavnih

komponentata jednak je broju varijabli, ali je dovoljno zadržati samo one komponente koje čine značajan procenat ukupne varijanse. Skorovi predstavljaju projekcije vrednosti podataka na latentnu varijablu, odnosno pravac koji se definiše pomoću vektora koeficijenata latentnih varijabli (*eng. loading vector*). Rezultati se mogu koristiti kao ulazni podaci za druge multivarijantne metode, umesto originalnih varijabli (99-103).

Primena PCA na merene veličine ukazuje na sličnosti koje postoje između posmatranih uzoraka, a koje su određene njihovim hemijskim sastavom. U analizi hrane PCA je primenjivana u velikoj meri u cilju određivanja parametara za proveru autentičnosti vina, maslinovog ulja, meda i dr. (104–107).

2.6.3. Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom

Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom (*eng. Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA*) je metoda zasnovana na višestrukoj regresiji i analizi glavnih komponenti, osmišljena šezdesetih godina prošlog veka od strane *Hermana Vold*-a (108). Ova metoda ima nekoliko prednosti u odnosu na višestruku regresiju:

- 1) veliki skup prediktovanih varijabli može biti uključen,
- 2) nekoliko varijabli odgovora mogu se modelovati istovremeno (109).

Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom primenjuje se u cilju klasifikacije uzoraka pri čemu se konstruiše vektor klase za jednu varijablu svake klase i to sa vrednošću 1 ukoliko uzorak pripada ili 0 ukoliko uzorak ne pripada određenoj klasi. Dobijene skrivene varijable vrše razdvajanje klasa, ali ako je broj varijabli mnogo veći od broja uzoraka, onda PLS-DA model može da bude precenjen i da izvrši neodgovarajuće klasifikacije. Da bi se obezbedila pouzdanost PLS-DA modela ispitivani set se deli na kalibracioni set i test set koji ima za cilj proveru dobijenog modela (79).

2.6.4. Nelinearna analiza glavnih komponentata

Cilj linearnog PCA je da se smanji broj m kontinualnih numeričkih varijabli na manji broj p nekorelisanih osnovnih varijabli glavne komponente. Pošto je varijansa koncept koji se odnosi samo na kontinualno numeričke varijable, linearna PCA nije prikladna za analizu varijabli za neuređene (diskretne) kategorije (99).

Nelinearna PCA (*eng. Nonlinear Principal Component Analysis, NPCA*) ima iste ciljeve kao i obična PCA, ali je pogodna za različite tipove podataka (kategorijske i numeričke) koji ne moraju biti linearno zavisni. U nelinearnoj PCA, kategorije gore pomenutih varijabli se dodeljuju numeričkim vrednostima kroz proces koji se naziva optimalna kvantifikacija (takođe se naziva optimalno skaliranje, ili optimalno ocenjivanje). Takve numeričke vrednosti se nazivaju kvantifikacijama kategorija; kategorije kvantifikacija za jednu varijablu zajedno formiraju transformaciju te varijable. Kao kontinuirane numeričke varijable, takve kvantifikovane varijable poseduju varijanse u tradicionalnom smislu. U nelinearnoj PCA optimalni zadatak kvantifikacije i linearna PCA procena modela se izvodi istovremeno, što se postiže minimiziranjem funkcije gubitka najmanjih kvadrata. U aktuelnoj nelinearnoj PCA analizi, procena modela i optimalna kvantifikacija se menjaju korišćenjem algoritma koji konvergira u stacionarnu tačku gde se optimalne kvantifikacije kategorija više ne menjaju. Ako su sve varijable tretirane numerički, ovaj proces dovodi do istog rešenja kao i linearna PCA (110).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Uzorci medljikovaca

Ukupno 64 uzorka medljikovaca prikupljeno je iz primorskog, planinskog i kontinentalnog dela Hrvatske u periodu od 2011. do 2016. godine kao autentičan proizvod iz odgovarajuće sezone. Biljno poreklo uzoraka ustanovljeno je na osnovu informacija dobijenih od pčelara o lokaciji košnica i dostupnosti biljnih vrsta, kao i utvrđenih melisopalinoloških karakteristika koje su potvrđene senzorskim karakteristikama (konzistencija, boja, miris i ukus). Biljno poreklo analiziranih uzoraka kao i broj uzoraka po godinama prikazani su u **Tabeli 1**.

Uzorci su dostavljeni u laboratoriju u staklenoj ambalaži, uz podatke o regionalnom i biljnom poreklu medljikovca, kao i podacima o proizvođaču. Po prijemu u laboratoriju, uzorci su čuvani na temperaturi od 20-22 °C. Neposredno pre analize uzorci su homogenizovani mehaničkim mešanjem u originalnoj ambalaži.

Tabela 1. Biljno poreklo i broj ispitivanih uzoraka medljikovaca

Biljno poreklo (BP)	Godina proizvodnje						Ukupno po BP
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Jela (<i>Abies alba</i> Mill.)	/	/	6	2	3	11	22
Hrast sladun (<i>Quercus frainetto</i> Ten.)	/	/	/	/	2	2	4
Primorski hrast (<i>Quercus ilex</i> L.)	3	5	1	2	2	2	15
Primorski javor (<i>Acer monspessulanum</i> L.)	/	2	/	2	2	/	6
Crnogorica (Conifers)	/	1	1	3	4	8	17
Ukupno po godini	3	8	8	9	13	23	64

3.2. Reagensi i materijali

Acetonitril, mravlja kiselina i sirćetna kiselina (MS čistoće), metanol, dihlormetan (HPLC čistoće), *Folin-Ciocalteu* reagens, hlorovodonična kiselina, azotna kiselina, natrijum-karbonat, kalijum-hlorid, natrijum-hidroksid, natrijum-acetat, etil-acetat i vodonik-peroksid su nabavljeni od firme *Merck (Darmstadt, Germany)*. Kalijum-heksacijanoferat(II), standardi fenolnih jedinjenja (protokatehinska kiselina (**PrA**), eskulin (**Es**), 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (**CQA**), *p*-hidroksi-benzoeva kiselina (**HBA**), gentisinska kiselina (**GA**), *p*-hidroksifenil-sirćetna kiselina (**HPA**), vanilinska kiselina (**VA**), eskuletin (**Ek**), kofeinska kiselina (**CA**), rutin (**Rut**), *p*-kumarinska kiselina (**CouA**), kvercetin 3-*O*-glukozid (**Que-3-glu**), sinapinska kiselina (**SA**), naringin (**Nar**), ferulinska kiselina (**FA**), kvercetin 3-*O*-ramnozid (**Que-3-rha**), koniferil aldehid (**CA**), kvercetin (**Que**), eridiktiole (**Erio**), luteolin (**Lut**), naringenin (**Narn**), apigenin (**Api**), genistein (**Gen**), kempferol (**Kfrl**), pinobanksin (**Pib**), izoramnetin (**Izora**), hrizoeriol (**Chrye**), genkvanin (**Genkw**), hrizin (**Chry**), pinocembrin (**Pin**), kempferid (**Kfrd**), galangin (**Gal**), acacetin (**Aca**), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i cink-acetat su nabavljeni od firme *Sigma-Aldrich (Munich, Germany)*. Standardi šećera (trehaloza (**Tre**), glukoza (**Glu**), fruktoza (**Fru**), melibioza (**Melibi**), saharoza (**Sah**), izomaltoza (**Izomal**), meleziotoza (**Mel**), turanoza (**Tur**), maltoza (**Maltoz**), sorbitol (**Sor**), arabinoza (**Ara**), panoza (**Pan**), maltotrioza (**Mal**) i rafinoza (**Raf**) su nabavljeni od firme *Tokyo Chemical Industry (Zwijndrecht, Belgium)*. Standard glukoze (BCR-657) je nabavljen od firme IRMM (*Geel, Belgium*), a standard kofeina (IAEA-600) od firme IAEA (*Vienna, Austria*). Osnovni rastvor koji sadrži 0,5000 g/L makro elemenata (Al, Ca, Fe, K, Mg, P i S) i semikvantitativni osnovni rastvor koji sadrži 0,0100 g/L elemenata u tragovima nabavljeni su od firme VHG (*Manchester, USA*). Osnovni rastvor koji sadrži 1,000 g/L makro elemenata i elemenata u tragovima nabavljen je od firme *Thermo Fisher Scientific (Kandel, Germany)*. Standard polihlorovanog bifenila (2,3,4-trihlorobifenil) je nabavljen od firme

AccuStandard (New Haven, USA). Ultračista voda (0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ThermoFisher TKA, *Niederelber, Germany*) je korišćena za pripremu standardnih rastvora, slepe probe i uzoraka.

Kertridži za tečno-čvrstu ekstrakciju C18-E korišćeni za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz uzoraka medljikovaca, nabavljeni su od firme *Phenomenex (Torrance, California)*. Špric filteri (13 mm, membrana od PTFE, 0,45 μm) za prečišćavanje uzoraka su nabavljeni od firme *Supelco (Bellefonte, PA)*. Filter papir (*Whatman No. 1*) je nabavljen od firme *Merck (Darmstadt, Germany)*.

3.3. Određivanje fizičko-hemijskih parametara

Fizičko-hemijski parametri su određeni metodama preporučenim od strane IHC-a (5).

3.3.1. Određivanje sadržaja vode

Metoda za određivanje sadržaja vode u medu je indirektna metoda zasnovana na merenju indeksa refrakcije koji se povećava sa povećanjem sadržaja čvrste supstance. Sadržaj vode (ω) se dobija upoređivanjem vrednosti očitnog indeksa refrakcije sa referentnim vrednostima standarda (**Tabela 2**). Vrednosti su dobijene na osnovu grafika negativnog logaritma indeksa refrakcije u funkciji od sadržaja vode koji je određen sušenjem u vakuumu.

Tabela 2. Vrednosti refraktivnog indeksa i sadržaja vode

Sadržaj vode g/100 g	Refraktivni indeks 20°C	Sadržaj vode g/100 g	Refraktivni indeks 20°C	Sadržaj vode g/100 g	Refraktivni indeks 20°C	Sadržaj vode g/100 g	Refraktivni indeks 20°C
13,0	15,044	16,2	14,961	19,4	14,880	22,6	14,800
13,2	15,038	16,4	14,956	19,6	14,875	22,8	14,795
13,4	15,033	16,6	14,951	19,8	14,870	23,0	14,790
13,6	15,028	16,8	14,946	20,0	14,865	23,2	14,785
13,8	15,023	17,0	14,940	20,2	14,860	23,4	14,780
14,0	15,018	17,2	14,935	20,4	14,855	23,6	14,775
14,2	15,012	17,4	14,930	20,6	14,850	23,8	14,770
14,4	15,007	17,6	14,925	20,8	14,845	24,0	14,765
14,6	15,002	17,8	14,920	21,0	14,840	24,2	14,760
14,8	14,997	18,0	14,915	21,2	14,835	24,4	14,755
15,0	14,992	18,2	14,910	21,4	14,830	24,6	14,750
15,2	14,987	18,4	14,905	21,6	14,825	24,8	14,745
15,4	14,982	18,6	14,900	21,8	14,820	25,0	14,740
15,6	14,976	18,8	14,895	22,0	14,815		
15,8	14,971	19,0	14,890	22,2	14,810		
16,0	14,966	19,2	14,885	22,4	14,805		

Sadržaj vode u medljikovcu određen je merenjem indeksa refrakcije pomoću *Abbe*-ovog refraktometra (ATAGO 1T *Abbe* refraktometrom, *Tokio, Japan*). Za svaki uzorak izmerena je vrednost indeksa refrakcije dva puta i u daljoj obradi rezultata korišćena je srednja vrednost.

3.3.2. Određivanje električne provodljivosti

Odmerena je količina uzorka koja je ekvivalentna sa 20,0 g anhidrovanog medljikovca i rastvorena u ultračistoj vodi. Pripremljeni rastvor je kvantitativno prenet u normalni sud od 25 mL i dopunjen do crte ultračistom vodom. Rastvor je prenet u čašu i konduktometrijska ćelija je uronjena u rastvor uzorka. Vrednost je očitana nakon što se temperatura ustalila.

Usled nedostatka termostatisanog vodenog kupatila, merenje je vršeno na različitim temperaturama. Korišćen je korekcioni faktor za izračunavanje vrednosti na 20 °C i to:

za temperature iznad 20 °C – oduzeto je 3,2% od vrednosti za svaki °C

za temperature ispod 20 °C – dodato je 3,2% od vrednosti za svaki °C.

3.3.3. Određivanje specifične optičke rotacije

Odmereno je 5 g medljikovca (koji odgovaraju masi od 10 g suve supstance), rastvoreno u ultračistoj vodi i preneto u normalni sud od 25 mL. Dodato je 10 mL *Carrez* I reagensa, a zatim 10 mL *Carrez* II reagensa. Normalni sud je dopunjen do crte i ostavljen u mraku 24 sata. Sutradan, rastvor je filtriran i njime je napunjena polarimetrijska cev dužine 2 dm i očitana je ugao rotacije.

Rastvor po *Carrez*-u I: 150 g kalijum-heksacijanoferata(II) ($K_4(Fe(CN)_6) \times 3H_2O$) rastvori se u ultračistoj vodi i dopuni ultračistom vodom do 1000 mL, u normalnom sudu od 1000 mL;

Rastvor po *Carrez*-u II: 230 g cink-acetata ($Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$) rastvori se u ultračistoj vodi i dopuni vodom do 1000 mL, u normalnom sudu od 1000 mL.

Neophodno je da ispitivani rastvori budu bistri i bezbojni što se postiže dodatkom reagenasa po *Carrez*-u.

3.3.4. Određivanje kiselosti

Količina od 5 g uzorka medljikovca rastvorena je u 40 mL ultračiste vode. Dobijenom rastvoru je izmerena početna pH vrednost. Rastvor je potom titrovao 0,5 $\frac{mol}{dm^3}$ rastvorom NaOH do pH 8,3, nakon čega je dodato 5 mL 0,05 $\frac{mol}{dm^3}$ rastvora NaOH i vršena je retitracija 0,05 $\frac{mol}{dm^3}$ rastvorom HCl do pH 8,3.

Izračunavanje rezultata vrši se pomoću izraza:

$$\text{Slobodna kiselost} = \frac{(V_{NaOH} - V_{blank}) \cdot c_{NaOH}}{m_{uzorka}}$$

$$\text{Laktonska kiselost} = \frac{(5,00 - V_{HCl}) \cdot c_{NaOH}}{m_{uzorka}}$$

$$\text{Ukupna kiselost} = \text{Slobodna kiselost} + \text{Laktonska kiselost}$$

gde je: V – zapremina, c – koncentracija, m – masa.

3.4. Analiza fenolnih jedinjenja

3.4.1. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja

Za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz uzoraka medljikovaca korišćena je metoda čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE) koja je već opisana u literaturi (66). Uzorak medljikovca (5 g) rastvoren je u 5 mL ultračiste vode, a zatim je pH vrednost rastvora podešena na 2 korišćenjem 0,2% hlorovodonične kiseline. Uzorci su po potrebi homogenizovani u ultrazvučnom kupatilu. Dobijeni rastvor je zatim profiltriran kroz filter-papir radi uklanjanja saća i drugih čvrstih čestica. Pre nanošenja uzorka izvršeno je kondicioniranje kertridža za SPE propuštanjem 3 mL acetonitrila i ukupno 9 mL (dva puta po 4,5 mL) 0,2% hlorovodonične kiseline. Kroz tako kondicionirani kertridž je propušten filtrat, a zatim su šećeri i drugi polarni sastojci medljikovca uklonjeni ispiranjem sa ukupno 15 mL (tri puta po 5 mL) zakišeljene vode (pH = 2). Adsorbovana fenolna jedinjenja su eluirana sa 1,0 mL acetonitrila. Ovako pripremljeni ekstrakti čuvani su u staklenim vijalama u frižideru. Neposredno pre kvalitativne i kvantitativne analize ekstrakti su filtrirani kroz 0,45 μm PTFE membranske filtere.

3.4.2. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja

Razdvajanje i identifikacija fenolnih jedinjenja izvršena je pomoću tačne hromatografije sa hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije pri čemu je korišćena *Synchronis C18* kolona ($100 \times 2,1$ mm, $1,7 \mu\text{m}$ veličina čestica). Mobilna faza se sastojala od (A) vode, 0,1% sirćetne kiseline i (B) 100% acetonitrila, koji su eluirani u sledećem gradijentu koncentracija: 0,0-1,0 min 5% B, 1,0 – 16,0 min od 5% do 95% B, 16,0 - 16,1 min od 95% do 5% B, zatim 5% B 4 min. Protok je bio 0,300 mL/min, a injekciona zapremina je bila 5 μL . Snimanje masenih spektara je vršeno u negativnom jonizacionom modu, a parametri jonskog izvora su bili podešeni kao u radu *Gašić i saradnici* (66). Za kontrolu instrumenta, prikupljanje i analizu podataka korišćen je *Xcalibur* softver (verzija 2.1, *Thermo Fisher, Bremen, Germany*). Fenolna jedinjenja su identifikovana na osnovu masenih spektara, tačne molekulske mase, karakteristične fragmentacije, kao i na osnovu karakterističnih retencionih vremena. Informacija o molekulskoj formuli dobijena je snimanjem tačne mase molekuskog jona ($[\text{M}-\text{H}]^-$) nepoznatog jedinjenja, dok je za razjašnjavanje strukture tog nepoznatog jedinjenja korišćena MS^2 fragmentacija. Identifikacija pojedinačnih pikova na hromatogramu izvršena je upoređivanjem njihovih masa sa masama iz spektara NIST (*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA*) baze podataka, primenom *ChromSquare* softvera (verzija 2.1).

3.4.3. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja

Napravljen je osnovni metanolni rastvor smeše fenolnih standarda (**PrA, Es, CQA, HBA, GA, HPA, VA, Ek, CA, Rut, CouA, Que-3-glu, SA, Nar, FA, Que-3-rha, CA, Que, Erio, Lut, Narn, Api, Gen, Kfrl, Pib, Izora, Chrye, Genkw, Chry, Pin, Kfrd, Gal i Aca**) koncentracije 10 mg/L. Razblaživanjem osnovnog rastvora dobijeni su radni rastvori u koncentracijama od 0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500, 0,750 i 1,000 mg/L. Kalibracione krive zavisnosti površine pika od koncentracije su pokazale dobru linearnost, sa vrednostima R^2 većim od 0,99. Razdvajanje i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima medljikovaca urađena je pomoću *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* sistema opremljenog sa DAD detektorom koji je povezan sa *TSQ Quantum Access Max* masenim spektrometrom sa detektorom sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (UHPLC-DAD-MS/MS). Specifikacija analitičke kolone, mobilne faze, gradijentnog eluiranja, kao i drugih parametara UHPLC sistema su isti kao u prethodnom odeljku o kvalitativnoj analizi fenolnih jedinjenja. Parametri *TSQ Quantum Access Max* masenog spektrometra opremljenog zagrejanom elektrosprej jonizacijom (HESI-II) bili su kao što je ranije opisano u radu *Gašić i saradnici* (66). Fenolna jedinjenja su identifikovana direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima. Količina svakog jedinjenja određena je metodom najmanjih kvadrata. Sadržaj jedinjenja izražen je u mg/kg meda.

Granica detekcije (GD) određivanja pojedinog analita izračunata je kao koncentracija analita koja proizvodi signal koji je za tri standardne devijacije signala slepe probe veći od osnovnog signala iste. Drugim rečima *Signal koji odgovara granici detekcije* = $y_B + 3s_B$, gde je y_B signal slepe probe, odnosno s_B standardna devijacija istog. U slučaju linearne regresije umesto signala slepe probe može se uzeti vrednost odsečka, odnosno umesto standardne devijacije slepe probe može poslužiti standardna greška modela. U slučaju granice kvantifikacije (GK) umesto faktora množenja tri, kao kriterijum je uzeto deset standardnih devijacija slepe probe.

U konačnom obliku GD i GK se definišu pomoću regresionih parametara na sledeći način:

$$GD = \frac{3s_{y/x}}{b}$$
$$GK = \frac{10s_{y/x}}{b}$$

gde je $s_{y/x}$ standardna greška modela, dok je b nagib kalibracione krive.

Vrednosti standardnih devijacija modela i nagiba su dobijene iz kalibracionih kriva kreiranih u *MS Excel*-u. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije, kao i vrednosti GD i GK za svaki standard fenola korišćen za kvantifikaciju dati su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije, vrednosti za GD i GK za svaki standard fenola

Jedinjenje	Nagib ($\times 10^5$)	r	GD (mg/L)	GK (mg/L)
PrA	21,68	0,9968	0,03	0,11
CQA	23,62	0,9941	0,46	1,54
HBA	40,41	0,9975	0,03	0,10
HPA	4,78	0,9982	0,20	0,88
CA	48,52	0,9946	0,04	0,15
VA	8,87	0,9977	0,03	0,10
Rut	45,28	0,9890	0,06	0,22
CouA	82,52	0,9966	0,09	0,30
Nar	0,93	0,9972	0,03	0,10
FA	50,67	0,9977	0,03	0,11
SA	0,85	0,9917	0,05	0,19
Que-3-rha	27,26	0,9986	0,20	0,77
Erio	45,26	0,9960	0,03	0,13
Lut	35,07	0,9986	0,20	0,77
Que	3,49	0,9953	0,04	0,14
Narn	62,22	0,9987	0,20	0,73
Api	45,03	0,9981	0,20	0,90
Gen	0,63	0,9977	0,20	0,99
Kfrl	3,22	0,9985	0,20	0,81
Chry	8,02	0,9990	0,10	0,64
Pin	13,00	0,9985	0,20	0,81
Aca	179,46	0,9931	0,05	0,17
Genkw	179,81	0,9968	0,03	0,11
Gal	4,52	0,9983	0,20	0,84
Kfrd	61,84	0,9989	0,20	0,68

3.4.4. Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

Uzorak medljikovca (2,5 g) rastvoren je u 25 mL ultračiste vode, a zatim je dobijeni rastvor filtriran kroz 0,45 μm PTFE membranske filtere. U filtratu je određivan sadržaj ukupnih fenola (*Total Phenolic Content* - TPC), kao i antioksidativna aktivnost (*Radical Scavenging Activity* - RSA).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima medljikovca određen je *Folin-Ciocalteu* metodom uz modifikaciju procedure koju su opisali *Singleton* i saradnici (111). U 0,5 mL prethodno pripremljenog ekstrakta medljikovca dodato je 2,5 mL 10% *Folin-Ciocalteu* reagensa. Po dodatku reagensa, rastvor je promućkan i dodato je 2,0 mL 7,5% rastvora natrijum-karbonata. Nakon toga rastvor je inkubiran dva sata u mraku. Apsorbancija rastvora merena je na 765 nm na spektrofotometru Cintra 6 (*GBC Scientific Equipment Ltd., Dandenong, Victoria, Australia*). Napravljen je osnovni rastvor galne kiseline koncentracije $1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$, a zatim je razblaživanjem osnovnog rastvora napravljena serija standardnih rastvora koncentracije $20 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$, $40 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$, $60 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$, $80 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ i $100 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$. Vrednost TPC je izražena kao mg ekvivalenta galne kiseline (mg GAE) po kg meda.

Za određivanje relativne antioksidativne aktivnosti medljikovca korišćena je modifikovana procedura od *Wang* i saradnici (28). Pripremljen je $71 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$ metanolni rastvor DPPH. Apsorbancija sveže spremljenog rastvora iznosila je 0,826. U epruvetu je dodato 0,1 mL prethodno pripremljenog ekstrakta meda i 3 mL rastvora DPPH. Rastvor je inkubiran sat vremena u mraku i nakon tog vremena mereno je smanjenje apsorbancije na 517 nm na spektrofotometru.

Relativna antioksidativna aktivnost je izračunata po jednačini:

$$RSA = \frac{\bar{A}_o - \bar{A}_s}{\bar{A}_o} \cdot 100 \%$$

gde je A_0 apsorbanacija metanolnog rastvora DPPH; A_s je apsorbanacija rastvora uzoraka u prisustvu DPPH. Troloks je korišćen kao standard preko koga je izražena vrednost antioksidativne aktivnosti. Napravljen je osnovni rastvor troloksa koncentracije $1000 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$, a zatim je razblaživanjem osnovnog rastvora napravljena serija standardnih rastvora koncentracije 100, 200, 300, 400, 500, i $600 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dm}^3}$. Kalibraciona kriva predstavlja funkciju procenta inhibicije DPPH radikalom. Rezultati su prikazani kao milimoli troloks ekvivalenata po kg meda (mmol TE/kg).

Ciklična voltametrijska merenja izvršena su korišćenjem elektrohemijskog sistema *CH Instruments*, Model CHI 760b (*Austin, TX, USA*) sa odgovarajućim softverom (*CHI software*, verzija 6.17). Antioksidativna aktivnost medljikovca određena je procedurom koju su razvili Lugonja i saradnici (112). Rastvoreno je 1 g uzorka medljikovca u 10 mL kalijum-hlorida koncentracije $0,1 \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$. Čelija je bila opremljena platinskom elektrodom kao pomoćnom, Ag/AgCl kao referentnom elektrodom i elektrodom od staklastog ugljenika kao radnom elektrodom. Snimanje cikličnih voltamograma je izvršeno u opsegu potencijala od -0,2 do 1,2 V i potencijali su dati prema Ag/AgCl referentnoj elektrodi. Sva merenja su urađena na sobnoj temperaturi od 25 ± 1 °C.

3.5. Analiza šećera primenom visokoefikasne jonske hromatografije

3.5.1. Priprema uzoraka

Uzorci medljikovaca (0,25 g svakog) su rastvoreni u 100 mL ultračiste vode i 1 mL tog rastvora je razblažen ultračistom vodom deset puta. Rastvor je zatim filtriran kroz $0,45 \mu\text{m}$ PTFE membranski filter i u filtratu je određivan sadržaj ugljenih hidrata.

3.5.2. Jonska hromatografija

Ugljeni hidrati su razdvojeni na *CarboPac PA100* anjon-izmenjivačkoj koloni (4×250 mm) (*Dionex, Sunnyvale, CA, USA*) na 30 °C. Svaki uzorak ($25 \mu\text{L}$) je injektovan sa ICS AS-DV 50 autosamplerom (*Dionex, Sunnyvale, CA, USA*). *CarboPac PA100 Guard* kolona (4×50 mm) je korišćena kao pretkolona za dodatno uklanjanje nečistoća iz uzoraka medljikovaca. Mobilna faza se sastojala od $600 \frac{\text{mmol}}{\text{dm}^3}$ natrijum-hidroksida (eluent A), $500 \frac{\text{mmol}}{\text{dm}^3}$ natrijum-acetata (eluent B) i ultračiste vode (eluent C) (113). Kolona je prvo ekvilibrisana 30 min sa 15% eluenta A i 85% eluenta C. Linearni gradijent je bio sledeći (brzina protoka, 0,7 mL/min): 0 - 5 min, 15% A, 85% C; 5,0 - 5,1 min, 15% A, 2% B, 83% C; 5,1 - 12,0 min, 15% A, 2% B, 83% C; 12,0 - 12,1 min, 15% A, 4% B, 81% C; 12,1 - 20,0 min 15% A, 4% B, 81% C; 20,0 - 20,1 min 20% A, 20% B 60% C; 20,1 - 38,0 min 20% A, 20% B 60% C. Zbog visokog sadržaja **Fru** i **Glu**, uzorak je razblažen 1:25000 za kvantifikaciju **Glu** i **Fru**, i 1:250 za preostale šećere. Za detekciju šećera u uzorcima meda korišćen je pulsnoamperometrijski detektor: elektrohemijaska ćelija sa podesivim potencijalom, Ag/AgCl referentna elektroda i Au radna elektroda. Softverski paket *Chromleon* (verzija 6.80) je korišćen za kontrolu instrumenta, snimanje i analizu podataka. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r), kao i vrednosti GD i GK za svaki standard korišćen za kvantifikaciju dati su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r), vrednosti za GD i GK za svaki standard šećera

Jedinjenje	Nagib	r	GD (mg/L)	GK (mg/L)
Sor	3,201	0,9983	0,028	0,093
Tre	2,232	0,9981	0,052	0,171
Ara	5,006	0,9974	0,026	0,087
Glu	4,602	0,9982	0,040	0,132
Fru	2,611	0,9970	0,069	0,229
Melibi	3,691	0,9981	0,030	0,097
Izomal	2,702	0,9987	0,031	0,101
Sah	1,370	0,9975	0,042	0,139
Mel	0,540	0,9997	0,052	0,171
Tur	1,015	0,9976	0,041	0,134
Raf	1,863	0,9967	0,149	0,448
Maltoz	2,175	0,9979	0,038	0,124
Pan	2,336	0,9981	0,117	0,387
Mal	0,866	0,9971	0,145	0,478

3.6. Odnos stabilnih izotopa ugljenika

3.6.1. Izolovanje proteina

Proteini iz medljikovaca su izolovani po AOAC standardnoj metodi 998.12 (1999) (114). U plastičnu kivetu za centrifugiranje od 50 mL odmereno je od 10 g do 12 g meda. U svaku probu dodato je 4 mL ultračiste vode, a zatim dobro promešano. Ukupno 2 mL 10% $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je pomešano sa 2 mL $0,335 \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$ sumporne kiseline, a zatim je dodato u kivetu u kojoj se nalazi odmereni med. Sadržaj u kiveti je dobro promućkan. Kivete su uronjene u vodeno kupatilo na 80°C i zagrevane do pojave flokula. Ukoliko nije došlo do izdvajanja flokula, dodato je još 2 mL $0,335 \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$ sumporne kiseline, a potom su kivete ponovo zagrevane. Zatim je kiveta napunjena ultračistom vodom i centrifugirana 5 minuta na 1500 rpm. Rastvor je nakon centrifugiranja odliven. Zatim je vršeno ispiranje, a postupak je ponovljen 5 puta sa po 50 mL ultračiste vode. Proteini su zatim osušeni na 75°C i po 1 mg proteina je prebačen u ependorf kivete.

3.6.2. Metoda masene spektrometrije odnosa izotopa

Odnos stabilnih izotopa ugljenika u uzorcima medljikovca je određen pomoću EA-IRMS, koristeći Delta V Plus IRMS (*Thermo Electron Corporation, Beverly, USA*) kuplovan sa Flash 2000 elementalnim analizatorom (*Thermo Electron Corporation*) pomoću ConFlo IV interfejsa. EA-IRMS analiza je urađena po AOAC standardnoj metodi 998.12 (1999) (114) uz izvesne modifikacije kod podešavanja za EA. Približno 0,2–0,6 mg medljikovca i izolovanih proteina je odmereno u kalajnim kapsulama ($5 \times 3,5$ mm). Kapsule su zatim presovane kako bi se isterao vazduh iz uzorka. Nakon toga, pripremljeni uzorci su preneti u EA sa autosemplerom za merenje odnosa stabilnih izotopa ugljenika u medljikovcima i u proteinima ekstrahovanim iz medljikovaca. Podešavanja za EA su: oksidacioni/redukcioni reaktor 1020°C ; nosač 100 mL/min; O_2 250 mL/min; kašnjenje automatskog uzorkovanja 16 s. Mereni su signali na m/z 44, 45 i 46 (molekulski jon M^+) koji potiču od CO_2 nastalog sagorevanjem uzorka.

3.7. ICP-OES i ICP-MS analiza elemenata

U cilju analiziranja mineralnog sastava 0,5 g uzorka medljikovca tretirano je smešom 7 mL $15,8 \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$ HNO_3 i 1 mL $8,8 \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$ H_2O_2 i prebačeno u PTFE viala za digestiju. Nakon mikrotalasne digestije (6h, 85°C , ETHOS 1; *Milestone, Bergamo, Italy*) uzorci su razblaženi ultračistom vodom do konačne zapremine od 15 mL.

Indukovano spregnuta plazma sa optički emisionim spektrometrom, ICP-OES (model 6500 Duo, *Thermo Scientific, United Kingdom*), je korišćena za određivanje makro elemenata (Al, Ca, Fe, K, Mg, P i S). Osnovni rastvor koji sadrži 0,5000 g/L makro elemenata (Al, Ca, Fe, K, Mg, P i S) korišćen je za pripremu serije standardnih rastvora. Celokupan sistem instrumenta je kontrolisan pomoću *Iteva* softvera (verzija 2.8.0.97). Eksperimentalni uslovi primenjeni za analizu na ICP-OES-u su dati u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Eksperimentalni uslovi za ICP-OES

Raspršivač	Koncentrično
Komora za prskanje	Ciklonski
Rf snaga (W)	1150
Brzina glavnog protoka argona (L/min)	12
Brzina pomoćnog protoka argona (L/min)	0,5
Brzina protoka argona u raspršivaču (L/min)	0,5
Brzina protoka uzorka (mL/min)	1,0
Detektor	CID86
Izabrane talasne dužine (nm)	Al (308,2); Ca (422,6); Fe (238,2); K (769,8); Mg (280,2); P (178,2); S (182,0)

Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r), kao i vrednosti GD i GK za svaki element određen pomoću ICP-OES dati su u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r), vrednosti za GD i GK za svaki element određen pomoću ICP-OES

Element	Nagib	r	GD ($\mu\text{g/L}$)	GK ($\mu\text{g/L}$)
Al	2,935	0,9996	3,652	12,174
Ca	41,296	0,9942	0,449	1,497
Fe	13,376	0,9994	0,383	1,278
K	0,110	0,9996	112,033	373,444
Mg	203,790	0,9981	0,034	0,114
S	0,119	0,9999	5,210	17,369
P	0,135	0,9999	3,934	13,115

Indukovano spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom ICP-MS (iCAP Q, *Thermo Scientific x series 2*) je korišćena za određivanje elemenata u tragovima (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Sr i Zn). Osnovni rastvor koji sadrži 1,000 g/L makro elemenata i elemenata u tragovima i semikvantitativni osnovni rastvor koji sadrži 0,0100 g/L elemenata u tragovima korišćeni su za pripremu serije standardnih rasvora. Ceo sistem ovog instrumenta je kontrolisan sa *Qtegra* softverom (verzija 2.8.3170.392). Eksperimentalni uslovi primenjeni za analizu na ICP-MS-u i izmereni izotopi dati su u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Eksperimentalni uslovi za ICP-MS

Rf snaga (W)	1548
Protok gasa (L/min)	13,9; 1,09; 0,8
Vreme snimanja	3 x 50s
Broj ponavljanja	3
Vreme zadržavanja (ns)	10
Režim detektora	Pulsni
Izmereni izotopi	⁷⁵ As, ¹³⁷ Ba, ¹¹¹ Cd, ⁵⁹ Co, ⁵³ Cr, ⁶⁵ Cu ²⁰² Hg, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ²⁰⁷ Pb, ⁸² Se, ⁸⁸ Sr, ⁶⁶ Zn

Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r), kao i vrednosti GD i GK za svaki element određen pomoću ICP-MS dati su u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Parametar linearnog modela, koeficijent korelacije (r), vrednosti za GD i GK za svaki element određen pomoću ICP-MS

Element	Nagib ($\times 10^3$)	r	GD ($\mu\text{g/L}$)	GK ($\mu\text{g/L}$)
⁷⁵ As	14,535	0,9999	0,019	0,065
¹³⁷ Ba	40,054	0,9996	1,564	5,163
¹¹¹ Cd	27,045	0,9999	0,078	0,261
⁵⁹ Co	100,603	0,9999	0,042	0,141
⁵³ Cr	8,841	0,9999	0,428	1,415
⁶⁵ Cu	23,953	0,9997	0,751	2,479
²⁰² Hg	34,296	0,9993	0,112	0,372
⁵⁵ Mn	128,146	0,9999	0,316	1,045
⁶⁰ Ni	21,613	0,9999	0,033	0,111
²⁰⁷ Pb	93,454	0,9956	2,863	9,450
⁸² Se	1,887	1,0000	0,165	0,546
⁸⁸ Sr	199,025	0,9999	0,313	1,035
⁶⁶ Zn	17,200	0,9996	0,654	2,161

3.8. Analiza isparljivih komponenti primenom dvodimenzionalne gasne hromatografije

3.8.1. Priprema uzoraka

Odmereno je 20 g uzorka medljikovca i rastvoreno u 100 mL ultračiste vode. Zatim je u rastvor dodato 1,5 g anhidrovanog magnezijum-sulfata i 40 mL metilen-hlorida. Uzorak je ultrazvučno sonifikovan u trajanju od 30 minuta. Nakon tog vremena organski i vodeni sloj su odvojeni i vršena je reekstrakcija dva puta sa po 25 mL metilen-hlorida. Organski slojevi su sakupljeni i prebačeni u erlenmajer, a u rastvor je zatim dodato 3,0 g anhidrovanog magnezijum-sulfata. Posle deset minuta rastvor je proceđen i uparen na vakuum uparivaču.

3.8.2. Dvodimezionalna gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom

U cilju detekcije izolovanih isparljivih komponenti iz meda, dobijeni ekstrakti su rastvoreni u 4 mL predestilovanog metilen-hlorida i dodato im je po 10 μL standarda 2,3,4-trihloro bifenila, a zatim su analizirani primenom sveobuhvatne dvodimenzionalne gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom - GC \times GC-MS (GCMS-QP2010 *Ultra*, Shimadzo, Kyoto, Japan i GC \times GC modulatora, Zoex). Napolarna kolona RtxR-1 (RESTEK, CrossbondR 100% dimetil polisiloksan, promera 30 m \times 0,25 mm, debljine 0,25 μm) i srednje polarna BPX50 (SGE Analytical Science, promera 2,6 m \times 0,1 mm, debljine 0,25 μm) su povezane GC \times GC modulatorom kao prva i druga kapilarna kolona navedenim redom. Period termalne modulacije iznosio je 6 sekundi. GC \times GC-MS hromatogrami analizirani su primenom programa *ChromSquare* (verzija 2.1).

3.9. Statistička obrada podataka

Statistička analiza obuhvatala je određivanje parametara deskriptivne statistike, *Kruskal-Wallis* test, PCA, PLS-DA i NPCA.

Kruskal-Wallis analiza je sprovedena pomoću demo verzije NCSS statističkog softvera (115). Deskriptivna statistika je sprovedena korišćenjem programskog paketa za statističku obradu podataka *Analysis toolpacka (Data analysis)* u okviru *Microsoft Office Excel*-a. Analiza glavnih komponenata i PLS-DA izvedene su korišćenjem PLS_Toolbox statističkog paketa (Eigenvectors Inc. v. 5.7) u okviru MATLAB verzije 7.4.0.287 (R2007a) (*MathWorks INC, Natick, MA, USA*). Svi podaci su pre

multivarijantne analize podataka autoskalirani (centrirani u odnosu na srednju vrednost i skalirani na jediničnu vrednost standardne devijacije), kako bi se sprečio uticaj dominantnih komponenti u konačnom modelu u odnosu na komponente koje su prisutne u mnogo manjim količinama. Broj komponenti u PCA modelu je izabran prema *Kaiser* kriterijumu i zadržani su samo faktori sa svojstvenim vrednostima većim od 1. Rezultati PCA prikazani su kroz parametre modela (udeo pojedinačnih glavnih komponentata u ukupnom modelu), kao i grafike uzajamne projekcije skorova i odgovarajućih koeficijenata latentnih varijabli.

Metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom je sprovedena pomoću SIMPLS algoritma kod kojeg PLS faktori predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih varijabli formiranih uz favorizovanje kriterijuma kovarijantnosti. Validacija PLS-DA modela izvedena je korišćenjem *Venetian blinds* procedure. Kvalitet modela je procenjen na osnovu sledećih parametara: 1) R^2_{cal} , koeficijent determinacije modela koji se odnosi na kalibracioni set, i R^2_{CV} , koeficijent determinacije modela koji je rezultat unakrsne validacije - ove dve vrednosti bi trebalo da budu što je moguće veće, i 2) *RMSEC* (*Root Mean Square Errors of Calibration*), koren srednjeg kvadratnog odstupanja rezultata kalibracionog seta, i *RMSECV* (*Root Mean Square Errors of Cross-Validation*), koren srednjeg kvadratnog odstupanja koji je rezultat unakrsne validacije - ove dve vrednosti bi trebalo da budu što niže i sa najmanjom razlikom između njih. Broj latentnih varijabli je izabran prema minimalnoj vrednosti *RMSECV*. Sadržaj fenolnih jedinjenja i elemenata, kao i parametri odnosa izotopa ugljenika, korišćeni su kao ulazni podaci za PLS-DA model.

Nelinearna analiza glavnih komponentata izvršena je primenom statističkog paketa SPSS (IBM SPSS Statistics 20) koji sadrži program CATPCA (*Categorical Principal Component Analysis*). Pomenuti tip PCA se primenjuje na kategoričke varijable koje međusobno nisu linearno povezane. U ovom radu, NPCA je primenjena na podatke dobijene dvodimenzionalnom gasnom hromatografijom. Identifikovana jedinjenja su kodirana kao nominalne varijable, svakoj kategoriji je dodeljen određen proizvoljan broj koji nema pravu numeričku vrednost i ne ukazuje na relativan odnos dve varijable. Jedinjenju koje je detektovano u uzorku dodeljena je kategorija 1, dok je jedinjenje koje nije bilo prisutno u uzorku označeno sa kategorijom 0.

4. NAŠI RADOVI

U ovom radu određivan je fitohemijski profil u uzorcima medljikovca od jele (*Abies alba*), primorskog hrasta (*Quercus ilex*), hrasta sladuna (*Quercus frainetto*), primorskog javora (*Acer monspessulanum*) i crnogorice (familija Pinaceae).

Hrast sladun i primorski hrast su biljne vrste koje pripadaju rodu *Quercus*, familiji Fagaceae. Primorski hrast je autohtona vrsta koja raste u Dalmaciji, Istri i na ostrvima Hrvatskog primorja, dok hrast sladun raste pretežno u Slavoniji. Primorski javor je biljna vrsta koja pripada rodu *Acer*, familiji Sapindaceae i raste u primorskim predelima, dok crnogorica obuhvata nekoliko biljnih vrsta i to uglavnom vrste iz familije Pinaceae, rodovi *Abies*, *Pinus*, *Picea* i *Cedrus* (116). Vrsta *Abies alba* je jedina autohtona vrsta jele u Hrvatskoj, dok druge vrste jela uglavnom rastu u umerenim oblastima Evrope, Azije i Severne Amerike.

Uzorci medljikovca od hrasta sladuna su prikupljeni iz Slavonije gde je najzastupljeni tip zemljišta „černoziem“ koji karakteriše kvalitetan humus bogat solima kalcijuma (117). Primorski hrast i primorski javor su vrste karakteristične za jadransku regiju koja uglavnom ima kraški karakter, nastao rastvaranjem rastvorljivih stena poput dolomita i gipsa. Zbog akrizolnog tipa tla, planinski region pokriven je uglavnom jelom i ostalim četinarima (117).

Radi uspostavljanja jasnih kriterijuma za diferencijaciju i klasifikaciju ispitivanih pet biljnih vrsta medljikovca određeni su fizičko-hemijski parametri (sadržaj vode, električna provodljivost, specifična optička rotacija, slobodna, laktonska i ukupna kiselost i pH vrednost), šećerni profil, fenolna jedinjenja, isparljiva jedinjenja, elementalni sastav i urađena je analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika. Dobijeni kvantitativni i kvalitativni podaci su zatim upotrebljeni za utvrđivanje veze između određenih hemijskih karakteristika medljikovca i njihovog biljnog porekla koristeći metode multivarijantne analize.

4.1. Fizičko-hemijski parametri

Sadržaj vode, električna provodljivost, specifična optička rotacija, slobodna, laktonska i ukupna kiselost, pH vrednost i sadržaj HMF-a spadaju u fizičko-hemijske parametre koji se koriste za procenu kvaliteta meda. Granične vrednosti pomenutih parametara regulisane su Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela (1). S druge strane, električna provodljivost i specifična optička rotacija se najčešće koriste i kao glavni parametri za razlikovanje cvetnog meda od medljikovca (6). U **Tabeli 9** prikazane su vrednosti fizičko-hemijskih parametara (sadržaj vode (ω), električna provodljivost (EP), pH, specifična optička rotacija (SR), slobodna kiselost (SK), laktonska kiselina (LK) i ukupna kiselost (UK)) pet biljnih vrsta medljikovca date kroz parametre deskriptivne statistike (srednja vrednost, medijana, standardna devijacija i opseg).

4.1.1. Sadržaj vode

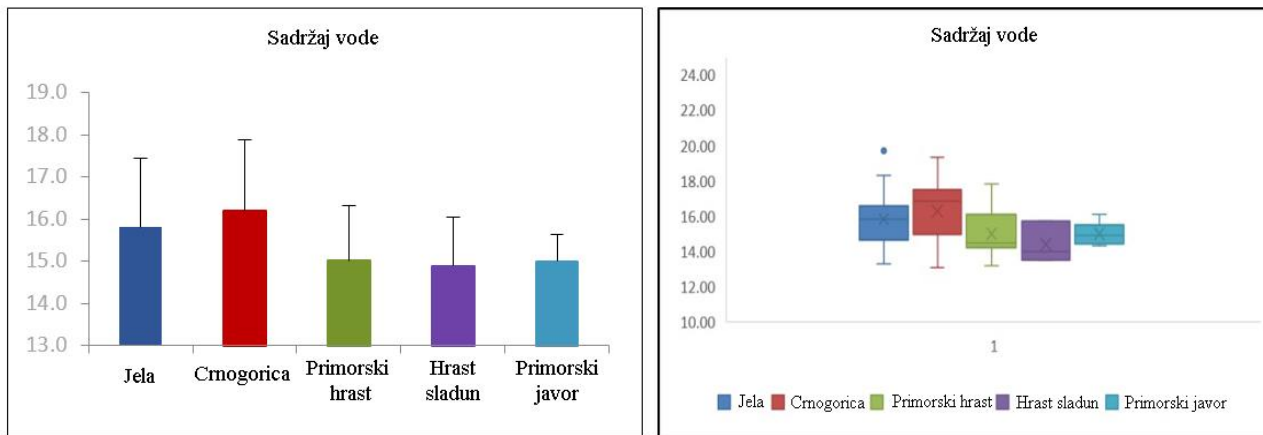
Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela (1), med koji se stavlja u promet ne sme imati sadržaj vode veći od 20%. Istu vrednost propisuju Evropska direktiva (9).

Svi uzorci ispitivanih medljikovca ispunjavaju kriterijum po gore navedenim pravilnicima i imaju sadržaj vode koji je manji od 20%. Na **Slici 5**, dat je grafički prikaz sadržaja vode u uzorcima medljikovca od jele, crnogorice, primorskog hrasta, hrasta sladuna i primorskog javora. Najniža vrednost zapažena je u uzorcima medljikovca od hrasta sladuna (14,9), a najviša u medljikovcu od crnogorice (16,2) (**Tabela 9, Slika 5**). Takođe, varijabilitet među podacima je mali, a najizraženiji je kod uzoraka medljikovca od crnogorice (**Slika 5b**).

Poređenjem rezultata sa onim dobijenim u drugim studijama, utvrđena je sličnost u sadržaju vode kako sa drugim vrstama medljikovca, tako i sa različitim vrstama cvetnog meda. Rezultati dobijeni u evropskim studijama ukazuju na sadržaj vode u uzorcima medljikovca i cvetnog meda iz

Severozapadne Španije od 16,7%, odnosno 17,5%, redom (53), u makedonskom i hrvatskom medljikovcu 16,1% (12), u cvetnom medu iz Rumunije 17,7% (118), u cvetnom medu iz različitih regija Turske 15,3% i 16,9% (119), dok u italijanskom cvetnom medu 16,3% (120). Slični rezultati dobijeni su i za cvetni med iz Argentine (16,2%) (121), Jemena (16,28%), Saudijske Arabije (15,64%) i Kašmira (14,73%), dok Egipatski cvetni med ima viši sadržaj vode (18,32%) (122).

Sadržaj vode u medu zavisi od velikog broja faktora, pre svega od tehnike pčelarenja, stepena zrelosti meda dostignutog u saću i klimatskih uslova u toku sezone (15). Većina autora ovaj parametar ne dovodi u vezu sa biljnim poreklom meda, što potvrđuju i rezultati našeg rada.

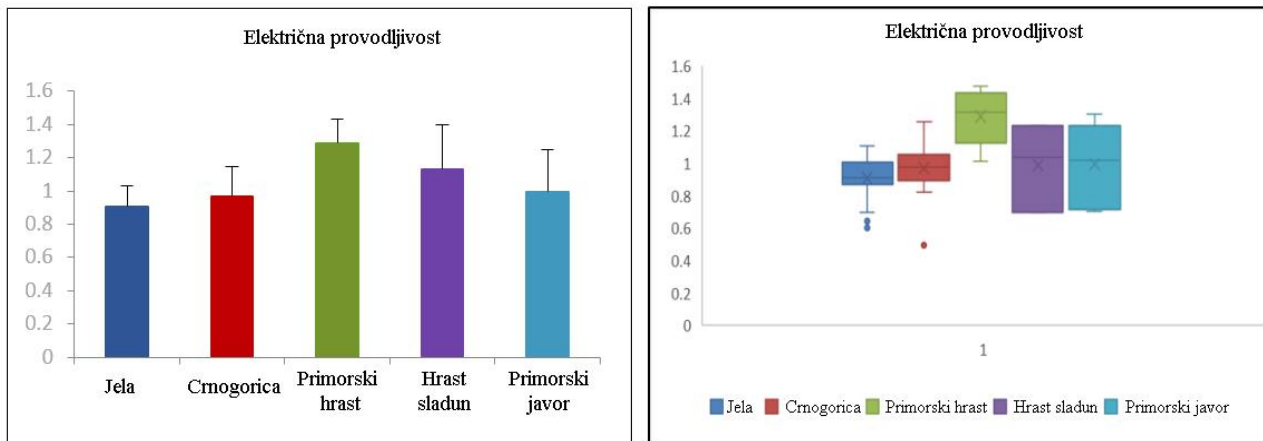


Slika 5. Sadržaj vode: a) srednje vrednosti sa poluširinom intervala pouzdanosti, b) medijana sa opsegom

4.1.2. Električna provodljivost

Električna provodljivost (EP) zavisi od sadržaja minerala, organskih kiselina, slobodnih amino-kiselina, proteina, kao i kompleksnih jedinjenja u medu. Što je njihov sadržaj veći, veća je i rezultujuća provodljivost. Prema evropskoj direktivi (9) i nacionalnom pravilniku (1) električna provodljivost u medljikovcu ne sme biti manja od 0,8 mS/cm. Srednja vrednost EP ispitivanih uzoraka je varirala između 0,91 i 1,29 mS/cm što znači da se svi ispitivani uzorci mogu klasifikovati kao medljikovac po ovom parametru.

Na **Slici 6.** dat je grafički prikaz vrednosti električne provodljivosti u uzorcima medljikovca od jele, crnogorice, primorskog hrasta, hrasta sladuna i primorskog javora. Varijabilitet među podacima za medljikovac od jele i crnogorice je mali, a najizraženiji je kod uzoraka medljikovca od primorskog javora i hrasta sladuna (**Slika 6b**).



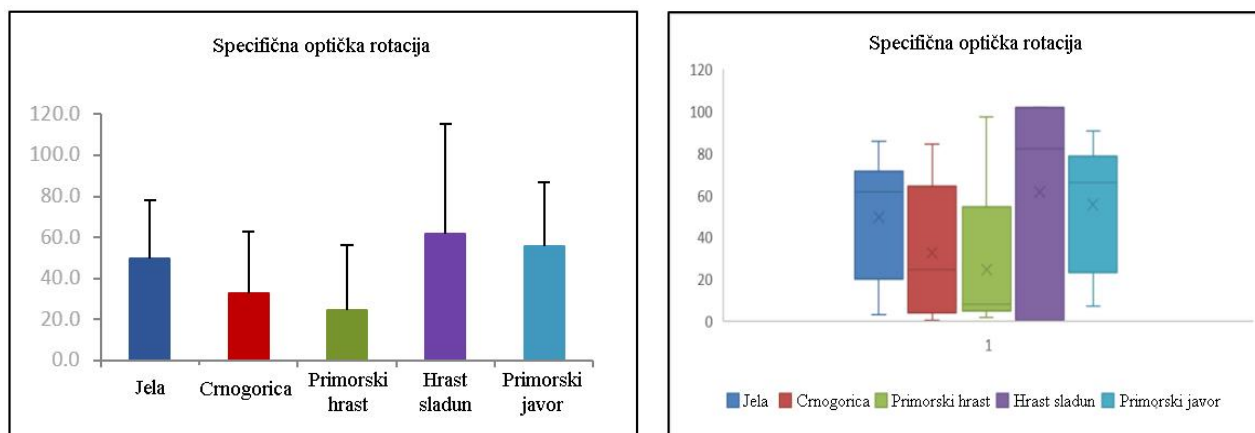
Slika 6. Vrednost električne provodljivosti: a) srednje vrednosti sa poluširinom intervala pouzdanosti, b) medijana sa opsegom

Slični rezultati su dobijeni analizom makedonskog i hrvatskog medljikovca, 1,14 mS/cm i 1,00 mS/cm, redom (12). Visoke vrednosti za električnu provodljivost dobijene su analizom egipatskog (1,98 mS/cm), jemenskog (4,18 mS/cm) i marokanskog cvetnog meda (1,32-1,40 mS/cm) (55,123). Analizirani med iz Kašmira i Saudijske Arabije ima električnu provodljivost 0,67 mS/cm, odnosno 0,53 mS/cm (122). Slična vrednost dobijena je analizom nektarskog meda iz Severozapadne Španije 0,615 mS/cm (53) i iz Turske (0,56 mS/cm) (107). Niske vrednosti za električnu provodljivost karakteristične su za evropski nektarski med, gde je dobijena srednja vrednost 0,16 mS/cm (8).

4.1.3. Specifična optička rotacija

Glukoza, disaharidi i oligosaharidi, prisutni u većim količinama u medljikovcu u odnosu na nektarski med, imaju pozitivne specifične optičke rotacije, zbog čega i rastvor medljikovca skreće ravan polarizovane svetlosti udesno. Svi analizirani uzorci imali su pozitivne vrednosti specifične optičke rotacije, što potvrđuje poreklo ispitivanih uzoraka.

Na **Slici 7**, dat je grafički prikaz vrednosti specifične optičke rotacije u uzorcima medljikovca od jela, crnogorice, primorskog hrasta, hrasta sladuna i primorskog javora. Vrednosti specifične optičke rotacije se kreću u opsegu od $24,6 \pm 20$ (primorski hrast) do $61,4 \pm 20$ (hrast sladun). Takođe, podaci u okviru svakog seta nisu normalno raspodeljeni i može se uočiti razlika u vrednostima medijana i srednjih vrednosti, što je naročito izraženo u slučaju primorskog hrasta. Najveći varijabilitet među podacima javlja se kod medljikovca od hrasta sladuna (**Slika 7b**).

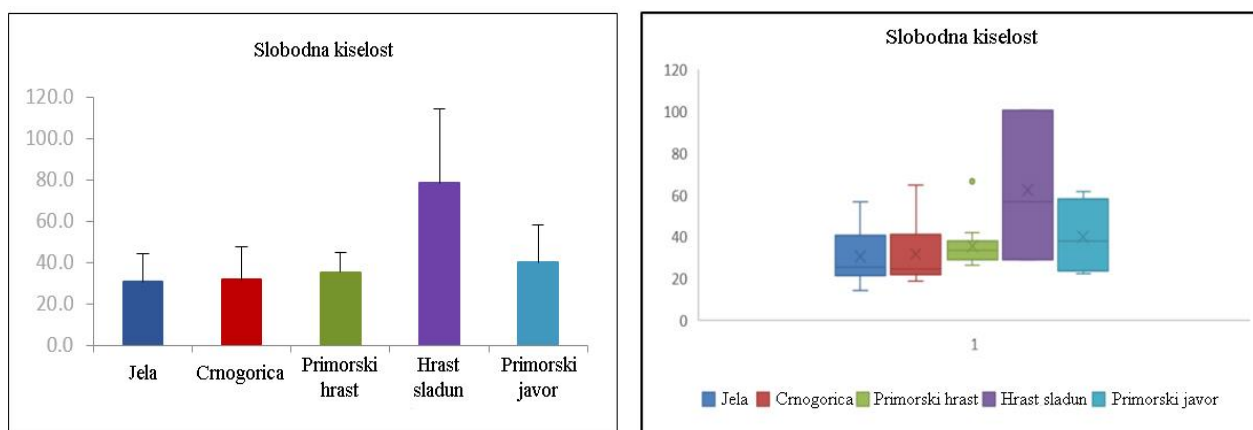


Slika 7. Vrednost specifične optičke rotacije: a) srednje vrednosti sa poluširinom intervala pouzdanosti, b) medijana sa opsegom

4.1.4. Slobodna kiselost

Sadržaj kiselina u medu je relativno nizak, ali i pored toga kiselost meda je važan parametar koji utiče na stabilnost i održivost meda, kao i na boju, teksturu i senzorna svojstva. Kiselost meda zavisi od količine, u najvećem delu glukonske kiseline, koja nastaje oksidacijom glukoze u prisustvu enzima glukoza-oksidadaze. Slobodna kiselost meda mora biti ≤ 50 meq/kg (1,9). Dobijene vrednosti za slobodnu kiselost kreću se u opsegu od 30,6 meq/kg (jela) do 78,6 meq/kg (hrast sladun) (**Tabela 9**). Propisana vrednost za slobodnu kiselost prekoračena je u dva uzorka medljikovca od hrasta sladuna (56,83 i 100,39 meq/kg). Poređenjem rezultata slobodne kiselosti sa vrednostima dobijenim u drugim studijama, slični rezultati se dobijeni analizom hrvatskog medljikovca (27,7 meq/kg), dok su dobijene nešto veće vrednosti za makedonski (44,2 meq/kg) i marokanski medljikovac (49,47 meq/kg) (12,123).

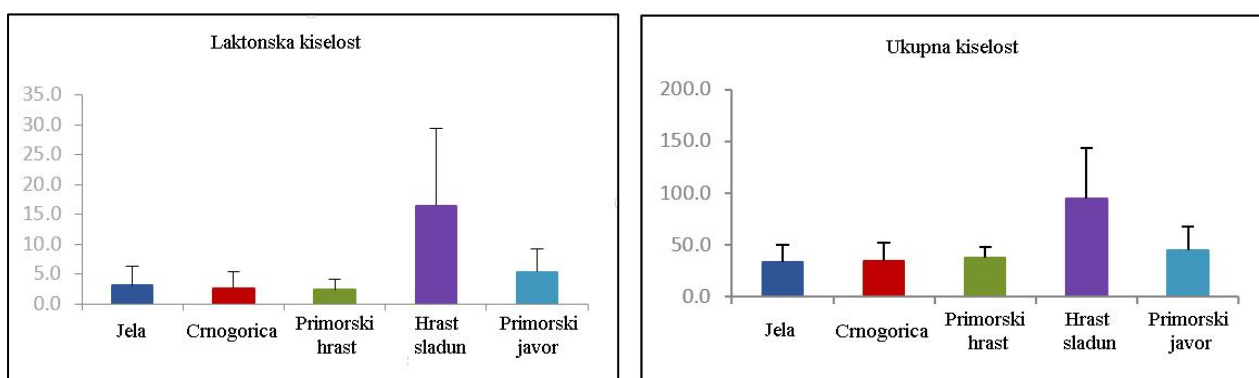
Na **Slici 8.** dat je grafički prikaz vrednosti parametra slobodna kiselost u uzorcima medljikovca od jela, crnogorice, primorskog hrasta, primorskog javora i hrasta sladuna.



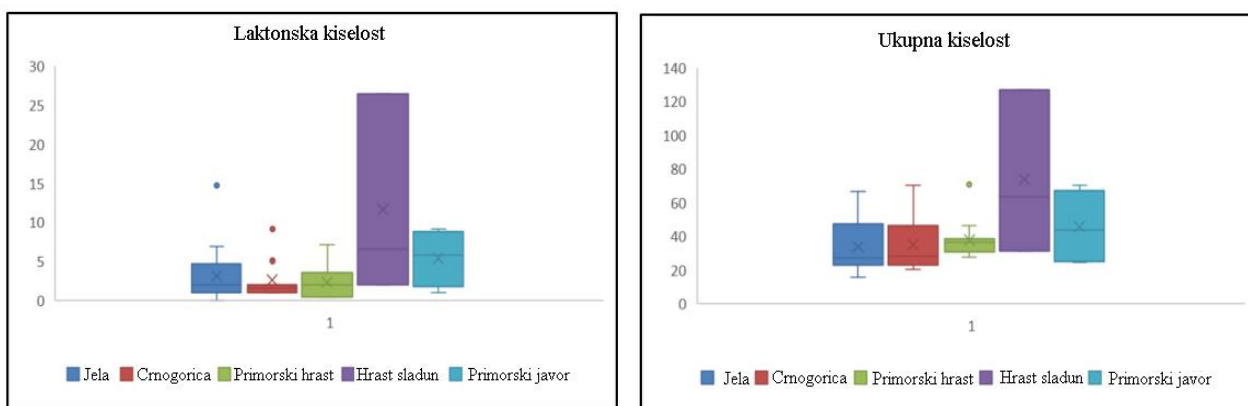
Slika 8. Vrednost slobodne kiselosti: a) srednje vrednosti sa poluširinom intervala pouzdanosti, b) medijana sa opsegom

4.1.5. Laktonska kiselost i ukupna kiselost

Na **Slici 9a.** dat je grafički prikaz vrednosti laktonske kiselosti i ukupne kiselosti u uzorcima medljikovca od jela, crnogorice, primorskog hrasta, primorskog javora i hrasta sladuna. Vrednosti laktonske kiselosti se kreću u opsegu od 2,3 (primorski hrast) do 16,5 (hrast sladun), a za ukupnu kiselost vrednosti se kreću u opsegu od 33,7 (jela) do 94,1 (hrast sladun). Na graficima (**Slika 9b**) se može uočiti veliki varijabilitet među podacima dobijenim za medljikovac od hrasta sladuna.



Slika 9a. Vrednosti laktonske kiselosti i ukupne kiselosti-srednje vrednosti sa poluširinom intervala pouzdanosti

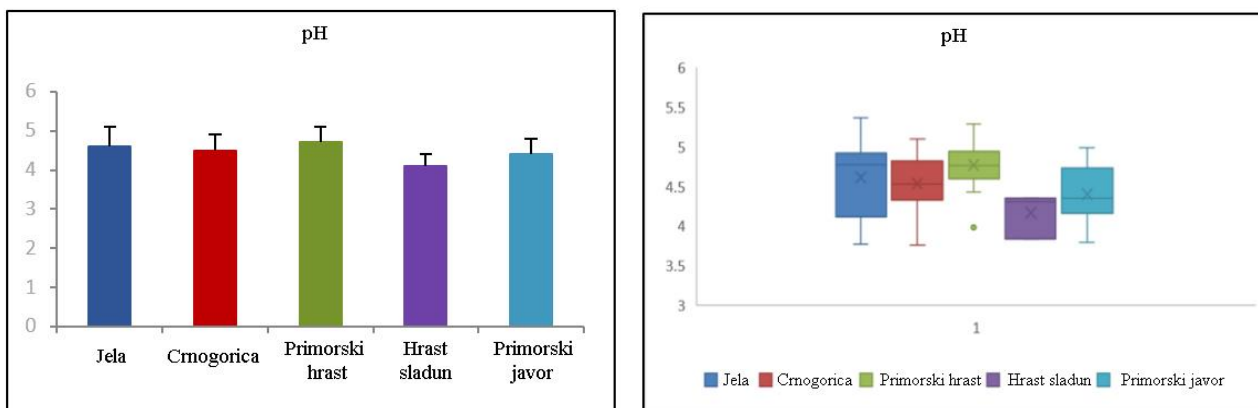


Slika 9b. Vrednosti laktonske kiselosti i ukupne kiselosti-medijana sa opsegom

4.1.6. pH vrednost

Med je kiseo i pH vrednost je obično između 3,5 i 5,5 (6) što je posledica prisustva organskih kiselina, prvenstveno glukonske kiseline i neorganskih jona, kao što su fosfati i hloridi. pH vrednost meda nije u direktnoj vezi sa slobodnom kiselošću usled puferskog svojstva karbonata, fosfata i drugih soli. Najniža vrednost pH izmerena je u medljikovcu od hrasta sladuna (4,1), a najviša kod medljikovca od primorskog hrasta (4,7) (**Tabela 9**).

Na **Slici 10a**, dat je grafički prikaz pH vrednosti u uzorcima medljikovca od jele, crnogorice, primorskog hrasta, hrasta sladuna i primorskog javora. Može se uočiti mali varijabilitet među podacima dobijenim za medljikovac od primorskog hrasta, a najizraženiji je kod uzoraka medljikovca od jele (**Slika 10b**).



Slika 10. pH vrednost: a) srednje vrednosti sa poluširinom intervala pouzdanosti, b) medijana sa opsegom

Slične vrednosti su dobijene za med iz Saudijske Arabije (4,46) i Kašmira (4,63) (122), kao i za hrvatski (4,8) i makedonski (4,7) medljikovac (12). Nešto niža vrednost dobijena je analizom marokanskih medljikovaca (3,87) i evropskog meda (3,9) (8,123).

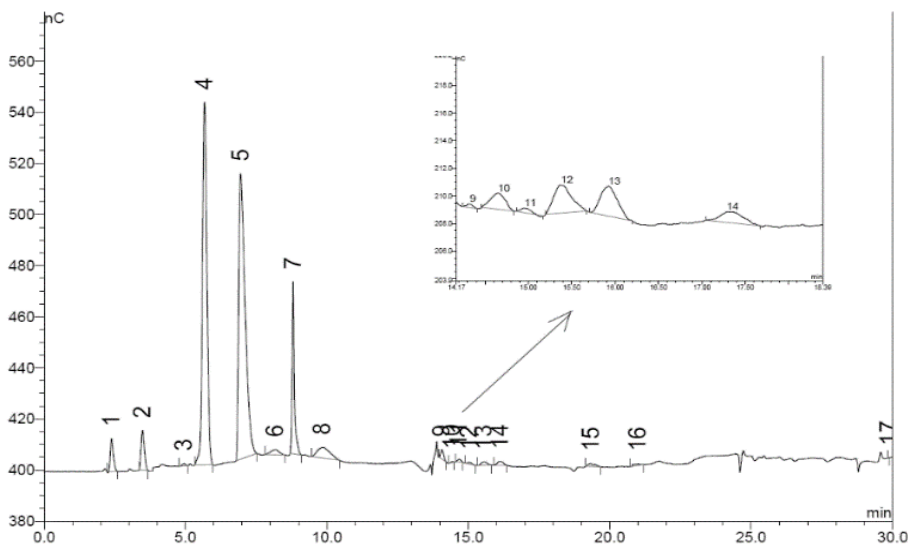
Tabela 9. Parametri deskriptivne statistike fizičko-hemijskih parametara u analiziranim medljikovcima

Biljno poreklo	Parametri deskriptivne statistike	ω [%]	EP [mS/cm]	pH	SR [α 20]	SK [meq/kg]	LK [meq/kg]	UK [meq/kg]
Jela (n = 22)	srednja vrednost	15,8	0,91	4,6	49,5	30,6	3,1	33,7
	medijana	15,8	0,91	4,7	61,5	25,5	2,0	27,3
	standardna devijacija	1,6	0,13	0,5	28,8	13,7	3,3	16,1
	opseg	13,3-19,7	0,69-1,11	3,7-5,3	3,1-85,5	14,3-56,8	0,2-14,7	15,8-66,8
Crnogorica (n = 17)	srednja vrednost	16,2	0,97	4,5	32,6	31,7	2,6	34,4
	medijana	16,8	0,98	4,5	24,47	24,7	1,5	26,2
	standardna devijacija	1,7	0,18	0,4	30,4	15,9	2,8	18,3
	opseg	13,1-19,3	0,72-1,25	3,7-5,1	0,6-84,3	18,5-64,8	1,0-9,6	20,1-70,3
Primorski hrast (n = 15)	srednja vrednost	15,0	1,29	4,7	24,6	35,4	2,3	37,8
	medijana	14,7	1,32	4,7	8,0	33,4	2,0	36,5
	standardna devijacija	1,3	0,15	0,4	31,5	9,7	1,9	10,5
	opseg	13,2-17,8	1,0-1,47	3,9-5,2	1,7-97,2	26,5-66,4	0,5-7,1	27,5-70,9
Hrast sladun (n = 4)	srednja vrednost	14,9	1,13	4,1	61,4	78,6	16,5	95,1
	medijana	14,9	1,13	4,1	81,8	78,6	16,5	95,1
	standardna devijacija	1,2	0,14	0,4	53,5	30,9	14,1	44,9
	opseg	14,0-15,7	1,03-1,23	3,8-4,3	0,7-101,8	56,8-100,3	6,6-26,4	63,4-126,8
Primorski javor (n = 6)	srednja vrednost	15,0	0,99	4,4	55,4	40,0	5,4	45,4
	medijana	14,9	1,02	4,3	66,1	37,7	5,8	43,5
	standardna devijacija	0,7	0,25	0,4	31,3	18,4	3,8	22,0
	opseg	14,3-16,1	0,73-1,30	3,7-4,9	7,1-90,3	22,3-61,6	1,0-9,1	24,3-70,2

4.2. Šećerni profil medljikovaca

Ugljeni hidrati su jedni od najčešće korišćenih parametara za procenu autentičnosti meda, kako u pogledu načina proizvodnje, tako i u pogledu opisa proizvoda, odnosno definisanja biljnog i geografskog porekla. Šećerni profil meda ukazuje i na razliku između cvetnog meda i medljikovca (6). Međutim, samo nekoliko studija se bavilo ispitivanjem šećernog profila medljikovaca (7,124). Ove studije su uključivale mali broj biljnih vrsta medljikovaca, nedovoljan broj uzoraka i u njima je identifikovano i kvantifikovano samo nekoliko ugljenih hidrata koji nisu bili dovoljni za karakterizaciju različitih vrsta medljikovaca (7). Najčešće ispitivane vrste bile su *Abies alba sp.* i *Quercus spp.*

U ispitivanim uzorcima medljikovaca, pored **Glu, Fru** i **Sah**, identifikovano i kvantifikovano je još deset šećera i jedan šećerni alkohol: monosaharid (**Ara**), disaharidi (**Tre, Melibi, Izomal, Tur** i **Maltoz**), trisaharidi (**Mel, Pan, Mal** i **Raf**) i šećerni alkohol sorbitol (**Sor**). U **Tabeli 10** prikazani su parametri deskriptivne statistike (srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost) dobijeni analizom šećera, a na **Slici 11** prikazan je hromatogram šećera identifikovanih u uzorku medljikovca od primorskog hrasta.



Slika 11. Hromatogram šećera identifikovanih u uzorku medljikovca od primorskog hrasta: 1 - **Sor**, 2 - **Tre**, 3 - **Ara**, 4 - **Glu**, 5 - **Fru**, 6 - **Melibi**, 7 - **Sah**, 8 - **Izomal**, 10 - **Mel**, 12 - **Tur**, 13 - **Raf**, 14 - **Maltoz**, 15 - **Pan**, 16 - **Mal** (125)

Tabela 10. Parametri deskriptivne statistike šećera u analiziranim uzorcima medljikovaca (g/100g)

Biljno poreklo	Parametar	Tre	Glu	Fru	Melibi	Sah	Izomal	Mel	Tur	Maltoz	Sor	Ara	Pan	Mal	Raf
Jela (n = 22)	srednja vrednost	1,20	24,0	31,0	0,50	4,0	0,30	0,400	1,0	0,30	0,10	0,090	0,090	0,100	0,30
	medijana	0,90	24,0	32,0	0,09	5,0	0,20	0,300	0,9	0,30	0,10	0,050	0,050	0,050	0,30
	standardna devijacija	0,90	3,0	4,0	0,90	2,0	0,30	0,400	0,6	0,30	0,20	0,200	0,200	0,400	0,30
	min vrednost	0,10	19,0	24,0	0,01	0,8	0,01	0,003	0,3	0,01	0,01	0,010	0,009	0,003	0,02
	max vrednost	3,70	28,0	36,0	4,10	6,0	1,01	1,300	2,2	1,00	0,40	0,500	0,600	1,400	1,10
Crnogorica (n = 17)	srednja vrednost	1,10	24,0	30,0	0,20	4,0	0,40	0,500	1,1	0,50	0,30	0,070	0,060	0,100	0,50
	medijana	0,90	24,0	31,0	0,20	4,0	0,20	0,400	1,0	0,30	0,20	0,060	0,060	0,090	0,30
	standardna devijacija	0,90	3,0	4,0	0,20	2,0	0,50	0,500	0,4	0,40	0,20	0,080	0,060	0,080	0,60
	min	0,30	21,0	24,0	0,01	2,0	0,03	0,020	0,5	0,03	0,01	0,004	0,002	0,005	0,05
	max	3,80	29,0	36,0	0,70	7,0	1,60	1,400	1,8	1,10	0,60	0,300	0,190	0,300	1,70
Primorski hrast (n = 15)	srednja vrednost	1,20	24,0	31,0	0,20	4,0	0,40	0,500	1,1	0,40	0,20	0,100	0,100	0,300	0,40
	medijana	1,10	23,0	31,0	0,10	4,0	0,20	0,400	0,9	0,30	0,30	0,050	0,070	0,040	0,10
	standardna devijacija	0,90	4,0	4,0	0,20	2,0	0,50	0,500	0,7	0,40	0,20	0,300	0,200	0,800	0,50
	min vrednost	0,30	19,0	25,0	0,01	0,8	0,01	0,010	0,2	0,03	0,01	0,010	0,002	0,010	0,03
	max vrednost	3,70	29,0	38,0	0,70	6,0	1,50	1,300	2,5	1,50	0,40	0,900	0,700	3,000	1,50
Hrast sladun (n = 4)	srednja vrednost	0,90	25,0	32,0	0,60	4,0	0,50	0,300	1,0	0,80	0,30	0,070	0,040	0,030	0,50
	medijana	0,90	26,0	35,0	0,60	5,0	0,40	0,300	0,9	0,80	0,30	0,050	0,040	0,040	0,40
	standardna devijacija	0,50	6,0	8,0	0,30	2,0	0,30	0,300	0,4	0,30	0,30	0,050	0,030	0,040	0,30
	min vrednost	0,30	18,0	21,0	0,30	2,0	0,20	0,040	0,6	0,60	0,05	0,040	0,007	0,003	0,20
	max vrednost	1,50	30,0	37,0	0,90	6,0	0,90	0,600	1,4	1,20	0,60	0,200	0,070	0,070	0,90
Primorski javor (n = 6)	srednja vrednost	1,40	24,0	33,0	0,30	4,1	0,50	0,800	1,4	0,50	0,50	0,200	0,050	0,050	0,50
	medijana	1,00	25,0	33,0	0,10	4,2	0,20	0,800	1,4	0,40	0,50	0,100	0,050	0,040	0,50
	standardna devijacija	0,90	3,0	3,0	0,30	0,8	0,70	0,200	0,7	0,40	0,40	0,100	0,050	0,040	0,30
	min vrednost	0,60	21,0	30,0	0,06	3,0	0,10	0,500	0,5	0,20	0,02	0,050	0,020	0,020	0,07
	max vrednost	2,80	28,0	37,0	0,70	4,9	1,80	0,900	2,1	1,00	0,90	0,400	0,100	0,100	0,80

Zbir **Glu** i **Fru** bio je u granicama koje su propisane zakonom (1,9) i iznosio je više od 45 g/100 g meda. Sadržaj **Glu** i **Fru** se kretao od 54 do 57 g/100 g, a prosečna količina je bila 55,5 g/100 g meda. Ova količina nije značajno varirala među različitim biljnim vrstama medljikovaca (**Tabela 10**). Sličan trend se može videti i u literaturi. Zbir **Fru** i **Glu** u medljikovcu od bora (*Pinus sp.*) i jele (*Abies cephalonica*) iz Grčke iznosio je 77,90 i 75,15 g/100 g, redom (68), a u medljikovcu od bora (*Pinus L.*) i hrasta (*Quercus robur*) iz Turske iznosio je 63,47 i 64,93 g/100 g, redom (45). Na osnovu navedenog, moglo bi se pretpostaviti da sadržaj **Glu** i **Fru** najviše zavisi od geografskog porekla. Međutim, prema dostupnoj literaturi, zbir **Glu** i **Fru** u *Abies alba sp.* je gotovo konstantan i nezavisan od sastava zemljišta (Francuska - 59,0 g/100 g (126), Španija - 57,3 g/100 g (127), Poljska - 62,0 g/100 g (124).

Fruktoza je prisutna u najvećoj količina u svim uzorcima. Sadržaj **Fru** je bio između 31 i 33 g/100 g, sa prosekom od 32 g/100 g. Sadržaj **Glu** se kretao od 24,0 do 25,0 g/100 g, sa prosekom od 24,5 g/100 g, i bio je za oko 7 do 8 g/100 g niži od sadržaja **Fru**, što je u skladu sa gore navedenim studijama (126,127). Srednja vrednost za sadržaj **Sah** u svim uzorcima bila je 4 g/100 g meda, što je viša vrednost od one koju su objavili drugi autori (8,124,128). Prosečne vrednosti sadržaja **Sah** u ovim studijama bile su 0,98, 0,2 i 0,8 g/100 g, redom.

Glavni disaharidi u svim testiranim uzorcima bili su **Tre** i **Tur** sa sadržajem u rasponu od 0,90 do 1,40 g/100 g i 1,0 do 1,4 g/100 g meda, redom. Sadržaj **Tre** u uzorcima bio je veći u poređenju sa medljikovcima hrasta i bora iz Turske (0,42 i 0,23 g/100 g, redom) (45), ali niži od jele iz Francuske (2,15 g/100 g) (127). Sadržaj **Tur** bio je niži u odnosu na medljikovac primorskog hrasta i jele iz Španije (2,1 i 4,56 g/100 g, redom) (127). Najviša koncentracija **Maltoz** pronađena je u uzorcima medljikovca hrasta sladuna (0,80 g/100 g), dok je najniža koncentracija bila u medljikovcu od jele (0,30 g/100 g). U medljikovcima primorskog hrasta iz Španije sadržaj **Maltoz** iznosio je 2,3 g/100 g (127), a u uzorcima medljikovca od hrasta i bora iz Turske iznosio je 0,19 i 0,54 g/100 g, redom (45). Najviša koncentracija **Melibi** pronađena je u medljikovcu hrasta sladuna (0,60 g/100 g), dok je najniža koncentracija pronađena u medljikovcu crnogorice i primorskog hrasta (0,20 g/100 g). U medljikovcima hrasta sladuna i primorskog javora pronađena je najviša koncentracija **Izomal** (5,50 g/100 g), dok je najniža koncentracija pronađena u uzorcima medljikovca od jele (0,30 g/100 g).

Medljikovac sadrži više oligosaharida u poređenju sa cvetnim medom, uglavnom trisaharida (**Mel**, **Raf** i **Mal**), i drugih viših oligosaharida (6). U literaturi se može videti da je prisutan veliki varijabilitet u sadržaju **Mel** u medljikovcima različitog biljnog porekla, ali i između medljikovaca istog biljnog ali različitog geografskog porekla. U uzorcima *Abies spp.* sadržaj **Mel** iznosi od 1,5 g/100 g u medu iz Španije (127), 2,22 g/100 g u medu iz Francuske (126) do 3,2 g/100 g u poljskom medu (124). Sadržaj **Mel** u uzorcima *Abies alba sp.* bio je najniži u odnosu na do sada objavljene podatke (0,40 g/100 g, **Tabela 10**). U uzorcima *Quercus spp.* sadržaj **Mel** se kretao od 0,94 g/100 g u turskom medu (45) do 3,0 g/100 g u medu iz Španije (127). Sadržaj **Mel** u medu od primorskog hrasta bio je 0,5 g/100 g, i 0,3 g/100 g u uzorcima meda od hrasta sladuna (**Tabela 10**). Najviša koncentracija **Mel** bila je u uzorcima meda od primorskog javora (0,80 g/100 g). Slični rezultati su dobijeni samo za uzorke meda od bora iz Turske (0,62 g/100 g) (45).

Sadržaj **Raf** bio je 0,30 g/100 g u uzorcima medljikovca jele, 0,40 g/100 g u medljikovcu primorskog hrasta i 0,50 g/100g u medljikovcu crnogorice, hrasta sladuna i primorskog javora (**Tabela 10**). Najviša koncentracija **Sor** pronađena je u uzorcima medljikovca od primorskog javora (0,50 g/100 g), dok je najniža koncentracija pronađena u uzorcima medljikovca jele (0,30 g/100 g) (**Tabela 10**). Srednja vrednost preostalih šećera (**Ara**, **Pan** i **Mal**) bila je manja od 0,20 g/100 g (**Tabela 10**).

Literaturni podaci, kao i rezultati dobijeni u okviru ove disertacije, potvrđuju činjenicu da je razlikovanje medljikovaca prema biljnom poreklu na osnovu sadržaja šećera teško. Veliki varijabilitet sastava šećera među medljikovcima istog biljnog porekla, ali sa različitim geografskih lokacija, kao i male razlike u profilu šećera različitih biljnih vrsta iz istog regiona, onemogućavaju identifikaciju biomarkera koji bi bili karakteristični za određenu biljnu vrstu. Pored toga, izuzev glavnih šećera,

Fru i **Glu**, svi ostali ugljeni hidrati su pokazali vrlo širok raspon rezultata unutar svake biljne vrste koji onemogućava njihovu statističku diferencijaciju zbog preklapanja opsega među vrstama (**Tabela 10**).

4.3. Odnos stabilnih izotopa ugljenika

Uzorci medljikovaca različitog biljnog porekla analizirani su metodom masene spektrometrije odnosa izotopa u cilju određivanja autentičnosti u smislu proizvodnje i u smislu autentičnosti vezane za njihovo biljno poreklo. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ za medljikovac i protein izolovan iz medljikovca, kao i razlike u ovim vrednostima, za svaku ispitivanu biljnu vrstu, date su u **Tabeli 11**, kroz parametre deskriptivne statistike (srednja vrednost, medijana, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost).

Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ pronađene u medu bile su u rasponu od $-21,96\text{‰}$ do $-30,47\text{‰}$ za C3 biljke i $-11,82\text{‰}$ do $-19,00\text{‰}$ u C4 biljkama (36). U uzorcima medljikovca $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti su se kretale u rasponu od $-23,10\text{‰}$ do $-26,66\text{‰}$, dok su u proteinu izolovanom iz meda bile u rasponu od $-24,15\text{‰}$ do $-27,21\text{‰}$. Navedene vrednosti odgovarale su C3 biljkama i potvrdile autentičnost testiranih uzoraka u pogledu načina proizvodnje.

Tabela 11. Parametri deskriptivne statistike za $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti

Biljno poreklo	Parametar	$\delta^{13}\text{C}$ med	$\delta^{13}\text{C}$ protein	$\delta^{13}\text{C}$ med – $\delta^{13}\text{C}$ protein
Jela	srednja vrednost	-25,39	-26,12	0,73
	medijana	-25,44	-26,25	0,56
	standardna devijacija	0,60	0,52	0,73
	min vrednost	-26,60	-26,86	-0,38
	max vrednost	-24,29	-25,04	2,13
Crnogorica	srednja vrednost	-25,46	-26,32	0,87
	medijana	-25,31	-26,41	1,03
	standardna devijacija	0,78	0,60	0,84
	min vrednost	-26,66	-27,21	-0,76
	max vrednost	-23,81	-25,40	2,01
Hrast sladun	srednja vrednost	-25,50	-24,36	-1,14
	medijana	-25,18	-24,26	-1,03
	standardna devijacija	0,56	0,28	0,29
	min vrednost	-26,15	-24,68	-1,47
	max vrednost	-25,18	-24,15	-0,92
Primorski hrast	srednja vrednost	-25,39	-25,64	0,24
	medijana	-25,47	-25,84	0,43
	standardna devijacija	0,71	0,59	0,48
	min vrednost	-26,48	-26,78	-0,63
	max vrednost	-24,00	-24,29	0,91
Primorski javor	srednja vrednost	-24,83	-25,86	1,02
	medijana	-25,12	-25,77	0,73
	standardna devijacija	1,23	0,54	1,37
	min vrednost	-26,54	-26,82	-0,72
	max vrednost	-23,10	-25,22	3,09

Prema međunarodno prihvaćenoj metodi (114), razlika između odnosa stabilnih izotopa proteina izolovanog iz meda i odnosa stabilnih izotopa meda predstavlja meru sadržaja šećera C4 biljaka u medu. Vrednost odnosa stabilnih izotopa proteina izolovanog iz meda predstavlja standard sa kojim se upoređuje vrednost odnosa stabilnih izotopa iz celokupnog meda. Medu je dodat sirup C4 biljaka ukoliko je $\delta^{13}\text{C}$ vrednost iz meda u poređenju sa proteinom iznad 1‰ što odgovara sadržaju dodatog šećera od 7%. Sadržaj šećera C4 biljaka u medu određuje se prema jednačini:

$$\% C4 = \frac{\delta^{13}\text{C}_{prot} - \delta^{13}\text{C}_{med}}{\delta^{13}\text{C}_{prot} - (-9,7)} \times 100$$

gde su $\delta^{13}\text{C}_{med}$ i $\delta^{13}\text{C}_{prot}$ vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ za med i protein izolovan iz meda, dok je -9,7 prosečna vrednost $\delta^{13}\text{C}$ za kukuruzni sirup.

Vrednosti sadržaja šećera C4 biljaka u ispitivanim uzorcima medljikovaca potvrđuju autentičnost u pogledu proizvodnje. U svim ispitivanim uzorcima sadržaj šećera C4 biljaka bio je manji od 7%, što ukazuje na prirodno poreklo medljikovaca.

Srednje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ meda biljnih vrsta poput jele, crnogorice, hrasta sladuna i primorskog hrasta su vrlo bliske i kreću se od -25,39 ‰ (za jelu i primorski hrast) do -25,50 ‰ (za hrast sladun), dok za uzorke medljikovca od primorskog javora su karakteristične veće $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti od -24,83 ‰. Srednje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina izolovanih iz medljikovaca pokazale su različit trend u poređenju sa $\delta^{13}\text{C}$ srednjim vrednostima medljikovca (**Tabela 11**). Srednje vrednosti za medeljikovac od jele i crnogorice su bliske (-26,12 ‰ i -26,32 ‰, redom) i niže od vrednosti za medljikovac od primorskog hrasta i primorskog javora (-25,64 ‰ i -25,86 ‰, redom), dok je medljikovac od hrasta sladuna pokazao najveću vrednost (-24,36 ‰). Što se tiče izotopskog sastava meda prema godini proizvodnje, mogu se primetiti samo nešto veće $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda za 2013. godinu u slučaju medljikovca od jele. Usled nedostatka reprezentativnog skupa uzoraka medljikovaca drugih biljnih vrsta iz 2013. godine, onemogućena je dalja diskusija uočenog trenda.

Nekoliko studija koje su ispitivale odnos stabilnih izotopa ugljenika u medu ukazale su na to da nije moguće napraviti razliku između različitih biljnih vrsta samo na osnovu ovog parametra (24,37,129–131). Uzak opseg $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti medljikovaca različitog biljnog porekla i relativno dispergovana merenja onemogućavaju njihovo razlikovanje (129). Otežavajuća okolnost pri ovakvoj vrsti analize je činjenica da uzorci iz različitih evropskih područja, ali istog biljnog porekla, pokazuju relativno velike razlike u zavisnosti od klimatskog područja (130). Međutim, pokazano je da se $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda i proteina izolovanih iz meda, sami ili u kombinaciji sa drugim parametrima, mogu koristiti za razlikovanje meda od eukalptusa i polifloralnog meda iz Urugvaja (132,133). Među objavljenim radovima pronađeni su podaci odnosa stabilnih izotopa ugljenika u medljikovcima od bora (*Pinus spp.*) (37,131), jele (*Abies cephalonica* i *Abies alba*) (24,131), smreke (*Picea abies* L.) (24), i generalno u uzorcima medljikovaca (129,130). U objavljenim radovima $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti za medljikovac od jele iz Slovenije (-25,3 ± 0,9 ‰, u rasponu od -26,8 do -23,7 ‰) su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije. Svi ostali objavljeni rezultati se odnose na biljne vrste koje su drugačije od biljnih vrsta koje su ispitivane u okviru ove disertacije.

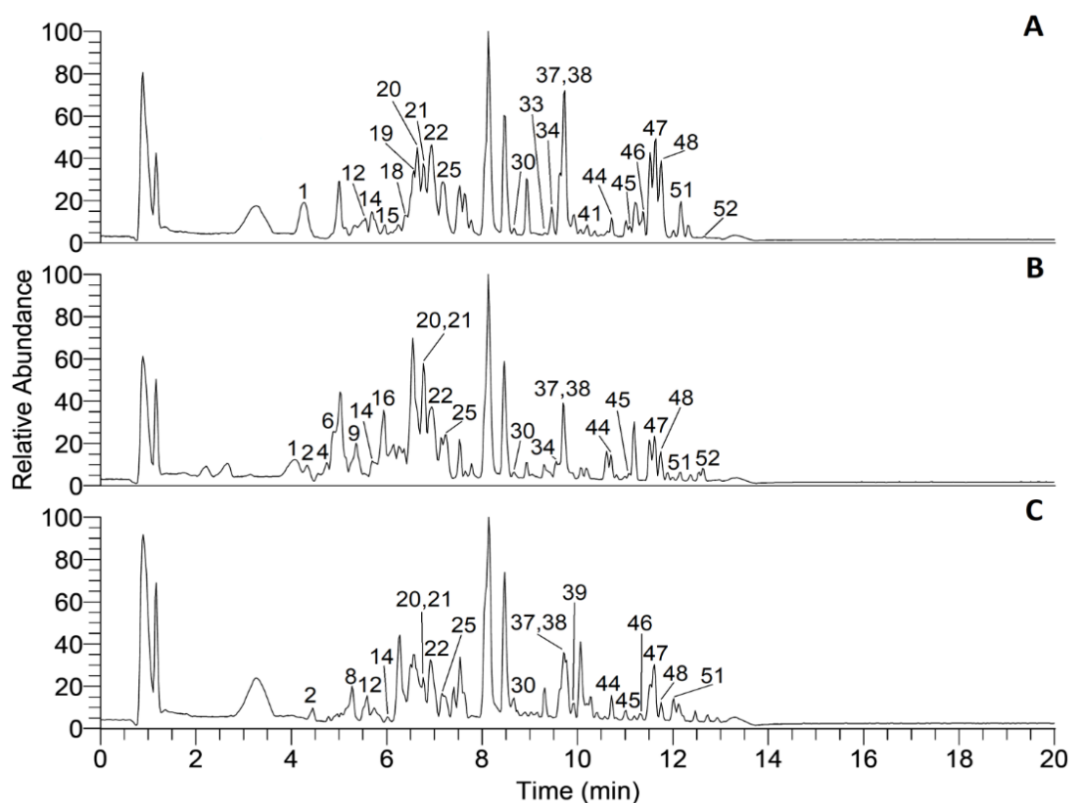
S druge strane, izolovani proteini nose informacije o njihovom poreklu koje je karakteristično za vrstu biljke čije su izlučevine korišćene za proizvodnju meda. Kako oni nemaju mogućnost adulteracije, $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina iz meda bi mogli da budu dobar pokazatelj biljnog porekla uzoraka. Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije ukazuju na razlike u vrednostima $\delta^{13}\text{C}$ proteina izolovanih iz medljikovaca i upućuju na činjenicu da se izolovani proteini mogu potencijalno koristiti kao karakteristika biljnih vrsta koje se koriste za proizvodnju meda. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ proteina izolovanih iz analiziranih uzoraka medljikovaca mogu biti vredan pokazatelj biljnog porekla, posebno hrasta sladuna.

4.4. Profil fenolnih jedinjenja u uzorcima medljikovaca

Metabolomika predstavlja sistematsko proučavanje metabolita, intermedijera ili produkata metabolizma, pružajući karakteristične profile ispitivanog sistema. Značajna primena metabolomike ogleda se u izučavanju sekundarnih metabolita biljaka (134). Koristeći pristup analize metaboličkog otiska prsta izvršeno je skeniranje svih fenolnih jedinjenja izolovanih iz određenog uzorka medljikovca. Razmatran je, naime, ukupan profil kao set karakterističnih hromatografskih signala koji definišu određeni uzorak, odnosno biljnu vrstu. Fenolni profili dobijeni su primenom UHPLC-Orbitrap MS tehnike, pri čemu su eksperimentalni uslovi optimizovani u cilju što boljeg razdvajanja jedinjenja različite polarosti.

Prilikom analize hromatograma identifikovan je značajan broj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima medljikovaca (**Tabela 12**). Potvrđeno je prisustvo 52 jedinjenja koja pripadaju trima strukturno različitim grupama: fenolne kiseline i njihovi derivati (19 jedinjenja), aglikoni flavonoida (23 jedinjenja) i glikozidi flavonoida (10 jedinjenja). Trideset i tri jedinjenja je potvrđeno korišćenjem dostupnih analitičkih standarda, dok su ostali identifikovani pretragom njihovih $[M-H]^-$ deprotonovanih molekula i njihovih MS^4 fragmentacija i upoređivani sa prethodno objavljenim hromatografskim i MS podacima.

Na **Slici 12**. prikazani su hromatogrami sa označenim fenolnim jedinjenjima koja su identifikovana u uzorcima medljikovaca od primorskog hrasta (**A**), hrasta sladuna (**B**) i primorskog javora (**C**).



Slika 12. Profil fenolnih jedinjenja identifikovanih u medljikovcima. Obeležavanje pikova saglasno je brojevima jedinjenja datim u **Tabeli 12**. (135)

Tabela 12. Fenolna jedinjenja identifikovana u medljikovcima

Br.	tr, min	Naziv fenolnog jedinjenja	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nadena masa, [M-H] ⁻	Δ (mDa)	MS ² Fragmenti	MS ³ Fragmenti	MS ⁴ Fragmenti
1	4,20	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid ^{a*}	315,07216	315,07083	1,33	153 , 152, 109, 108	109	84 , 81
2	4,44	Protokatehinska kiselina ^{a,*}	153,01933	153,01848	0,85	109	81 , 68, 65	–
3	4,51	Hidroksibenzoeva kiselina heksozid I [*]	299,07724	299,07584	1,40	137	93	–
4	4,74	Kofeinska kiselina heksozid I [*]	341,08781	341,08521	2,60	179 , 161, 135	135	135, 117, 107 , 91
5	4,91	Eskuletin 6- <i>O</i> -glukozid (Eskulin) ^{a,*}	339,07216	339,07034	1,82	177	177, 149, 133 , 105, 89	89
6	4,92	Hidroksibenzoeva kiselina heksozid II [*]	299,07724	299,07626	0,98	137	93	–
7	5,10	Kofeinska kiselina heksozid II [*]	341,08781	341,08615	1,66	179 , 161, 135	135	135, 117, 107 , 91
8	5,26	5- <i>O</i> -Kafeoilhinska kiselina ^{a,*}	353,08781	353,08566	2,15	191 , 179	173, 127 , 111, 93, 85	109, 99, 85
9	5,41	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina ^{a,*}	137,02442	137,02359	0,83	109, 93	93	–
10	5,48	Gentisinska kiselina ^{a,*}	153,01933	153,01837	0,96	109 , 107	95, 81 , 68	–
11	5,62	<i>p</i> -Hidroksifenil-sirćetna kiselina ^{a,*}	151,04007	151,03914	0,93	136 , 95	108, 92	108
12	5,63	Vanilinska kiselina ^{a,*}	167,03498	167,03398	1,00	153, 152, 124, 123 , 108	108	123, 80, 78
13	5,77	Eskuletin ^{a,*}	177,01933	177,01877	0,56	147, 135 , 133, 131, 105	151, 107, 94, 91 , 71	–
14	5,80	Kofeinska kiselina ^{a,*}	179,03498	179,03389	1,09	135 , 117, 91, 59	107 , 59	–
15	5,83	Kvercetin 3- <i>O</i> -(2"-heksozil)heksozid	625,14102	625,13940	1,62	505, 463, 445, 301, 300	271 , 255, 179, 151	271, 253, 243 , 227, 215
16	6,13	Metoksi kempferol 3- <i>O</i> -(2"-heksozil)heksozid [*]	639,15667	639,15479	1,88	624, 459, 444, 315 , 300	300	271 , 255, 166
17	6,39	Kempferol 7- <i>O</i> -(6"-heksozil)heksozid [*]	609,14611	609,14380	2,31	285	257 , 241, 229, 213, 151	255, 239, 229 , 163
18	6,44	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6"-ramnozil)glukozid ^{a,*}	609,14611	609,14343	2,68			

Tabela 12. Nastavak

Br.	tr, min	Naziv fenolnog jedinjenja	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nadena masa, [M-H] ⁻	Δ (mDa)	MS ² Fragmenti	MS ³ Fragmenti	MS ⁴ Fragmenti
19	6,45	Kempferol 3- <i>O</i> -(2"-ramnozil)heksozid	593,15119	593,14948	1,71	429, 327, 285, 284 , 255	255 , 227	227 , 211
20	6,68	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ^{a,*}	163,04007	163,03917	0,90	119	119 , 101, 93 , 91, 72	–
21	6,71	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid ^{a,*}	463,08820	463,08627	1,93	301 , 300	273, 257, 179 , 151	151
22	7,02	Sinapinska kiselina ^{a,*}	223,06120	223,05992	1,28	208 , 179, 164	193, 164 , 149, 135	149 , 135
23	7,03	Naringenin 7- <i>O</i> -(2"-ramozil)glukozid ^{a,*}	579,17190	579,17230	0,64	459 , 357, 313, 271, 235	441, 357 , 339, 271, 235	339 , 169, 151, 125
24	7,04	Ferulinska kiselina ^{a,*}	193,05063	193,04973	0,90	178, 149 , 134	134	106
25	7,17	Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozid ^{a,*}	447,09329	447,09357	0,63	301 , 300, 284	273, 257, 179 , 151	151
26	7,90	Koniferil-aldehid ^{a,*}	177,05572	177,05460	1,12	163, 162	134 , 133, 120, 106	106 , 65
27	7,98	Luteolin 7- <i>O</i> -ramnozid	431,09837	431,09744	0,93	286, 285	257, 241 , 217, 199, 175	241, 226, 213, 198 , 185
28	8,24	Kvercetin ^a	301,03538	301,03384	1,54	271, 255, 179 , 151, 107	151	107 , 83
29	8,40	Kempferol 7- <i>O</i> -ramnozid	431,09837	431,09671	1,66	286, 285 , 284, 257, 151	257, 241, 213, 151 , 107	107 , 83, 65
30	8,59	Eriodiktiol ^{a,*}	287,05611	287,05582	1,01	269, 253, 241, 199, 151	107 , 83, 65	–
31	8,69	Luteolin ^{a,*}	285,04046	285,03909	1,37	257, 241 , 217, 199, 175	255, 227 , 211, 197, 183	–
32	9,33	Tehtohrizin	267,06628	267,06500	1,28	252 , 224	224 , 180	195, 180
33	9,44	Naringenin ^{a,*}	271,06120	271,05994	1,26	177, 151	107	65
34	9,52	Apigenin ^{a,*}	269,04554	269,04462	0,92	225, 177, 151	65	–
35	9,53	Genistein ^{a,*}	269,04554	269,04590	1,34	225 , 201, 183, 181, 151	197, 183, 181 , 169, 157	–

Tabela 12. Nastavak

Br.	t _R , min	Naziv fenolnog jedinjenja	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nadena masa, [M-H] ⁻	Δ (mDa)	MS ² Fragmenti	MS ³ Fragmenti	MS ⁴ Fragmenti
36	9,66	Metoksi kempferol*	315,05103	315,04959	1,44	301, 300 , 181	272 , 256, 216, 202, 166	244 , 216, 166, 137, 110
37	9,70	Kempferol ^a , *	285,04046	285,03885	1,61	255 , 227	211 , 195, 167	211, 137
38	9,74	Pinobanksin ^a , *	271,06120	271,05883	2,37	253 , 243, 225, 215, 197	225, 205(50), 197 , 185, 181	179, 169 , 151
39	9,87	Izorametnin ^a , *	315,05103	315,04910	1,93	301, 300	283, 271 , 255, 22, 151	243 , 227, 216, 199
40	9,94	Hrizoeriol ^a , *	299,05611	299,05493	1,18	285, 284	255 , 227	255, 237 , 211, 187
41	10,19	Dimetil-kvercetin	329,06668	329,06500	1,68	315, 314 , 299	299, 285 , 271, 257, 243	270
42	10,65	Ramnetin*	315,05103	315,04916	1,87	300, 207, 193, 165 , 121	150, 121 , 97, 91, 65	91
43	10,67	Ramnocitrin	299,05611	299,05447	1,64	284	256	239 , 227, 212, 200, 188
44	10,75	Genkvanin ^a , *	283,06119	283,05994	1,25	268 , 239, 211	239 , 211	239, 211 , 196
45	11,02	Tricin*	329,06668	329,06488	1,80	315, 314	299 , 285, 271	271 , 255, 243
46	11,30	Benzil-kafeat	269,08193	269,08063	1,30	225, 179, 178, 161, 134	121, 111, 106	–
47	11,61	Hrizin ^a , *	253,05063	253,04953	1,10	253, 209 , 181, 165, 151	181 , 165, 153, 141	171, 153 , 152, 139
48	11,70	Pinocembrin ^a , *	255,06628	255,06508	1,20	213 , 187, 151, 145, 107	185 , 169, 145	185, 157, 143 , 141, 117
49	11,82	Kempferid ^a , *	299,05611	299,05484	1,27	284 , 271, 255, 240 165	255, 240, 227, 164, 151	107 , 83, 65
50	11,84	Galangin ^a , *	269,04554	269,04425	1,29	241, 227, 213 , 197, 169	211, 198, 185, 169 , 143	–
51	12,20	Acacetin ^a , *	283,06119	283,05994	1,25	268	239 , 211	239, 211 , 196
52	12,72	Pinobanksin 3- <i>O</i> -propionat*	327,08741	327,08551	1,90	271, 253	225, 209 , 181 165 151	181 , 180, 165, 153, 141

^a Potvrđeno korišćenjem standarda, druga jedinjenja su identifikovana prema masenoj spektrometriji visoke rezolucije (HRMS) i MSⁿ; Br. - broj pika, t_R - vreme zadržavanja, Δ – razlika u masi.

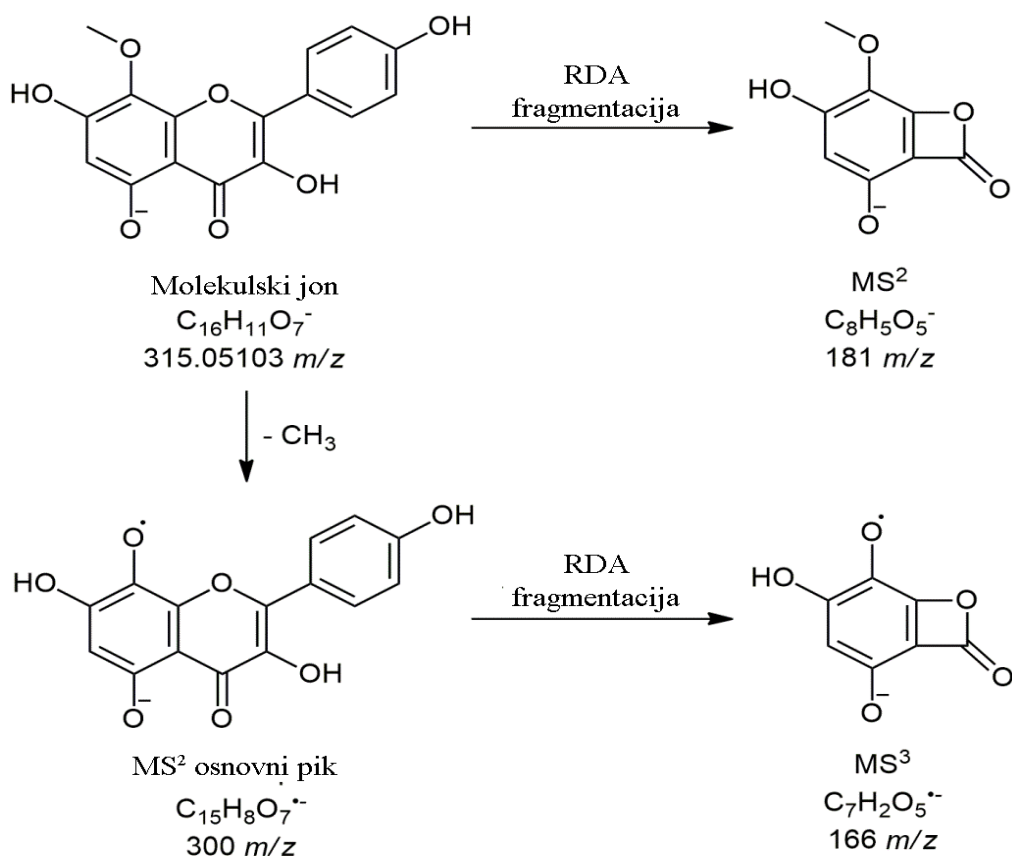
* Jedinjenja identifikovana u svim uzorcima.

Tokom identifikacije flavonoidnih glikozida primenjena su neka već objavljena pravila masene fragmentacije, kao što su određivanje prirode međuglikozidne veze (136) i karakterizacija položaja glikozilacije (137). U **Tabeli 12** prikazani su brojevi pikova, vremena zadržavanja (t_R , min), nazivi jedinjenja, izračunate i tačne mase ($[M - H]^-$, m/z), greške izračunatih masa, i glavni MS^2 , MS^3 i MS^4 fragmenti koji su korišćeni za identifikaciju fenolnih jedinjenja u odsustvu standarda.

Fenolne kiseline i njihovi derivati identifikovani su u svim ispitivanim uzorcima medljikovaca (**Tabela S1, Prilog**). Pored jednostavnih fenolnih kiselina (derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimne kiseline), identifikovano je i nekoliko glikozida. Tako, na primer, dva derivata heksozida kofeinske kiseline (341 m/z , jedinjenja **4** i **7**) su identifikovana na 4,74 min i 5,10 min, redom (**Tabela 12**). Oba su proizvela fragment osnovnog pika MS^2 na 179 m/z , što odgovara masi koja je nastala gubitkom heksozne jedinice (162 Da) i sekundarnih MS^2 pikova na 161 i 135 m/z , što odgovara jonima [kofeinska kiselina - H - H_2O] $^-$ i [kofeinska kiselina - H - CO_2] $^-$, redom. U ovom slučaju, osnovni pik MS^3 bio je na 135 m/z . Pored pronađenih glikozida fenolne kiseline, identifikovano je i potvrđeno nekoliko drugih jedinjenja primenom standarda: eskulin i njegov glikozid (eskulin 6-*O*-glukozid), koniferil-aldehid i 5-*O*-kafoilkinska kiselina. Benzil-kafeat (269 m/z , jedinjenje **46**), za koji se zna da potiče iz propolisa (138) je identifikovan u pet uzoraka na 11,30 min. On je proizveo osnovni pik MS^2 na 178 m/z (nastao gubitkom benzil grupe) i pik na 134 m/z (što je rezultovalo daljim gubitkom molekula CO_2).

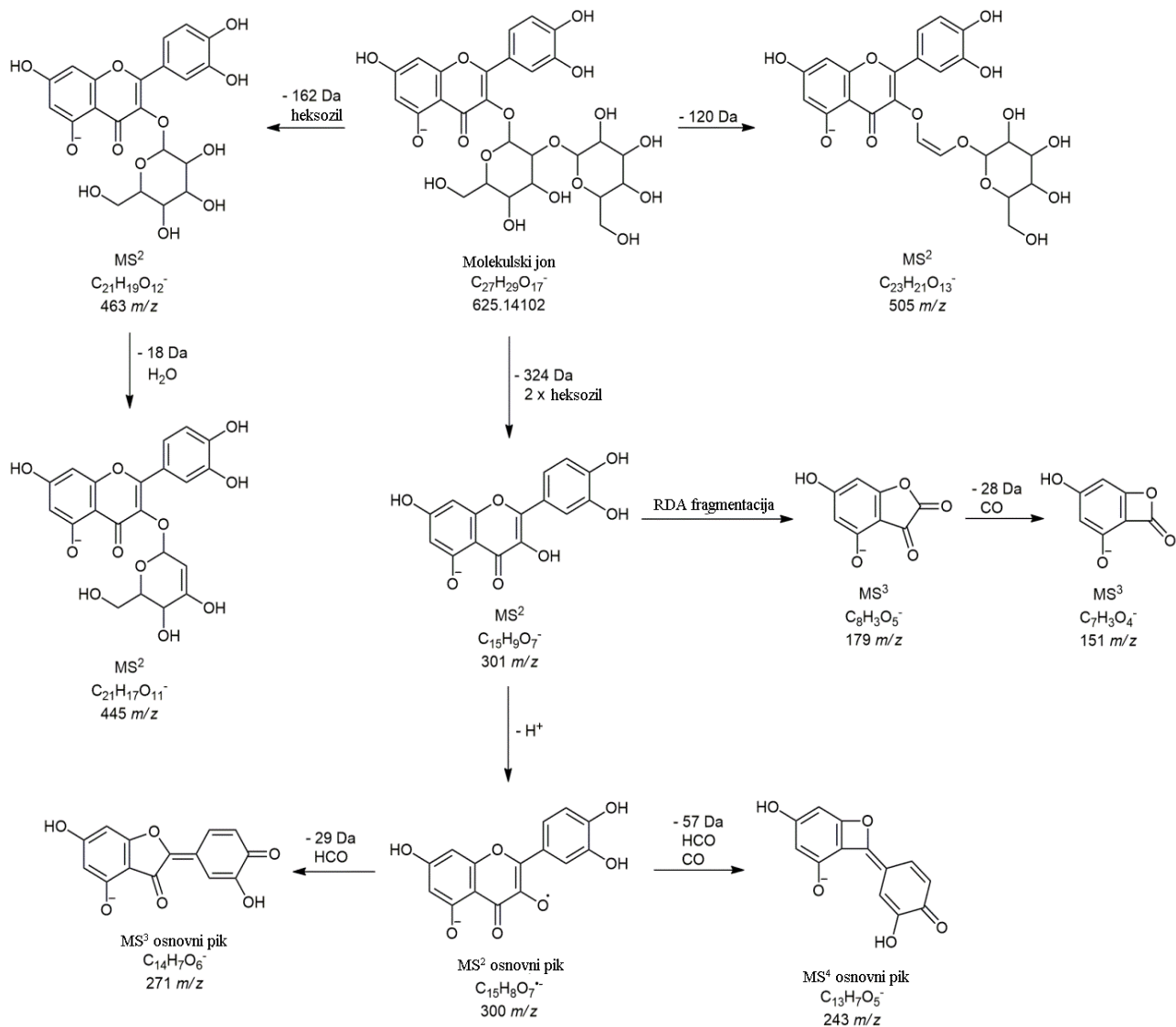
Većina identifikovanih flavonoidnih aglikona potiče od propolisa (139). Tokom identifikacije flavonoidnih aglikona, korišćeni su MS podaci dobijeni iz dostupne literature koja opisuje specifičnu retro-*Diels-Alder*-ovu (RDA) fragmentaciju (140,141). Sličan flavonoidni profil nekih uzoraka medljikovaca je već opisan u literaturi (76). Jedinjenje **36** na 9,66 min i 315 m/z je identifikovano u svim uzorcima. Ispitivanjem empirijske formule ovog jedinjenja, zaključeno je da ono može biti *O*-metilovani flavonol. On daje osnovni pik MS^2 na 300 m/z , koji najverovatnije odgovara $[M-H-CH_3]^-$ fragmentu i sekundarni MS^2 pik na 181 m/z . U MS^3 spektru ovog jedinjenja može se primetiti odsustvo fragmenta na 151 m/z , što ukazuje da je flavonoidno jezgro *O*-metil supstituisano na B prstenu. Takođe se može primetiti da na 165 m/z nedostaje fragment koji se može formirati *O*-metil supstitucijom A prstena flavonoida (142). Fragment u MS^3 spektru na 166 m/z ukazuje da je prsten flavonoida najverovatnije supstituisan sa dve hidroksilne i jednom metoksi grupom (**Slika 13**, fragmentacija je prikazana na primeru 8-metoksi kamferola).

Možemo pretpostaviti da je sekundarni MS^2 fragment na 181 m/z formiran RDA fragmentacijom flavonoida i to je zapravo $[^{1,3}A]^-$ fragment, dok je na 166 m/z verovatno fragment $[^{1,3}A-CH_3]^-$. Na osnovu svega navedenog, ovo jedinjenje je označeno kao metoksi-kamferol.



Slika 13. Predložena fragmentacija za jedinjenje **36** (135)

U cilju identifikacije flavonoidnih glikozida (strukture aglikona i glikozidnih delova, kao i interglikozidne veze između dva šećera) korišćeni su podaci o fragmentaciji mase koji su već opisani u literaturi (143). Brojni derivati flavonoidnih glikozida su identifikovani u ekstraktima medljikovaca; ramnozidi (gubitak od 146 Da), heksozidi (gubitak od 162 Da), pentosilheksozidi (gubitak od 294 Da), ramnosilheksozid (gubitak od 308 Da) i diheksozidi (gubitak od 324 Da). Na primer, u MS^2 spektru jedinjenja **15** na 5,83 min i $625\ m/z$, može se uočiti osnovni fragment na 301 i $300\ m/z$ (koji odgovara deprotonovanom kvercetin) i dodatna tri fragmentna jona koji su nastali gubitkom 180, 162 i 120 Da. Ova specifična fragmentacija ukazuje na prisustvo 1→2 interglikozidne veze između dva šećera na 3-O položaju kvercetina. U MS^3 spektru ovog jedinjenja, primećen je osnovni pik na $271\ m/z$ (nastao gubitkom 29 Da, HCO), dok je osnovni MS^4 pik na $243\ m/z$, nastao gubitkom molekula CO (28 Da). Dalja fragmentacija od $300\ m/z$ potvrdila je prisustvo kvercetina kao aglikona, zbog uočenih fragmenata nastalih RDA fragmentacijom na 179 i $151\ m/z$. Na osnovu MS fragmentacije ovo jedinjenje je identifikovano kao kvercetin 3-O-(2"-heksozil) heksozid (**Slika 14**).



Slika 14. Fragmentacioni put jedinjenja **15** (135)

Prisustvo određenih fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima medljikovca prikazano je u **Tabeli S1**. Određeno fenolno jedinjenje smatrano je prisutnim u medljikovcu određene biljne vrste ako je nađeno u više od 80% uzoraka određene biljne vrste. U svim uzorcima identifikovano je četrdeset i jedno jedinjenje. Važno je napomenuti da je u uzorcima primorskog hrasta nađeno svih 52 jedinjenja. Međutim, neka od ovih jedinjenja su pronađena samo u uzorcima jedne ili dve biljne vrste. Kvercetin 3-*O*-(2"-heksozil) heksozid (jedinjenje **15**) je identifikovano samo u uzorcima primorskog hrasta i primorskog javora. Slično tome, luteolin 7-*O*-ramnozid (jedinjenje **27**), kamferol 7-*O*-ramnozid (jedinjenje **29**), tehtohrizin (jedinjenje **32**) i dimetil kvercetin (jedinjenje **41**) identifikovani su samo u uzorcima medljikovaca od primorskog hrasta, dok je pinobanksin 3-*O*-propionat (jedinjenje **52**) pronađen u uzorcima medljikovaca od hrasta sladuna i primorskog hrasta. Pomenuta jedinjenja se mogu smatrati potencijalnim markerima određene biljne vrste medljikovca.

4.5. Kvantifikacija fenolnih jedinjenja

Analiza fenolnih jedinjenja je dalje nastavljena primenom ciljane analize, analitičkog pristupa koji se u metabolomici koristi za merenje koncentracije ograničenog broja poznatih metabolita na osnovu referentnih standarda. Kvantifikacija 25 ciljanih jedinjenja, izabranih na osnovu njihove zastupljenosti u analiziranim uzorcima medljikovaca, izvršena je UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom (**Tabela 13**). Kvalitativna analiza ukazuje na prisustvo fenolnih jedinjenja navedenih u **Tabeli 12**, međutim, određena jedinjenja identifikovana prema njihovim spektralnim karakteristikama nisu kvantifikovana zbog niskog sadržaja (ispod granice kvantifikacije). Iako ispitivani uzorci uglavnom sadrže ista fenolna jedinjenja, količina pojedinačnih jedinjenja mogla bi ukazati na razlike između biljnih vrsta medljikovaca i mogla bi da se koristi kao marker određene biljne vrste.

Među kvantifikovanim jedinjenjima, fenolne kiseline kao što su **HPA**, **HBA**, **CA**, **VA**, **CouA**, **FA** i **PrA**, bile su prisutne u najvećoj količini, praćene flavonoidima **Kue**, **Chry** i **Pin**. Sadržaj **HPA**, **Api** i **Gen** bio je viši u uzorcima medljikovca od jele i crnogorice u odnosu na *Quercus spp.* i primorski javor. Slično tome, **CQA**, **CouA** i **FA** bili su više zastupljeni u medljikovcu jele, crnogorice i hrasta sladuna u odnosu na primorski hrast i primorski javor. Kvercetin i **Narn** bili su prisutni u većoj količini u *Quercus spp.* u poređenju sa drugim ispitivanim biljnim vrstama, dok je **PrA** bio prisutan u dva do sedam puta većoj količini u uzorcima medljikovca od hrasta sladuna (**Tabela 13**).

Tabela 13. Sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorcima medjиковaca (mg/kg)

Biljno poreklo	Parametar	Fenolna jedinjenja													
		PrA	CQA	HBA	HPA	CA	VA	Rut	Cou A	Nar	FA	SA	Que- 3-rha	Erio	Lut
Jela (n = 22)	srednja vrednost	0,175	0,021	0,348	3,514	0,211	0,181	0,002	0,760	0,021	0,455	0,010	0,002	0,016	0,016
	medijana	0,185	0,015	0,314	3,933	0,223	0,183	0,007	0,710	0,024	0,325	0,009	0,001	0,018	0,011
	standardna devijacija	0,100	0,020	0,200	3,000	0,100	0,070	0,005	0,500	0,020	0,400	0,010	0,005	0,006	0,030
	min vrednost	0,004	0,004	0,003	0,003	0,005	0,003	0,002	0,004	0,004	0,004	0,006	0,002	0,004	0,002
	max vrednost	0,373	0,077	0,682	6,869	0,390	0,293	0,015	2,111	0,047	1,337	0,034	0,014	0,022	0,111
Crnogorica (n = 17)	srednja vrednost	0,117	0,032	0,410	2,429	0,247	0,277	0,002	0,902	0,033	0,601	0,011	0,005	0,020	0,037
	medijana	0,130	0,019	0,381	2,180	0,229	0,222	0,007	0,852	0,028	0,625	0,011	0,003	0,018	0,025
	standardna devijacija	0,080	0,030	0,200	3,000	0,100	0,200	0,004	0,500	0,020	0,300	0,020	0,006	0,020	0,040
	min vrednost	0,004	0,008	0,251	0,154	0,110	0,125	0,002	0,284	0,017	0,122	0,006	0,002	0,004	0,002
	max vrednost	0,251	0,082	0,643	7,292	0,428	0,739	0,015	2,076	0,071	1,169	0,037	0,021	0,058	0,134
Primorski hrast (n = 15)	srednja vrednost	0,051	0,013	0,448	0,131	0,210	0,171	0,006	0,581	0,018	0,328	0,015	0,006	0,021	0,024
	medijana	0,066	0,011	0,422	0,125	0,191	0,167	0,006	0,470	0,017	0,256	0,016	0,004	0,017	0,013
	standardna devijacija	0,050	0,020	0,100	0,050	0,100	0,060	0,006	0,500	0,020	0,400	0,020	0,006	0,009	0,040
	min vrednost	0,004	0,004	0,317	0,054	0,148	0,097	0,003	0,284	0,004	0,123	0,006	0,006	0,016	0,002
	max vrednost	0,119	0,045	0,584	0,222	0,550	0,286	0,016	2,341	0,057	1,591	0,036	0,014	0,042	0,160
Hrast sladun (n = 4)	srednja vrednost	0,299	0,026	0,412	0,254	0,273	0,250	0,007	0,900	0,041	0,590	0,006	0,008	0,019	0,006
	medijana	0,354	0,018	0,405	0,260	0,280	0,253	0,009	0,848	0,039	0,557	0,006	0,009	0,019	0,007
	standardna devijacija	0,300	0,030	0,080	0,100	0,200	0,030	0,005	0,300	0,020	0,400	0,000	0,007	0,003	0,005
	min vrednost	0,004	0,006	0,323	0,131	0,116	0,212	0,004	0,647	0,028	0,252	0,006	0,006	0,016	0,002
	max vrednost	0,488	0,062	0,515	0,366	0,420	0,281	0,010	1,255	0,059	0,991	0,006	0,014	0,022	0,010
Primorski javor (n = 6)	srednja vrednost	0,041	0,013	0,361	0,529	0,165	0,227	0,004	0,582	0,026	0,335	0,008	0,005	0,013	0,050
	medijana	0,024	0,013	0,294	0,230	0,158	0,159	0,004	0,585	0,018	0,327	0,005	0,006	0,018	0,030
	standardna devijacija	0,050	0,009	0,300	0,700	0,040	0,300	0,005	0,200	0,030	0,200	0,020	0,006	0,011	0,060
	min vrednost	0,004	0,004	0,162	0,065	0,128	0,094	0,002	0,308	0,004	0,175	0,006	0,006	0,004	0,005
	max vrednost	0,119	0,022	0,802	1,700	0,208	0,672	0,010	0,908	0,079	0,475	0,025	0,014	0,024	0,138

Tabela 13. Nastavak

Biljno poreklo	Parametar	Fenolna jedinjenja										
		Que	Narn	Api	Gen	Kfrl	Chry	Pin	Aca	Genkw	Gal	Kfrd
Jela (n = 22)	srednja vrednost	0,412	0,028	0,068	0,029	0,058	0,241	0,321	0,011	0,014	0,086	0,008
	medijana	0,358	0,025	0,050	0,016	0,061	0,231	0,320	0,010	0,013	0,075	0,001
	standardna devijacija	0,400	0,030	0,060	0,040	0,040	0,200	0,300	0,006	0,007	0,080	0,006
	min vrednost	0,008	0,002	0,003	0,003	0,020	0,002	0,002	0,006	0,004	0,003	0,002
	max vrednost	1,414	0,065	0,175	0,139	0,119	0,439	0,956	0,025	0,029	0,312	0,016
Crnogorica (n = 17)	srednja vrednost	0,575	0,039	0,111	0,036	0,098	0,231	0,300	0,011	0,015	0,096	0,008
	medijana	0,426	0,031	0,077	0,022	0,073	0,208	0,185	0,010	0,012	0,061	0,009
	standardna devijacija	0,500	0,030	0,090	0,040	0,070	0,200	0,300	0,010	0,020	0,100	0,004
	min vrednost	0,009	0,011	0,026	0,003	0,027	0,041	0,035	0,006	0,004	0,012	0,002
	max vrednost	1,779	0,085	0,338	0,106	0,250	0,630	1,104	0,045	0,058	0,357	0,016
Primorski hrast (n = 15)	srednja vrednost	1,103	0,069	0,032	0,008	0,155	0,272	0,298	0,007	0,011	0,100	0,011
	medijana	0,960	0,035	0,200	0,003	0,134	0,240	0,226	0,009	0,012	0,069	0,010
	standardna devijacija	0,700	0,090	0,040	0,020	0,200	0,200	0,300	0,008	0,008	0,100	0,005
	min vrednost	0,410	0,010	0,009	0,003	0,060	0,058	0,066	0,006	0,004	0,020	0,002
	max vrednost	3,194	0,282	0,127	0,043	0,595	0,667	1,161	0,020	0,023	0,414	0,019
Hrast sladun (n = 4)	srednja vrednost	1,093	0,078	0,039	0,003	0,103	0,198	0,267	0,014	0,016	0,107	0,011
	medijana	1,219	0,090	0,036	0,003	0,106	0,175	0,270	0,016	0,019	0,121	0,014
	standardna devijacija	0,600	0,050	0,025	0,000	0,045	0,200	0,200	0,006	0,007	0,062	0,009
	min vrednost	0,280	0,016	0,012	0,003	0,046	0,089	0,076	0,005	0,006	0,020	0,002
	max vrednost	1,656	0,116	0,070	0,003	0,155	0,353	0,452	0,019	0,021	0,166	0,017
Primorski javor (n = 6)	srednja vrednost	0,576	0,027	0,051	0,004	0,091	0,237	0,258	0,015	0,017	0,085	0,008
	medijana	0,667	0,020	0,041	0,003	0,085	0,234	0,240	0,013	0,016	0,074	0,009
	standardna devijacija	0,308	0,030	0,030	0,003	0,060	0,100	0,200	0,008	0,008	0,057	0,005
	min vrednost	0,092	0,005	0,030	0,003	0,020	0,106	0,101	0,006	0,007	0,033	0,002
	max vrednost	0,908	0,070	0,098	0,010	0,181	0,405	0,554	0,026	0,031	0,183	0,014

Rezultati dobijeni u drugim studijama ukazuju na veliki varijabilitet u sadržaju fenolnih jedinjenja u medljikovcima (65,144,145). Pored toga, u većini radova autori deklarišu uzorke samo kao medljikovac, bez definisanja biljnog porekla istih. Međutim, kod onih sa definisanim biljnim poreklom, ispitivane vrste nisu bile iste kao vrste iz naše studije i iz tog razloga bilo je teško uporediti naše rezultate sa onima koji su ranije objavljeni. Samo su Kus i saradnici (146), objavili sadržaj nekoliko fenolnih jedinjenja u uzorcima medljikovca od jele iz Grčke sa rezultatima sličnim onima dobijenim u našoj studiji (sadržaj kofeinske kiseline iznosio je 0,2 mg/kg, protokatehinske 4,1 – 8,1 mg/kg i *p*-hidroksi-benzoeve kiseline 7,2 – 9,0 mg/kg. Treba takođe naglasiti da ne postoji izveštaj koji sadrži tako veliki broj kvantifikovanih fenolnih jedinjenja niti detaljnija studija o fenolnom profilu medljikovca od primorskog hrasta, hrasta sladuna i primorskog javora.

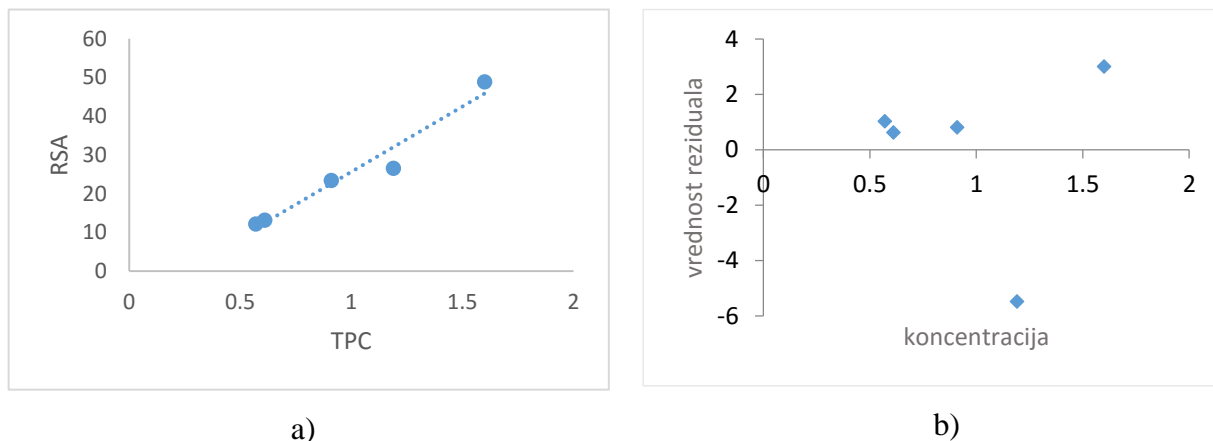
4.6. Antioksidativna aktivnost medljikovaca

Razvijene su mnoge spektroskopske metode za procenu antioksidativne aktivnosti fenolnih jedinjenja. UV/VIS spektroskopija je veoma pogodna za takva istraživanja zbog prisustva π konjugovanih aromatičnih prstenova supstituisanih sa OH-grupama. Ove metode se zasnivaju ili na sposobnosti fenolnih jedinjenja da inhibiraju stvaranje slobodnih radikala ili na njihovu sposobnost da ih uklone. Fenolna jedinjenja, međutim, često pokazuju nedosledan antioksidativni kapacitet u zavisnosti od primenjenog testa, zbog različitih reakcionih sistema i prisustva više oksidanata (147). Svi navedeni problemi prevazilaze se primenom elektrohemijskih procesa oksidacije. Primena ciklične voltametrije (CV) u analizi fenolnih jedinjenja je rezultat elektronske delokalizacije na aromatičnom jezgru, koja se može lako oksidovati na inertnim elektrodama (148). Prednost CV u odnosu na spektroskopske metode je da ne zahteva karakterizaciju antioksidativne aktivnosti svake komponente u odnosu na specifičnu radikalsku vrstu kiseonika, što je osnova metodologije merenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta (149). Ciklična voltametrija je jednostavna i brza metoda i može se koristiti direktno u biološkim i sirovim uzorcima.

U tom smislu, različiti pristupi, dve *in vitro* spektroskopske metode (sadržaj ukupnih fenola i merenje antioksidativne aktivnosti) i elektrohemijska metoda su korišćene za procenu antioksidativnog kapaciteta ispitivanih uzoraka medljikovaca. Rezultati TPC, RSA i CV u zavisnosti od biljne vrste prikazani su u **Tabeli 14**.

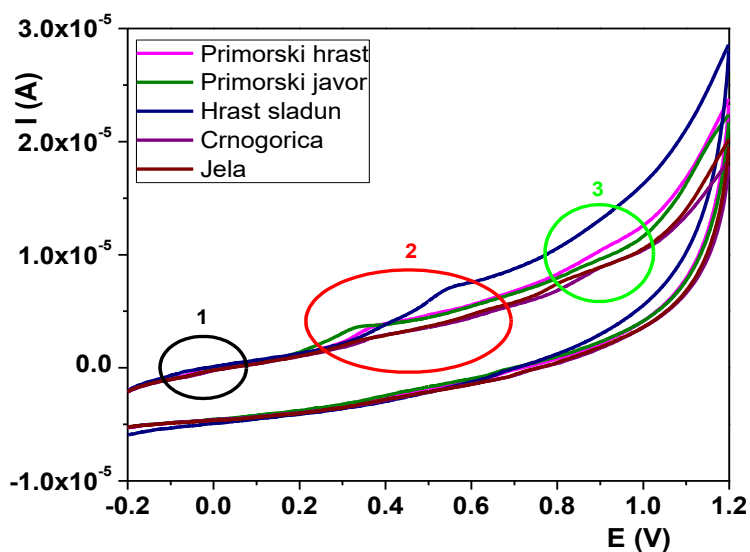
Srednja vrednost TPC kretala se u rasponu od 0,57 do 1,60 mg GAE/g meda (**Tabela 14**). Najveća srednja vrednost TPC (1,60 mg GAE/g) uočena je u uzorcima hrasta sladuna, visoka vrednost je izmerena i u uzorcima primorskog hrasta (1,19 mg GAE/g meda), dok su jela i crnogorica pokazale slične, ali niže vrednosti (0,61 i 0,57 mg GAE/g meda, redom). Visok sadržaj ukupnih fenola u medu od hrasta sladuna u odnosu na druge biljne vrste u saglasnosti su sa prethodnim istraživanjima. Naime, za razliku od većine drugih biljnih vrsta medljikovaca koje nastaju iz sekreta biljnih sisajućih insekata, med od hrasta dobija se prvenstveno sakupljanjem šećernih supstanci koje luči hrast u stresnim uslovima (150). Izveštaj o hrastu lužnjaku (*Quercus robur* L.) takođe ukazuje na visok sadržaj fenolnih jedinjenja i visok antioksidativni kapacitet (45). Prethodno objavljeni rezultati ukazuju na širok opseg vrednosti za ukupne fenole u zavisnosti od biljne vrste medljikovca, ali uglavnom sadrže veće količine fenolnih jedinjenja u odnosu na cvetni med (6,45,143,151). Aktivnost vezivanja radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila u ispitivanim uzorcima medljikovaca kreće se u rasponu od 12,20 do 48,89% (**Tabela 14**). Uočene su izvesne razlike između srednjih vrednosti antioksidativne aktivnosti u zavisnosti od biljnog porekla uzorka, sa trendom koji je identičan onima uočenim u vrednostima TPC. Srednje vrednosti RSA za jelu i crnogoricu bile su najniže i slične (13,14% i 12,20%, redom), dok je najviša vrednost pronađena za hrast sladun (48,89%). Generalno, vrste iz porodice *Quercus* pokazale su veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa drugim ispitivanim biljnim vrstama, što je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima za druge uzorke meda od hrasta (45,150). Uzorci koji su pripadali *Quercus spp.* su bili tamnije boje u odnosu na druge biljne vrste medljikovaca, što su potvrdili i drugi autori (45,150). Poznato je da medovi tamne boje imaju veću antioksidativnu aktivnost (6,151).

Korelacija između vrednosti TPC i RSA rezultovala je linearnim modelom $Y = 33,707X - 8,0502$ sa sledećim regresionim parametrima: $r = 0,8598$, $s = 0,18$, $t = 13,04$ ($t_{cr(0,05;64)} = 1,99$), $F = 170,12$. Visoka vrednost parametra r ukazuje na zadovoljavajući kvalitet kalibracione prave, vrednost parametra t koja je veća od t_{cr} ukazuje na statistički značajnu linearnu zavisnost između antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenola u uzorku, grafički prikaz zavisnosti aktiviteta od sadržaja potvrđuje da je reč o linearnom odnosu, F vrednost ukazuje na dobar kvalitet kalibracione prave, dok grafička inspekcija rezidualnih vrednosti ukazuje na odsustvo bilo kakvog trenda, tj. reziduali se raspoređuju prema normalnoj raspodeli (Slika 15).



Slika 15. a) Grafik zavisnosti i b) grafik reziduala za RSA i TPC

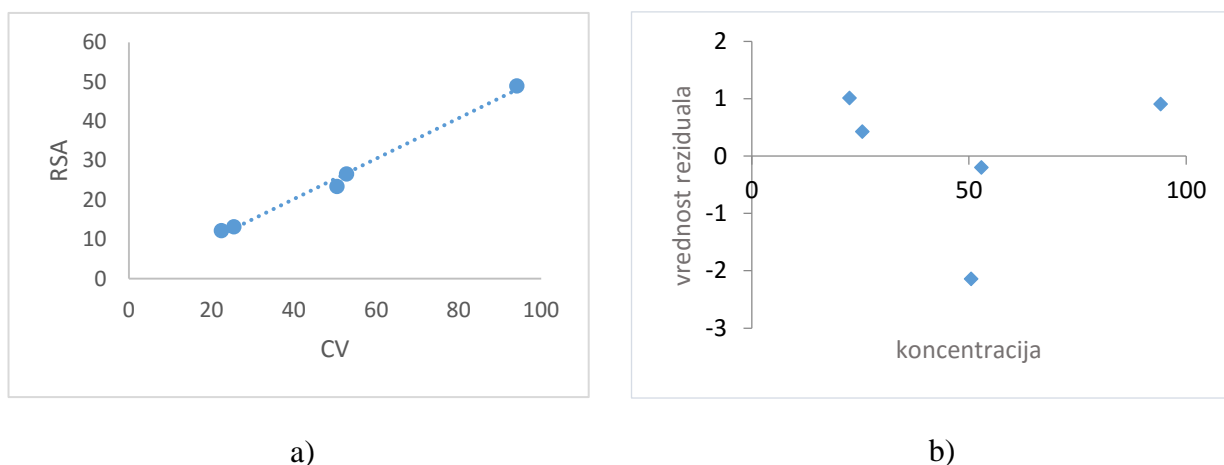
Uočena visoka korelacija između pomenutih parametara ukazala je na značajan doprinos flavonoida i fenolnih kiselina, među ostalim aktivnim fitohemikalijama, u antioksidativnom potencijalu medljikovaca. Sličan zaključak su izveli i drugi autori (6). Na Slici 16 prikazani su ciklični voltamogrami slučajno odabranih medljikovaca. Za procenu antioksidativnog kapaciteta korišćena je površina ispod krive koja odgovara naelektrisanju anodnog talasa, a koja je pronađena na svim voltamogramima. Na voltamogramima uzoraka medljikovaca uočena su četiri oksidaciona pika u tri različita regiona: oko $-0,1 - 0,1$ V (1); oko $0,3 - 0,6$ V (2) i oko $0,9$ V (3) (Slika 16).



Slika 16. Ciklični voltamogram pet biljnih vrsta medljikovca (135)

Pikovi na najvišem potencijalu mogu se pripisati prisustvu **HPA** i **CouA** u visokim koncentracijama, regioni srednjeg potencijala prisustvu **FA** i **SA** i njihovom sinergetskom efektu u nekim uzorcima, dok pikovi niskog intenziteta na najnižem potencijalu prisustvu **Rut** (152). Pored toga, CV je ukazala na postojanje nekoliko oksidacionih procesa koji se razlikuju u medljikovcima različitog biljnog porekla što ukazuje na različite antioksidativne kapacitete uzoraka.

Kao i u slučaju RSA testa, najviše CV vrednosti su dobijene za med od hrasta sladuna, tj. uzorke koji pripadaju *Quercus spp.*, dok su najniže vrednosti uočene u uzorcima meda od jele i crnogorice. Dobijeni rezultati su, takođe, upoređeni sa rezultatima dobijenim RSA testom posmatranjem njihove međusobne zavisnosti. Korelacija između vrednosti RSA i CV rezultirala je linearnim modelom $Y = 0,5314X - 0,3381$ sa sledećim regresionim parametrima: $r = 0,9499$, $s = 4,43$, $t = 33,75$ ($t_{cr(0,05;64)} = 1,99$), $F = 1139,15$. Veoma visoka vrednost parametra r ukazuje na zadovoljavajući kvalitet kalibracione prave, vrednost parametra t koja je daleko veća od t_{cr} ukazuje na statistički značajnu linearnu zavisnost između antioksidativne aktivnosti određene dvema metodama, grafički prikaz zavisnosti RSA od CV potvrđuje da je reč o linearnom odnosu, F vrednost koja je više od 300 puta veća od kritične vrednosti ukazuje na dobar kvalitet kalibracione prave, dok grafička provera rezidualnih vrednosti ukazuje na odsustvo bilo kakvog trenda, tj. reziduali se raspoređuju prema normalnoj raspodeli (Slika 17). Antioksidativna aktivnost određena elektrohemijском pristupom u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim spektrofotometrijski.



Slika 17. a) Grafik zavisnosti i b) grafik reziduala RSA i CV

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost ukazuju na postojanje različitih hemijskih profila uzoraka medljikovaca u zavisnosti od njihovog biljnog porekla i ukazuju na mogućnost procene autentičnosti u pogledu opisa. Pored toga, potvrđeno je da se CV kao veoma brza, jednostavna, pouzdana i osetljiva metoda može koristiti u analizi bioaktivnih jedinjenja, kao i određivanju antioksidativnog kapaciteta. Ciklična voltometrija bi mogla biti metoda izbora za određivanje biološke aktivnosti medljikovca kako bi se prevazišli problemi vezani za spektroskopske metode (76).

Tabela 14. Parametri deskriptivne statistike za TPC, RSA i CV

Biljno poreklo	Parametar	TPC	RSA	CV
Jela (n = 22)	srednja vrednost	0,61	13,14	25,42
	medijana	0,58	10,88	20,59
	standardna devijacija	0,17	4,62	9,07
	min vrednost	0,43	8,63	17,06
	max vrednost	1,14	23,32	50,29
Crnogorica (n = 17)	srednja vrednost	0,57	12,20	22,45
	medijana	0,57	11,15	20,29
	standardna devijacija	0,14	4,23	10,01
	min vrednost	0,29	8,64	9,71
	max vrednost	0,79	25,72	50,59
Primorski hrast (n = 15)	srednja vrednost	1,19	26,58	52,82
	medijana	1,28	26,51	53,68
	standardna devijacija	0,25	5,20	10,34
	min vrednost	0,79	17,92	35,00
	max vrednost	1,57	35,32	67,94
Hrast sladun (n = 4)	srednja vrednost	1,60	48,89	94,12
	medijana	1,60	48,89	94,12
	standardna devijacija	0,20	3,83	8,32
	min vrednost	1,46	46,18	88,24
	max vrednost	1,74	51,59	100,00
Primorski javor (n = 6)	srednja vrednost	0,91	23,43	50,47
	medijana	1,04	22,98	44,12
	standardna devijacija	0,29	4,65	18,27
	min vrednost	0,44	18,88	35,88
	max vrednost	1,15	30,96	82,35

4.7. Elementalni sastav medljikovaca

Sadržaj minerala u medu je jedno od svojstava koje treba uzeti u obzir u ocenjivanju njegove nutritivne vrednosti i intenzivno je proučavan od strane mnogih autora (17,153–155). Ukupan sadržaj minerala u medu je relativno nizak i generalno čini 0,1% do 0,2% sastava nektarskog meda, ali može preći 1% u uzorcima medljikovca (156). Mineralni sastav medljikovca je u velikoj meri određen većom količinom kalijuma i fosfora (53).

Sadržaj minerala u ispitivanim vrstama medljikovaca prikazan je u **Tabeli 15**. Najviši ukupni sadržaj elemenata je u uzorcima medljikovaca od primorskog hrasta (uglavnom zbog prisustva K u visokoj koncentraciji), dok je najniži u uzorcima medljikovaca od crnogorice. Kalijum je bio najzastupljenija mineralna komponenta u svim ispitivanim uzorcima (**Tabela 15**), što odgovara drugim studijama koje ukazuju na ovaj element kao najzastupljeniji u svim vrstama meda (53,121). Sadržaj K se kretao između 2504 mg/kg u uzorcima medljikovca od crnogorice i 3090 mg/kg u uzorcima medljikovca od primorskog hrasta. Koncentracije Ca, Mg, P i S bile su u opsegu od 14 do 101 mg/kg, od 48 do 154 mg/kg, od 154 do 245 mg/kg i od 75 do 111 mg/kg, redom. Srednje vrednosti Ca i Mg u analiziranim uzorcima medljikovaca bile su niže u poređenju sa onim dobijenim u medljikovcu iz Bugarske (67). Koncentracija Fe se kreće između 0,9 mg/kg i 2,3 mg/kg što je niže u odnosu na ranije objavljene rezultate (157). Među elementima u tragovima (Al, Zn, Mn i Cu) najviša je srednja vrednost za Mn u uzorcima medljikovca hrasta sladuna (26,0 mg/kg), dok je najniža srednja vrednost uočena u uzorcima medljikovca primorskog javora (0,8 mg/kg). Najveća srednja vrednost za Al bila je u uzorcima medljikovca jele (15 mg/kg), a najmanja u uzorcima medljikovca hrasta sladuna (0,1 mg/kg). Srednje vrednosti za Zn i Cu kretale su se između 1,0 - 1,4 mg/kg i 0,9 - 1,5 mg/kg, što je niže od vrednosti za med iz Bugarske (67). Između ostalih makro- i mikro elemenata, uzorci medljikovca hrasta sladuna sadrže mnogo veće količine Ca, Mg, S i Mn, dok medljikovci jele i crnogorice, verovatno zbog visokog udela jele, sadrže visoku koncentraciju Al i nisku koncentraciju P u poređenju s drugim biljnim vrstama.

Od ukupno 20 elemenata, 10 elemenata su bili elementi u tragovima: As, Ba, Cd, Co, Cr, Hg, Ni, Pb, Se i Sr, sa srednjim vrednostima nižim od 0,4 mg/kg. Srednje vrednosti za Ba, Pb, Sr i Hg bile su veće u uzorcima medljikovca hrasta sladuna nego u medljikovcima drugih ispitivanih biljnih vrsta i bile su 1,3, 0,6, 0,2 i 0,09 mg/kg, redom, dok su srednje vrednosti za Ni bile više u uzorcima medljikovca jele. Treba naglasiti da u uzorcima medljikovca hrasta sladuna Se nije detektovan, za razliku od medljikovaca drugih biljnih vrsta u kojima je određena količinu ovog elementa pronađena. Svi rezultati su u opsegu do sada objavljenih rezultata za elementalni sastav meda (84).

Dobijeni rezultati potvrđuju da medljikovac ima veći sadržaj minerala u odnosu na cvetni med i ta činjenica se može smatrati jednom od glavnih nutritivnih prednosti ove vrste meda nad cvetnim medom. Minerali su sastavni deo esencijalnih enzima koji igraju važnu ulogu u funkcionisanju organizma kroz brojne metaboličke procese, a koji se moraju uneti hranom. Nasuprot drugim organskim hranljivim sastojcima minerali su neuništivi; ne podležu degradaciji prilikom izlaganja toploti, svetlosti, oksidacionim sredstvima ili ekstremnim pH (158). Sa nutritivnog aspekta, Cr, Mn i Se su važni, naročito za decu do petnaest godina starosti (159). Sadržaj minerala u medu je nizak i njegov doprinos preporučenom dnevnom unosu je zanemarljiv. Međutim, sadržaj Mn u uzorcima hrasta sladuna je viši u poređenju sa ostalim ispitivanim biljnim vrstama iz ovog istraživanja, ali i od sadržaja Mn u većini cvetnih medova (84). Preporučeni dnevni unos Mn prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (*eng. European Food Safety Authority, EFSA*) (160) iznosi 1,5 - 6 mg/dan, što je količina koja se nalazi u 100 g meda od hrasta sladuna. Hrom i Se su prisutni u maloj količini i u analiziranim biljnim vrstama medljikovca se ne mogu smatrati nutritivno relevantnim komponentama. Sumpor je važan nutritijent u ljudskoj ishrani, ali ne postoji preporučen dnevni unos za ovaj element (159). U uzorcima meda od hrasta sladuna sadržaj S je visok (11,1 mg/100 g meda) što bi moglo da doprinese nutritivnoj vrednosti ove biljne vrste medljikovca.

Tabela 15. Parametri deskriptivne statistike za sadržaj minerala (mg/kg)

Biljno poreklo	Parametar	Ca	Fe	K	Mg	P	S	Al	Zn	Mn	Cu
Jela (n = 22)	srednja vrednost	14,0	1,60	2712	51,0	154	81,0	15,0	1,20	2,70	1,50
	medijana	11,0	1,40	2775	51,0	151	83,0	15,0	1,20	2,60	1,50
	standardna devijacija	14,0	2,00	450	11,0	29	15,0	8,0	0,30	0,90	0,50
	min vrednost	1,0	0,50	1861	25,0	114	52,0	5,0	0,90	1,40	0,50
	max vrednost	56,0	5,70	3333	75,0	205	108,0	32,0	1,90	5,30	2,00
Crnogorica (n = 17)	srednja vrednost	19,0	2,00	2504	53,0	161	75,0	9,0	1,40	3,00	1,30
	medijana	16,0	1,90	2493	53,0	157	75,0	10,0	1,20	2,60	1,10
	standardna devijacija	14,0	2,00	695	14,0	50	21,0	6,0	0,60	2,00	0,70
	min vrednost	1,0	0,20	1110	33,0	104	43,0	0,9	0,70	0,60	0,50
	max vrednost	50,0	4,90	4117	79,0	246	135,0	21,0	2,40	6,80	2,70
Primorski hrast (n = 15)	srednja vrednost	36,0	2,30	3090	56,0	245	86,0	0,40	1,70	1,10	1,00
	medijana	31,0	1,40	3189	59,0	227	91,0	0,20	1,60	0,90	1,00
	standardna devijacija	22,0	4,00	516	18,0	82	19,0	0,60	2,00	1,00	0,40
	min vrednost	8,0	0,01	1789	27,0	142	54,0	0,04	0,70	0,30	0,60
	max vrednost	85,0	15,8	3687	99,0	372	119,0	1,40	5,70	3,70	1,80
Hrast sladun (n = 4)	srednja vrednost	101,0	2,00	2937	154	238	111,0	0,10	1,00	26,0	1,20
	medijana	94,0	3,00	3042	152	236	114,0	0,06	0,90	25,0	1,10
	standardna devijacija	23,0	2,00	261	21	45	10,0	0,20	0,60	3,0	0,30
	min vrednost	83,0	1,00	2549	134	193	97,0	0,06	0,50	24,0	1,00
	max vrednost	132,0	3,00	3112	177	288	118,0	0,40	1,70	31,0	1,50
Primorski javor (n = 6)	srednja vrednost	24,0	0,90	2905	48,0	236	81,0	1,70	1,40	0,80	0,90
	medijana	25,0	0,80	3134	51,0	233	80,0	0,30	1,20	0,60	0,80
	standardna devijacija	7,0	0,60	781	13,0	70	26,0	3,00	0,80	0,50	0,30
	min vrednost	13,0	0,30	1817	31,0	153	54,0	0,09	0,80	0,40	0,60
	max vrednost	30,0	1,90	3632	61,0	319	124,0	5,00	2,80	1,60	1,20

Tabela 15. Nastavak

Biljno poreklo	Parametar	As	Ba	Cd	Co	Cr	Hg	Ni	Pb	Se	Sr
Jela (n=22)	srednja vrednost	0,0030	0,070	0,010	0,020	0,060	0,030	0,400	0,0010	0,0020	0,0300
	medijana	0,0030	0,020	0,010	0,020	0,060	0,020	0,400	0,0004	0,0003	0,0200
	standardna devijacija	0,0030	0,200	0,004	0,006	0,030	0,030	0,200	0,0030	0,0040	0,0400
	min vrednost	0,0010	0,001	0,007	0,010	0,030	0,004	0,040	0,0004	0,0001	0,0007
	max vrednost	0,0110	0,400	0,020	0,040	0,100	0,100	0,700	0,0200	0,0100	0,2000
Crnogorica (n=17)	srednja vrednost	0,0030	0,090	0,010	0,020	0,060	0,030	0,300	0,0004	0,0020	0,0300
	medijana	0,0030	0,030	0,010	0,020	0,060	0,020	0,300	0,0004	0,0001	0,0200
	standardna devijacija	0,0020	0,200	0,004	0,020	0,006	0,020	0,200	0,0001	0,0070	0,0300
	min vrednost	0,0009	0,001	0,008	0,009	0,050	0,004	0,060	0,0004	0,0001	0,0030
	max vrednost	0,0090	0,300	0,020	0,050	0,060	0,070	0,600	0,0004	0,0300	0,0800
Primorski hrast (n=15)	srednja vrednost	0,0020	0,090	0,009	0,010	0,060	0,020	0,100	0,0004	0,0040	0,0600
	medijana	0,0020	0,080	0,007	0,009	0,060	0,020	0,070	0,0004	0,0040	0,0500
	standardna devijacija	0,0020	0,090	0,005	0,007	0,030	0,020	0,200	0,0005	0,0030	0,0400
	min vrednost	0,0005	0,001	0,005	0,005	0,040	0,003	0,040	0,0004	0,0001	0,0200
	max vrednost	0,0060	0,300	0,020	0,030	0,100	0,070	0,500	0,0006	0,0090	0,1000
Hrast sladun (n=4)	srednja vrednost	0,0010	1,300	0,007	0,009	0,060	0,090	0,200	0,6000	0,0001	0,2000
	medijana	0,0010	1,300	0,008	0,008	0,060	0,040	0,100	0,1000	0,0001	0,2000
	standardna devijacija	0,0020	0,300	0,002	0,003	0,006	0,200	0,070	2,0000	0,0001	0,0200
	min vrednost	0,0005	1,100	0,004	0,006	0,050	0,009	0,100	0,0004	0,0001	0,1000
	max vrednost	0,0030	1,600	0,009	0,010	0,060	0,300	0,200	2,200	0,0001	0,2000
Primorski javor (n=6)	srednja vrednost	0,0060	0,060	0,008	0,010	0,060	0,020	0,080	0,0004	0,0060	0,0300
	medijana	0,0020	0,040	0,008	0,009	0,060	0,020	0,060	0,0004	0,0040	0,0300
	standardna devijacija	0,0200	0,070	0,002	0,004	0,030	0,030	0,060	0,0001	0,0090	0,0200
	min vrednost	0,0006	0,001	0,006	0,007	0,040	0,007	0,030	0,0004	0,0001	0,0200
	max vrednost	0,0300	0,200	0,010	0,020	0,100	0,060	0,200	0,0004	0,0200	0,0500

4.8. Ekstrakcija i GCxGC analiza isparljivih komponenti

Pre analize isparljivih komponenti neophodno je ukloniti šećere, koji predstavljaju glavne komponente meda, da ne bi smetali pri određivanju isparljivih jedinjenja. Ekstrakcija isparljivih komponenti, pre analize gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom, može da se vrši nizom različitih tehnika, od kojih svaka ima određene prednosti i mane. Neke od ovih tehnika su tečno-tečna ekstrakcija i *Likens-Nickerson*-ova destilacija-ekstrakcija kod kojih je glavna mana što zahtevaju zagrevanje, a izlaganje toploti može dovesti do formiranja derivata furana i pirana usled dejstva povišene temperature na šećere i amino-kiseline. Nestabilna jedinjenja lako se oksiduju ili raspadaju pri čemu nastaju neka nova koja ne pripadaju prvobitnom sastavu meda. Dodatna mana ovih metoda je upotreba rastvarača koji mogu rastvoriti neisparljiva jedinjenja i kontaminirani GC. Takođe, neki analiti mogu biti maskirani rastvaračem i tako nedetektovani, a mogu biti i izgubljeni pri uparavanju rastvarača. Pored toga, rastvarači su skupi i toksični, a oni koji se najčešće koriste su: *n*-heksan, aceton, pentan, dietil-etar, hloroform, metanol i dihlormetan.

U većini radova najčešće korišćen metod ekstrakcije je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (*eng. Solid Phase Micro Extraction, SPME*). Glavne prednosti SPME tehnike su eliminisanje upotrebe toksičnih organskih rastvarača, mogućnost kvantifikacije velikog broja molekula, brza priprema uzoraka i značajno kraće vreme analize. Za analizu je neophodna mala količina uzorka i cena analize je niska, međutim efikasnost SPME je uslovljena drugim parametrima kao što su npr. vrsta vlakana, temperatura ekstrakcije, vreme ekstrakcije i mogućnost desorpcije analita (161).

U okviru ove doktorske disertacije za ekstrakciju isparljivih komponenti korišćena je ultrazvučna tečna ekstrakcija koja iako zahteva upotrebu rastvarača, što predstavlja nedostatak, značajno redukuje vreme ekstrakcije i u velikoj meri unapređuje efikasnost ekstrakcije, pošto mehanički efekat ultrazvuka omogućava bolje razdvajanje i ekstrakovanje. Ne zahteva zagrevanje i omogućava izolovanje molekula i male i velike molekulске mase što predstavlja jednu od dobrih karakteristika. Takođe, ova metoda ekstrakcije koristi rastvarače manje polarnosti koji ne mogu ekstrahovati ni vodu ni šećere iz meda.

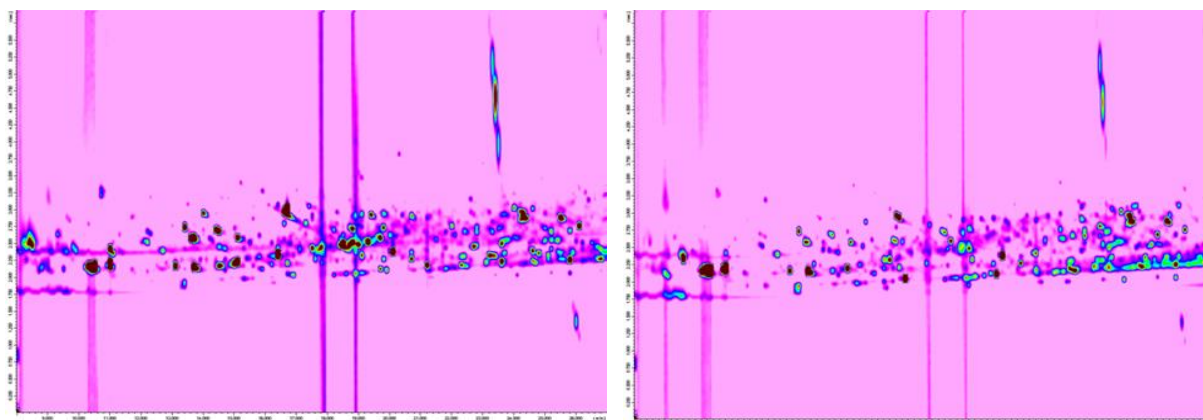
Nakon ultrazvučne ekstrakcije sa metilen-hloridom isparljiva organska jedinjenja prisutna u uzorcima medljikovaca analizirana su primenom GCxGC-MS. Hromatogrami uzoraka, po jedan reprezentativan primer od svake analizirane biljne vrste, dati su na **Slici 18**. Vizuelnom procenom hromatograma, profil medljikovca od primorskog javora bio je najbogatiji isparljivim komponentama, dok je medljikovac od primorskog hrasta sadržavao najmanje zona. Takođe, može se uočiti sličnost hromatograma medljikovca od jele i medljikovca od crnogorice prema rasporedu i intenzitetu zona koje odgovaraju isparljivim komponentama, što ukazuje na visok sadržaj jele u medljikovcu od crnogorice. Medljikovac od hrasta sladuna ima jedinstven profil specifičan po zonama koje se javljaju u prvom delu hromatograma.

Identifikacija pojedinačnih pikova na hromatogramu izvršena je upoređivanjem njihovih masa sa masama iz spektara NIST baze podataka. Za svaki ispitivani uzorak, kao rezultat pretrage baze podataka dobijene su sledeće informacije:

- hromatogram,
- naziv jedinjenja čiji su spektri najbliži spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz hromatograma; sličnost spektara koji se upoređuju izraženi su verovatnoćom u procentima,
- vreme zadržavanja pojedinačne komponente i
- relativni udeo pojedinačne komponente izražen u procentima.

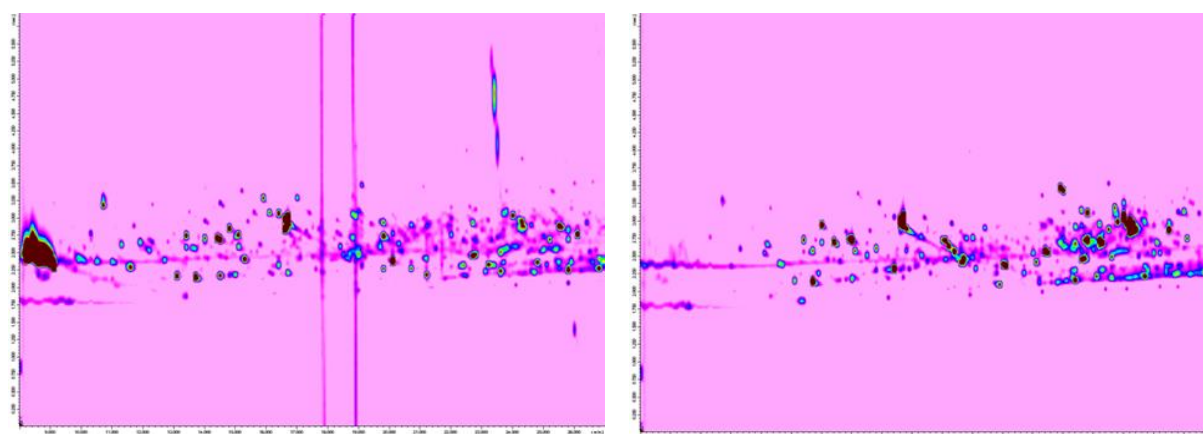
Spisak isparljivih jedinjenja čiji su spektri pokazivali sličnost sa spektrima nepoznate komponente na hromatogramima medljikovaca veću od 85% dat je u **Tabeli S2 (Prilog)**. Većina pronađenih jedinjenja u ispitivanim uzorcima medljikovaca spadaju u grupe šećera, alkohola, ketona, terpena, aldehida i derivate benzena što je u skladu sa literaturnim podacima (7,69). Može se uočiti da se pored određenog broja jedinjenja koja su detektovana u svim biljnim vrstama (kao što su

derivati furana, benzaldehid, razgranati alkoholi), određen broj jedinjenja razlikuje u zavisnosti od biljne vrste medljikovaca. Jedinjenja koja su pokazala najveći varijabilitet u zavisnosti od vrste medljikovaca su V6, V9, V10, V20, V23, V26, V27, V29, V33, V37, V47 (Tabela S2).



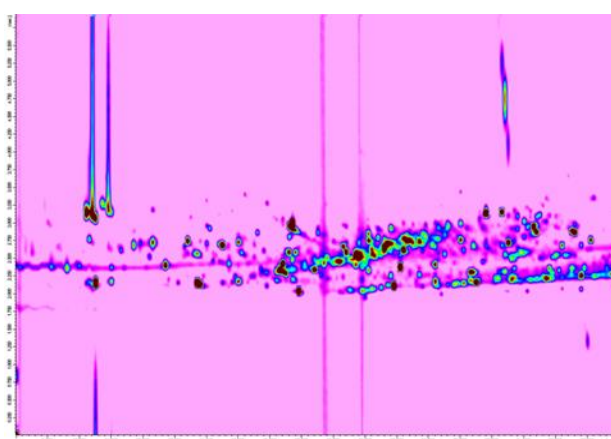
Crnogorica (Conifers)

Jela (*Abies alba*)



Hrast sladun (*Quercus frainetto*)

Primorski hrast (*Quercus ilex*)



Primorski javor (*Acer monspessulanum*)

Slika 18. GCxGC hromatogrami uzoraka medljikovaca

4.9. Statistička obrada rezultata

Parametri deskriptivne statistike su pružili generalne informacije o hemijskom sastavu i fizičko-hemijskim parametrima ispitivanih biljnih vrsta medljikovaca i ukazale na neka specifična jedinjenja i parametre koji se razlikuju u zavisnosti od biljnog porekla uzorka. Međutim, najznačajniji faktori kojima bi mogli nedvosmisleno okarakterisati medljikovce prema biljnom poreklu, odnosno odrediti autentičnost, nisu mogli biti definisani. Da bi se utvrdilo da li se neki od ispitivanih parametara može koristiti za razlikovanje ispitivanih vrsta medljikovaca, tj. pripadnost određenoj biljnoj vrsti, urađeni su *Kruskal-Wallis* test, PCA, PLS-DA i NPCA. *Kruskal-Wallis*-ovim testom ispitivane vrste medljikovaca su međusobno upoređivane prema svakom parametru pojedinačno, dok su multivarijantne metode upotrebljene za posmatranje varijabiliteta unutar seta parametara. Neparometrijski test je primenjen usled značajnog odstupanja od normalne raspodele svake od posmatranih varijabli. U slučajevima kod kojih je *Kruskal-Wallis*-ov test ukazivao na statistički značajne razlike u medijanima posmatranih grupa, primenjen je *post-hoc* Z-test.

Analiza glavnih komponenata je primenjena u cilju utvrđivanja kriterijuma za diferencijaciju medljikovaca prema biljnom poreklu. Ova multivarijantna metoda daje uvid u strukturu podataka pri čemu se ne koristi kao klasifikacioni model, već kao nagoveštaj šta se može očekivati od podataka, kao i da se proverí postojanje nekih logičkih obrazaca u podacima koji bi se mogli objasniti. Primena PCA može ukazati na sličnosti između posmatranih uzoraka koje su uslovljene kako njihovim hemijskim sastavom, kao posledica biljnih vrsta prisutnih u području pčelinjaka, tako i specifičnim klimatskim uslovima. U slučaju analize nominalnih (kategoričkih) varijabli, primenjena je nelinearna PCA kojom se redukuje broj promenljivih u manji broj nekorelisanih glavnih komponenata u cilju utvrđivanja odnosa koji postoje između biljnih vrsta medljikovaca.

Različite biljne vrste medljikovaca su takođe modelovane primenom PLS-DA. Zavisno promenljiva u PLS regresionom modelu bila je kategorička varijabla, tj. klasa ili kategorija, odnosno biljna vrsta kojoj uzorak pripada. Cilj PLS-DA metode bio je dobijanje matematičkog modela koji bi se iskoristio za klasifikaciju nepoznatog uzorka, kao i za utvrđivanje najznačajnijih parametara koji razdvajaju uzorke prema biljnom poreklu.

4.9.1. Analiza fizičko-hemijskih parametara

Rezultati dobijeni primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa na fizičko-hemijske parametre određene za pet ispitivanih vrsta medljikovaca prikazani su u **Tabeli 16**. Analizom dobijenih rezultata potvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između različitih biljnih vrsta medljikovaca u vrednostima medijana parametara: električna provodljivost, specifična optička rotacija i slobodna i ukupna kiselost ($p < 0,05$). Električna provodljivost i specifična optička rotacija su, inače, jedina dva parametra po kojima se razlikuju cvetni med i medljikovac, a prema dobijenim rezultatima i različite vrste medljikovca. Za fizičko-hemijske parametre sadržaj vode, laktonska kiselost i pH vrednost ne postoji statistička značajna razlika u vrednostima medijana. Rezultati Z-testa (**Tabela 16**, vrste koje se međusobno statistički značajno razlikuju navedene su u zagradi) ukazuju na postojanje značajne razlike između uzoraka meda od jele i crnogorice u odnosu na med od vrsta iz roda *Quercus spp.* (parametri EP, SK i UK), dok se medljikovci od dve vrste hrasta razlikuju prema vrednosti specifične optičke rotacije.

Tabela 16. Prikaz rezultata *Kruskal-Wallis*-ovog testa

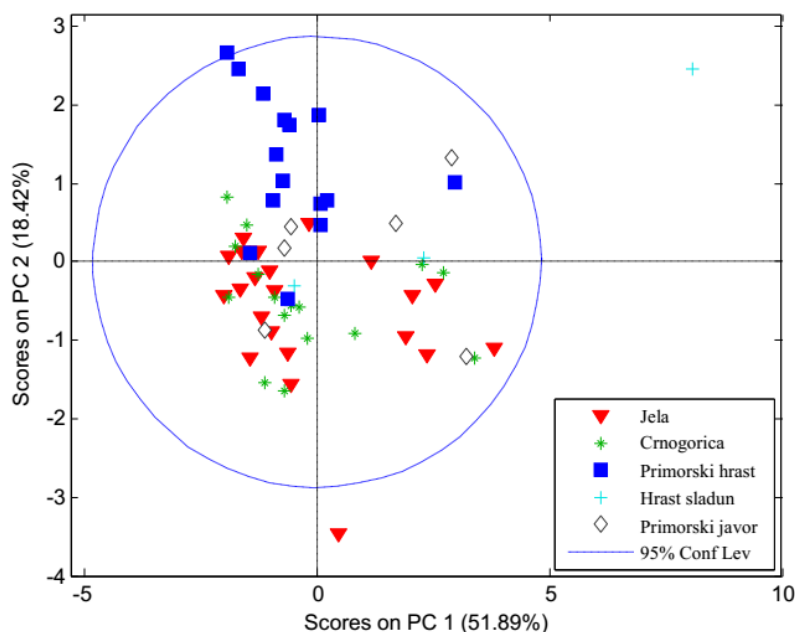
Parametar	<i>Kruskal-Wallis</i>	
	P	Z-test ^a
EP	< 0,0001	PH(J,JP,C) ^b
SK	0,0211	J,C(PH,HS)
SR	0,0233	HS(C,PH)
UK	0,0262	J(PH,HS) C(PH)

^a Medijane se značajno razlikuju ako je z-vrednost > 1,9600

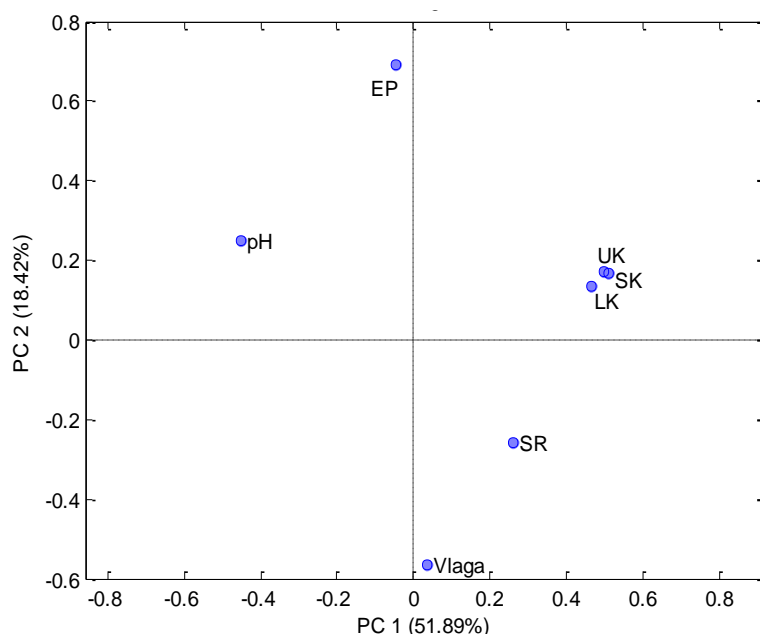
^b Jela (J); Crnogorica (C); Primorski javor (JP); Hrast sladun (HS); Primorski hrast (PH).

U cilju dobijanja sveobuhvatne slike o mogućnosti primene fizičko-hemijskih parametara za grupisanje uzoraka medljikovaca prema biljnom poreklu, urađena je multivarijantna analiza podataka, tj. analiza glavnih komponentata.

Dobijeni PCA model sastoji se iz dve glavne komponente kojima se objašnjava 70,31% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva glavna komponenta (PC1) obuhvata 51,89% varijabiliteta, dok druga glavna komponenta objašnjava 18,42%. Informacije sadržane u preostalim varijablama nisu bile od značaja za analizu posmatranih podataka. Uzajamne projekcije skorova i odgovarajućih koeficijenata latentnih varijabli, za prve dve glavne komponente, date su na **Slici 19a** i **19b**.



Slika 19a. PCA primenjena na vrednosti fizičko-hemijskih parametara - grafik skorova



Slika 19b. PCA primenjena na vrednosti fizičko-hemijskih parametara - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

Na grafiku skorova se može uočiti jasno definisan klaster koji obuhvata uzorke medljikovca od primorskog hrasta što ukazuje da je na osnovu vrednosti fizičko-hemijskih parametara moguće okarakterisati ovu biljnu vrstu (**Slika 19a**). Najznačajnija varijabla koja doprinosi izdvajanju pomenutih uzoraka je električna provodljivost (**Slika 19b**). Između preostalih biljnih vrsta postoje izvesna preklapanja Hotelling-ove T2 elipse i karakteriše ih veći varijabilitet u fizičko-hemijskim karakteristikama, što je naročito izraženo kod medljikovca od hrasta sladuna (**Slika 19a**). Položaj parametara koji ukazuju na pH vrednost uzoraka, sa jedne strane, i njihovu slobodnu, laktonsku i ukupnu kiselost, sa druge, na grafiku koeficijenata latentnih varijabli, potvrđuje činjenicu da ovi parametri nisu u direktnoj vezi (**Slika 19b**).

Usled činjenice da su medovi složene prirodne smeše koje sadrže veliki broj jedinjenja, diferencijaciju i klasifikaciju je teško izvesti posmatrajući samo jednu klasu jedinjenja. Konvencionalni parametri kvaliteta su uglavnom davali bolje rezultate kada su primenjivani sami u cilju klasifikacije medova prema biljnom poreklu, za razliku od ostalih parametara hemijskog profila koji daju bolje rezultate kada su međusobno kombinovani (7,162,163). Među posmatranim biljnim vrstama medljikovaca, međutim, fizičko-hemijski parametri nisu sadržavali dovoljno informacija za razlikovanje uzoraka. Međutim, električna provodljivost se može koristiti kao brza i pouzdana alatka za potvrdu biljnog porekla medljikovca od primorskog hrasta.

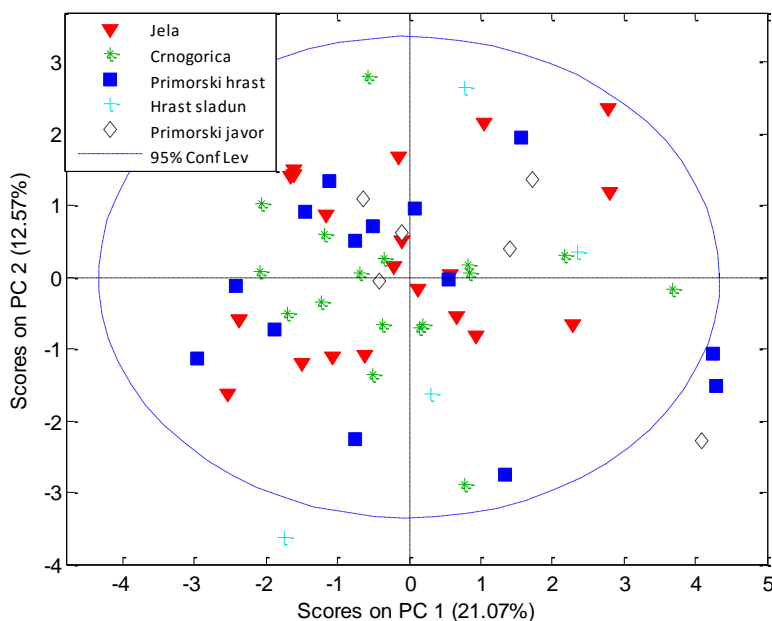
4.9.2. Analiza šećernog profila

Rezultati dobijeni primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa na sadržaj pojedinačnih šećera detektovanih u ispitivanim uzorcima medljikovaca pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana za ispitivane vrste medljikovaca ($p > 0,05$). Međutim, mogućnost primene sadržaja šećera na grupisanje uzoraka medljikovaca prema biljnom poreklu provereno je i analizom svih parametara šećernog profila korišćenjem PCA.

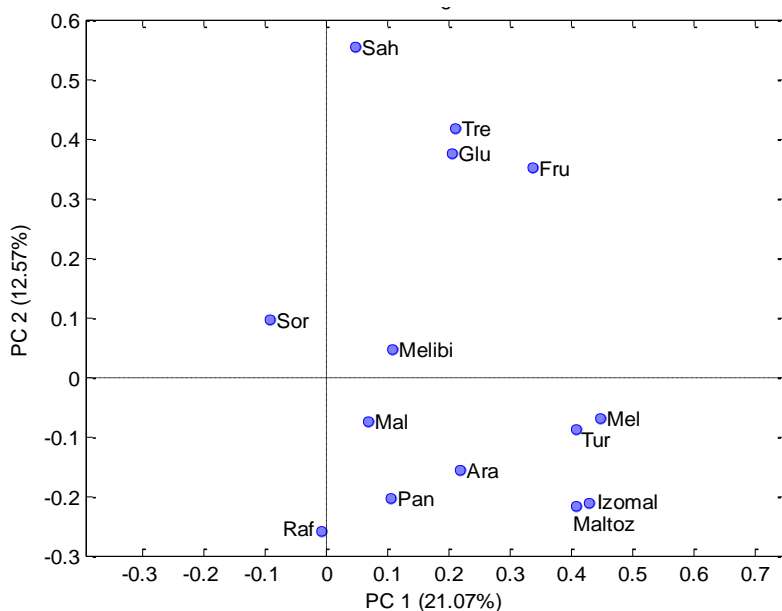
Dobijeni model se sastoji iz dve glavne komponente kojima se objašnjava 33,64% ukupnog varijabiliteta među podacima. Mala količina varijabiliteta objašnjena prvim dvema glavnim komponentama ukazuje na loš kvalitet dobijenog modela. Prva glavna komponenta (PC1) obuhvata 21,07% varijabiliteta, dok druga glavna komponenta objašnjava 12,57% varijabiliteta. Na grafiku skorova (**Slika 20a**) se ne može uočiti jasno definisan klaster ni za jednu ispitivanu biljnu vrstu, između svih ispitivanih biljnih vrsta postoje izvesna preklapanja Hotelling-ove T2 elipse i karakteriše

ih veliki varijabilitet u sastavu šećera (**Slika 20b**). Sa izuzetkom glavnih šećera, **Fru** i **Glu**, svi ostali šećeri su pokazali veliki raspon među rezultatima (**Tabela 10**) unutar svake biljne vrste koji je onemogućio statističku diferencijaciju biljnih vrsta prema ovoj grupi hemijskih jedinjenja.

Dobijeni rezultati potvrđuju rezultate iz literature (7) koji ukazuju na činjenicu da je teško odrediti autentičnost meda prema biljnom i geografskom poreklu samo na osnovu sadržaja šećera. Veliki varijabilitet u sastavu šećera među medljikovcima iste biljne vrste, ali sa različitim geografskih lokacija, i male razlike u profilu šećera među različitim vrstama iz istog regiona, onemogućava identifikaciju šećera koji bio mogli da budu biomarkeri određene biljne vrste.



Slika 20a. PCA primenjena na vrednosti kvantifikovanih šećera - grafik skorova



Slika 20b. PCA primenjena na vrednosti kvantifikovanih šećera - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

4.9.3. Analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika

Rezultati dobijeni primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa na $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina izolovanih iz medljikovaca i $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti samih medljikovaca (**Tabeli 17**) ukazuju na postojanje statistički značajne razlike između uzoraka medljikovaca različitog bijnog porekla prema izotopskom sastavu ugljenika u proteinskoj frakciji meda. Na osnovu ovog parametra (*Z*-test, **Tabela 17**) moguće je razlikovati med od hrasta sladuna i primorskog hrasta od crnogorice, primorskog javora i jele.

Rezultati primenjenog statističkog testa potvrđuju činjenicu da se proteini izolovani iz meda mogu koristiti kao karakteristika biljnih vrsta koje se koriste za proizvodnju. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ proteina izolovanih iz analiziranih uzoraka medljikovaca mogu biti vredan pokazatelj biljnog porekla, posebno medljikovaca iz roda *Quercus spp.*

Tabela 17. Prikaz rezultata *Kruskal-Wallis*-ovog testa

Parametar	<i>Kruskal-Wallis</i>	
	P	Z-test ^a
$\delta^{13}\text{C}$ protein	0,03	HS (C, JP, J) ^b PH (C, J)

^a Medijane se značajno razlikuju ako je z-vrednost > 1,9600

^b Jela (J); Crnogorica (C); Primorski javor (JP); Hrast sladun (HS); Primorski hrast (PH).

4.9.4. Analiza sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

Rezultati dobijeni primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa na vrednosti sadržaja 25 fenolnih jedinjenja, sadržaja ukupnih fenola (TPC), kao i na dva parametra antioksidativne aktivnosti (RSA i CV), prikazani su u **Tabeli 18**. Statistički značajna razlika u vrednostima medijana posmatranih klasa uzoraka medljikovaca utvrđena je za **PrA, HPA, VA, CouA, FA, Lut, Nar, Que, Api, Gen, Kfrl, TPC, RSA i CV**. Jedanaest fenolnih jedinjenja i antioksidativni kapacitet mogu biti označeni kao faktori koji se mogu upotrebiti za diferencijaciju i klasifikaciju pet biljnih vrsta medljikovaca. Svi navedeni parametri ukazuju na postojanje značajne razlike između uzoraka meda od jele i crnogorice u odnosu na med od vrsta iz roda *Quercus spp.* (*Z*-test, **Tabela 18**). Takođe, na osnovu većine parametara moguće je razlikovati med od primorskog javora od ostalih biljnih vrsta (*Z*-test, **Tabela 18**). Fenolna jedinjenja su jedan od retkih faktora koja omogućavaju diferencijaciju ove retke vrste medljikovaca.

Tabela 18. Prikaz rezultata *Kruskal-Wallis*-ovog testa

Parametar	<i>Kruskal-Wallis</i>	
	P	Z-test ^a
PrA	< 0,0001	J(JP,HS,PH) ^b
HPA	< 0,0001	J(JP,HS,PH) C(JP,HS,PH)
VA	0,0196	C,HS(JP,PH)
CouA	0,0003	PH(J,C,HS)
FA	0,0032	PH(J,C,HS)
Lut	0,0434	HS(JP,C)
Nar	0,0024	HS(J,JP,PH)
Que	0,0016	J(PH,HS)
Api	< 0,0001	J(PH,C)
Gen	0,0061	J,C(JP,HS,PH)
Kfrl	0,0027	J(PH,C)
TPC	< 0,0001	J,C(JP,HS,PH)
RSA	< 0,0001	J,C(JP,HS,PH)
CV	< 0,0001	J,C(JP,HS,PH)

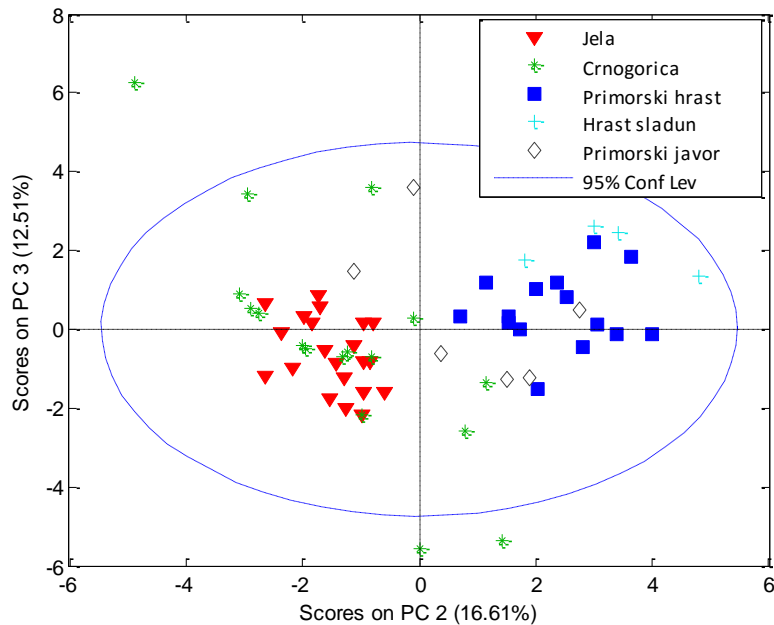
^a Medijane se značajno razlikuju ako je z-vrednost > 1,9600

^b Jela (J); Crnogorica (C); Primorski javor (JP); Hrast sladun (HS); Primorski hrast (PH).

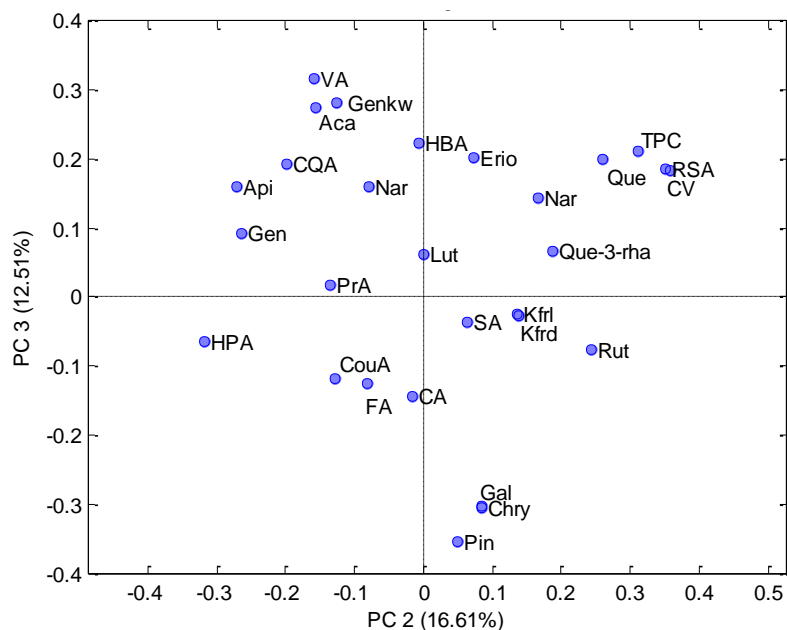
PCA je rezultirala petokomponentnim modelom koji objašnjava 68,45% ukupnog varijabiliteta među podacima. Glavne komponente (PC1-PC5) su slične udele varijabiliteta među podacima (24,17%, 16,61%, 12,51%, 9,09%, 6,07%, redom). Najviše informacija o biljnom poreklu ispitivanih uzoraka pružile su PC2 i PC3. Na **Slici 21a** uočava se grupisanje uzoraka iz roda *Quercus spp.*, hrasta sladuna i primorskog hrasta, koji su duž PC2 ose razdvojeni od uzoraka meda od jele i crnogorice. Uzorci meda od jele formirali su kompaktni klaster koji se preklapa sa uzorcima meda od crnogorice. Preklapanje dve pomenute vrste medljikovaca potvrđuje pretpostavku da uzorci meda od crnogorice sadrže veliki udeo jele. Međutim, rasutost uzoraka na grafiku skorova ukazuje na prisustvo i velikog broja drugih biljnih vrsta različitih hemijskih profila (bor, smreka, ariš, itd.), zastupljenih u manjem procentu. Uzorci meda od primorskog javora grupisani su između uzoraka iz roda *Quercus spp.*, sa jedne strane grafika skorova, i uzoraka od crnogorice sa jelom, sa druge. Rasutost uzoraka na grafiku može ukazati na heterogeni fenolni sastav ove vrste medljikovaca. Parametri antioksidativne aktivnosti zajedno sa sadržajem ukupnih fenola, **Que**, **Narn**, **Kue-3-rha**, **Rut**, **Kfrl** i **Kfrd**, karakterišu uzorke iz roda *Quercus spp.* (**Slika 21b**). Na odvajanje uzoraka hrasta sladuna posebno je uticala visoka vrednost tri parametra kvaliteta prehrambenog proizvoda (TPC, RSA, CV), što ukazuje na specifičnu hranjivu vrednost ove retke vrste meda. Hrast sladun rasprostranjen je u jugoistočnoj Evropi (deo Italije, Balkansko poluostrvo, deo Mađarske, Rumunija) i Turskoj, dok je zapadna granica u Požeškoj dolini, Kutjevo, Hrvatska. Ova vrsta medljikovca se proizvodi samo ovde. Karakteristična je i po tome što pčele sa ove bijne vrste skupljaju samo slatki sok koji se formira kada žir otpadne, dok izlučevine biljnih vaši sa ove vrste ne skupljaju. Specifična proizvodnja meda od hrasta sladuna očigledno rezultuje jedinstvenim fenolnim sadržajem i antioksidativnom aktivnošću. Najuticajniji parametri koji razlikuju uzorke meda od jele i crnogorice od drugih biljnih vrsta bili su **Api**, **CQA**, **Gen** i **HPA**. Mora se naglasiti da se **HPA** može smatrati markerom medljikovca od jele zbog njegovog značajno većeg sadržaja u *Abies alba sp.* u poređenju sa drugim biljnim vrstama što je potvrđeno i *Kruskal-Wallis*-ovim testom. Visok sadržaj **HPA** u uzorcima medljikovca od crnogorice je posledica visokog udela jele u ovoj specifičnoj vrsti medljikovca.

Svi uzorci su grupisani duž PC2 ose i u tom smislu se varijable sa najvećim uticajem na ovu PC mogu smatrati biomarkerima određenih biljnih vrsta (**Slika 21b**). Fenolna jedinjenja koja su u pozitivnoj korelaciji sa PC2 definisala su uzorke iz roda *Quercus spp.*, dok su ona sa najvećom negativnom korelacijom definisala medljikovce od jele i crnogorice. Iako predstavlja najveću varijabilnost među podacima, PC1 nije mogla da ukaže na razlike među ispitivanim biljnim vrstama zbog sličnog, pozitivnog uticaja većine promenljivih duž ove ose (**Slika S1, Prilog**). Pored toga, dve grupe parametara sa najvećim pozitivnim (**VA**, **Aca**, **Genkw** i **HBA**), tj. negativnim (**Chry**, **Pin** i **Gal**) uticajem na PC3, su definisale medljikovac od crnogorice i mogu da ukažu na markere nekih biljnih vrsta koje su prisutne u ovoj specifičnoj vrsti (**Slika 21b** i **Slika S1**).

Kako je prethodno navedeno, diferencijaciju i klasifikaciju meda prema biljnom i geografskom poreklu, je zbog složenosti hemijskog sastava ovog prirodnog proizvoda, teško izvršiti uzimajući kao parametar samo jednu klasu jedinjenja. Međutim, dobijeni rezultati su redak primer uspešnog određivanja biljnog porekla medljikovaca zasnovanog samo na sadržaju fenolnih jedinjenja.



Slika 21a. PCA primenjena na vrednosti kvantifikovanih fenolnih jedinjenja - grafik skorova

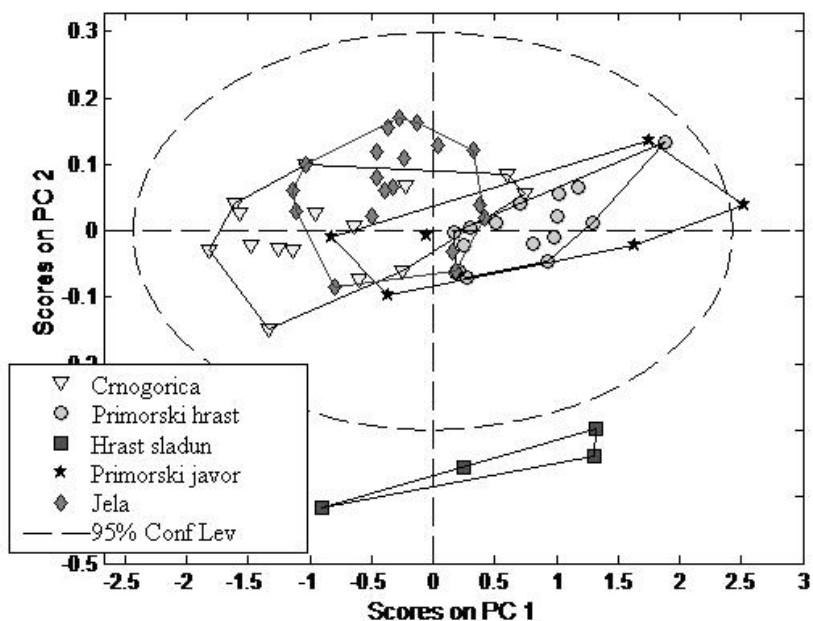


Slika 21b. PCA primenjena na vrednosti kvantifikovanih fenolnih jedinjenja - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

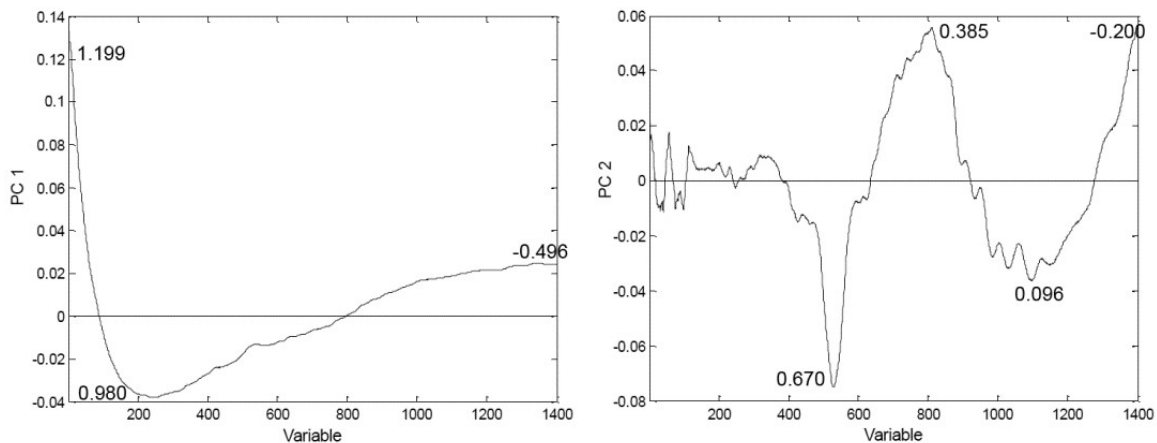
4.9.4.1. Analiza profila dobijenih cikličnom voltametrijom

Pored multivarijantne obrade podataka dobijenih ciljanom analizom ugljenih hidrata i fenola, koristeći pristup analize metaboličkog otiska prsta izvršena je i obrada podataka koji opisuju profile uzoraka medljikovaca dobijene cikličnom voltametrijom. Ovakav pristup u metaboličkim istraživanjima uspešno je primenjen za karakterizaciju propolisa (149). PCA je primenjena na matricu koja se sastojala od 64 uzoraka medljikovaca i 1400 tačaka generisanih iz krive koja odgovara oksidacionoj struji u cilju određivanja biljnog porekla uzoraka. Prvih pet glavnih komponenti je opisalo 86,43% varijabiliteta (PC1 - 58,63% i PC2 - 18,89%) među podacima. Uzorci medljikovca

od hrasta sladuna su se jasno grupisali duž PC2 ose i razdvojili od svih ostalih biljnih vrsta, dok su se duž PC1 ose razdvojili uzorci medljikovca od primorskog hrasta u odnosu na medljikovce od jele i crnogorice čiji se klasteri preklapaju (Slika 22a). Uzorci meda od primorskog javora su rasuti na grafiku skorova zbog čega se ne mogu razdvojiti od ostalih biljnih vrsta, što ukazuje na veliki varijabilitet jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima u ovoj vrsti. Oksidativni potencijali na 0,670 i 0,096 su glavni faktori koji dovode do grupisanja uzoraka medljikovca od hrasta sladuna, jer pokazuju najveći negativan uticaj na PC2, dok pozitivni potencijal od 0,385 razlikuje sve ostale uzorke. Pik na 0,980 ima negativan uticaj na PC1 i može se smatrati bitnim faktorom grupisanja medljikovca od primorskog hrasta u odnosu na medljikovac od jele i crnogorice (Slika 22b).



Slika 22a. PCA primenjena na podatke cikličnih profila - grafik skorova (135)



Slika 22b. PCA primenjena na podatke cikličnih profila - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli (135)

Rezultati PCA analize su pokazali da se profili dobijeni cikličnom voltametrijom mogu uspešno primeniti za klasifikaciju medljikovaca koji potiču od različitih biljnih vrsta.

4.9.5. Analiza elementalnog sastava

Rezultati dobijeni primenom *Kruskal-Wallis*-ovog testa na analizirane elemente prikazani su u **Tabeli 19**. Postojanje statistički značajne razlike u vrednostima medijana različitih biljnih vrsta medljikovaca utvrđeno je za sadržaj Co, Ni, Se, Sr, Al, Mn, Cu, Ca, K, Mg, P, S, Cd i Ba. Na osnovu sadržaja Co, Al, Mn, P i Cd moguće je razlikovati med od jele i crnogorice od medljikovca hrasta sladuna, primorskog hrasta i primorskog javora (*Z*-test, **Tabela 19**). Značajno je naglasiti da se dve vrste iz roda *Quercus spp.* mogu razlikovati na osnovu sadržaja Mn, Mg i Ba, dok je na osnovu sadržaja zemnoalkalnih metala (Ca, Mg, Ba, Sr), kao i Mn i S, moguće razlikovati medljikovac od hrasta sladuna od svih ostalih ispitivanih biljnih vrsta (*Z*-test, **Tabela 19**).

PCA primenjena na rezultate elementalnog sastava pet biljnih vrsta medljikovaca daje model koji se sastoji iz dve glavne komponente kojima se objašnjava 45,79% ukupnog varijabiliteta među podacima (PC1 – 28,57%, PC2 – 17,22%). Na grafiku skorova se može uočiti razdvajanje uzoraka medljikovaca od primorskog hrasta, hrasta sladuna i primorskog javora od meda od jele i crnogorice duž PC1 ose (**Slika 23a**). Za razliku od prethodno analiziranih parametara hemijskog sastava i fizičko-hemijskih karakteristika medljikovaca, uzorci meda od hrasta sladuna se prema sadržaju zemnoalkalnih metala i Mn, Pb i S značajno razlikuju od ostalih biljnih vrsta i uslovaljavaju formiranje jasno definisanog klastera udaljenog od ostalih uzoraka (**Slika 23a**). Uzorci meda od primorskog hrasta i primorskog javora se u izvesnoj meri preklapaju usled sličnog sadržaja Se (**Slika 23a**). Kao i u slučaju ostalih analiziranih parametara, uzorci meda od jele i crnogorice su preklapljeni, a od uzoraka preostale tri biljne vrste se razlikuju prema sadržaju nikla, kobalta, bakra, aluminijuma i kadmijuma (**Slika 23b**). Uzorci crnogorice su rasuti na grafiku skorova što ukazuje na veliki varijabilitet u elementalnom profilu ove biljne vrste, ali i na veliki udeo ekskreta i sekreta sa jele, što je potvrđeno i analizom ostalih parametara. Dobijeni rezultati ukazuju na izraženu bioakumulaciju teških metala u medljikovcu od jele u odnosu na ostale biljne vrste.

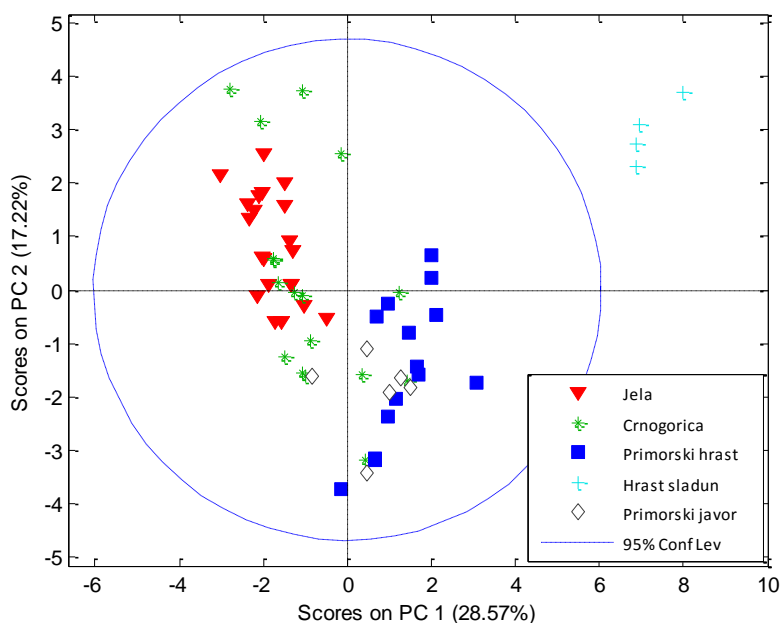
Tabela 19. Prikaz rezultata *Kruskal-Wallis*-ovog testa

Parametar	<i>Kruskal-Wallis</i>	
	P	Z-test ^a
Co	<0,0001	J,C(JP,HS,PH) ^b
Ni	<0,0001	J(JP,HS,PH)
Se	0,0012	J,C(JP,PH)
Sr	<0,0001	HS(J,C,JP) J,C(PH,HS)
Al	<0,0001	J,C(JP,HS,PH)
Mn	<0,0001	HS(J,C,JP,PH) J,C(HS,JP,PH)
Cu	0,0048	S(JP,PH)
Ca	<0,0001	HS(J,C,JP)
K	0,0372	PH(J,C)
Mg	0,0139	HS(J,C,JP,PH)
P	0,0002	J,C(JP,HS,PH)
S	0,0183	HS(J,C,JP)
Cd	<0,0001	J,C(JP,HS,PH)
Ba	0,0211	HS(J,C,JP,PH)

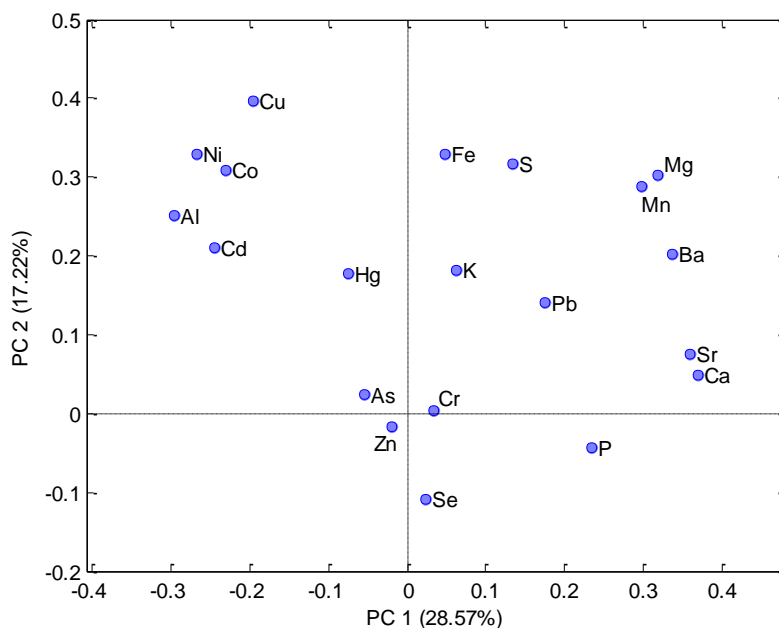
^a Medijane se značajno razlikuju ako je z-vrednost > 1,9600

^b Jela (J); Crnogorica (C); Primorski javor (JP); Hrast sladun (HS); Primorski hrast (PH).

Oba statistička postupka (*Kruskal-Wallis* test i *PCA*) ukazuju na elemente kao jedinstven skup parametara koji jasno klasifikuju uzorke koji potiču od različitih biljnih vrsta. Kao što je potvrđeno u mnogim prethodnim istraživanjima (53,55) zbog njihove stabilnosti minerali se mogu koristiti kao pouzdan parametar za klasifikaciju različitih vrsta meda. Da bi se utvrdio razlog postignute klasifikacije ispitivanih vrsta medljikovaca, razmatrani su i geografski uslovljeni parametri kao što je sastav zemljišta ili prisustvo regionalne endemske flore. Hrast sladun raste uglavnom u Panonskom delu Hrvatske (Slavonija) gde je glavni tip tla „černozem“ koji odlikuje obilno prisustvo CaCO_3 i kvalitetan humus bogat solima kalcijuma. Deo ovog regiona takođe je pokriven tlom koje sadrži više mikrohranjivih sastojaka kao što su Mn, Fe i S (117). Primorski hrast i primorski javor su vrste karakteristične za jadransku regiju koja uglavnom ima kraški karakter, nastao rastvaranjem rastvorljivih stena poput dolomita i gipsa. Zbog akrizolnog tipa tla, planinski region pokriven je uglavnom šumskim vrstama, prvenstveno jelom ali i četinarima uopšte (117). Za ovakav tip zemljišta je karakteristično da u pojedinim periodima sadrži veće količine Al. Sadržaj elemenata u ispitivanim uzorcima medljikovaca uglavnom je u skladu sa sastavom zemljišta. Međutim, osim uticaja mineralnog sastava tla, na mineralni sastav medljikovaca mogu uticati i padavine (kiša i sneg), koji dodatno mogu povećati sadržaj minerala inače prisutnih u samom tlu, što je naročito izraženo u slučaju kraškog regiona. Vredi pomenuti i uticaj vetrova koji mogu doneti čestice iz više ili manje udaljenih područja, a koje se mogu zadržati na lišću, iglicama i stabljikama drveća, iz kojih se luči medna rosa ili na kojima insekti izlučuju medljiku od kojih pčele kasnije prave medljikovac. Pored toga, treba uzeti u obzir i specifično usvajanje i bioakumulaciju elemenata od strane različitih biljnih vrsta.



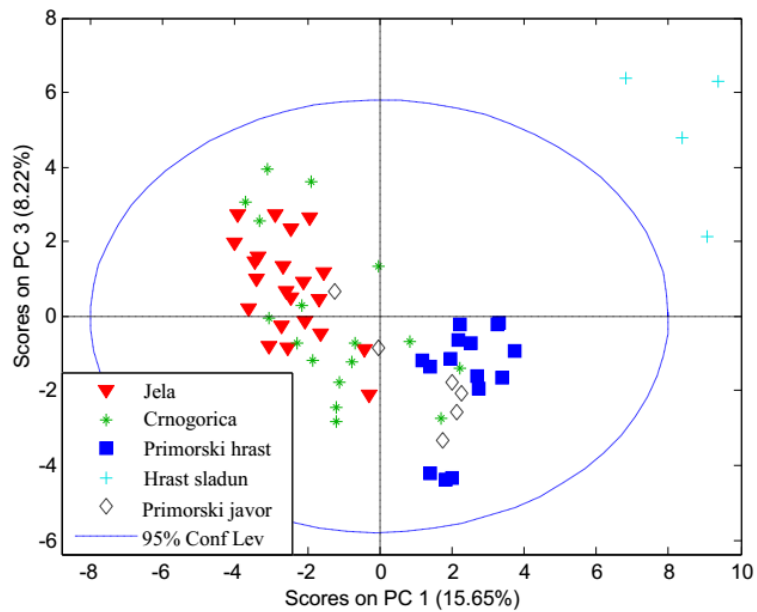
Slika 23a. PCA primenjena na vrednosti kvantifikovanih elemenata – grafik skorova



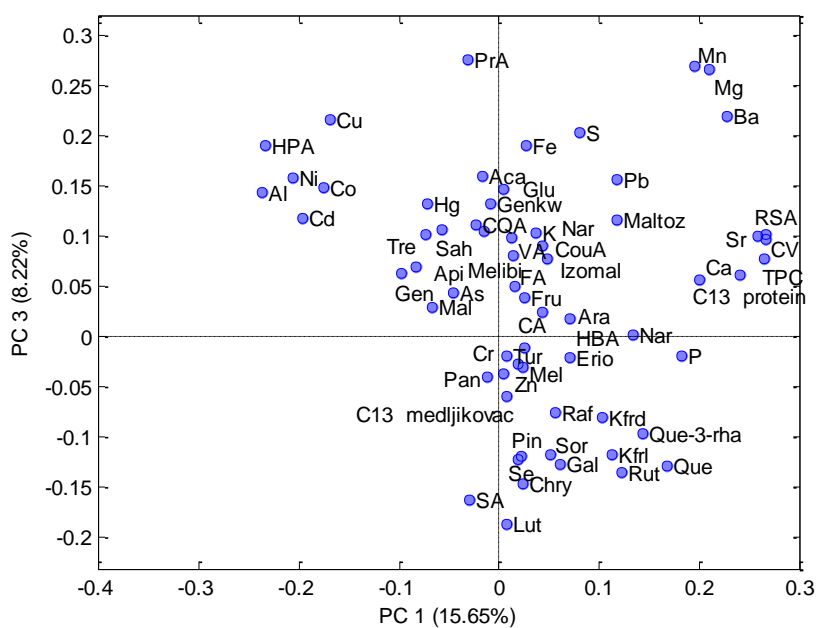
Slika 23b. PCA primenjena na vrednosti kvantifikovanih elemenata - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

4.9.6. Analiza uticaja objedinjenih parametara na grupisanje medljikovaca

Saglasno prethodno iznesenim rezultatima koji potvrđuju složeni hemijski sastav meda i nemogućnost diferencijacije i klasifikacije prema biljnom poreklu samo na osnovu jednog tipa parametara ili jedne klase jedinjenja, urađena je PCA na svim analiziranim parametrima. Najbolje razdvajanje ispitivanih uzoraka prema biljnom poreklu pružile su PC2 i PC3. Grupisanje uzoraka je identično onom dobijenom na osnovu elementalnog sastava, sa bolje definisanim i razdvojenim grupama uzoraka (**Slika 24a**). Medljikovci iz roda *Quercus spp.* su razdvojeni od uzoraka meda od jele i crnogorice, ali i međusobno. Uzorci jele se saglasno sa prethodnim PCA analizama preklapaju sa uzorcima crnogorice koji su rasuti na grafiku skorova što potvrđuje veliki varijabilitet hemijskog profila ove biljne vrste. Uzorci meda od primorskog javora preklapaju se sa uzorcima meda od primorskog hrasta. Ovakav trend ukazuje na veliki uticaj sastava zemljišta na hemijski profil biljnih vrsta prisutnih na određenom području, a onda i na sastav medljikovaca dobijenih od ekskreta i sekreta istih. Ovo zapažanje potvrđeno je i grafikom koeficijenata latentnih varijabli koji ukazuje na činjenicu da najveći uticaj na diferencijaciju ispitivanih biljnih vrsta medljikovaca imaju elementi (**Slici 24b**). Parametri Mn, Mg, Ba, Sr, Ca, RSA, CV, TPC, $\delta^{13}\text{C}$ proteina izolovanih iz meda, S i Pb dovode do grupisanja uzoraka medljikovaca od hrasta sladuna, dok fenolna jedinjenja **Que**, **Kue-3-rha**, **Rut**, **Kftl** i **Kfrd** karakterišu uzorke od primorskog hrasta i primorskog javora. Na odvajanje uzoraka meda od jele i crnogorice od ostalih biljnih vrsta najviše je uticao sadržaj Cu, Co, Cd, Al, Ni i **HPA**. Treba naglasiti i uticaj fenolnog jedinjenja **PrA** koji je karakterističan za uzorke meda od hrasta sladuna i jele.



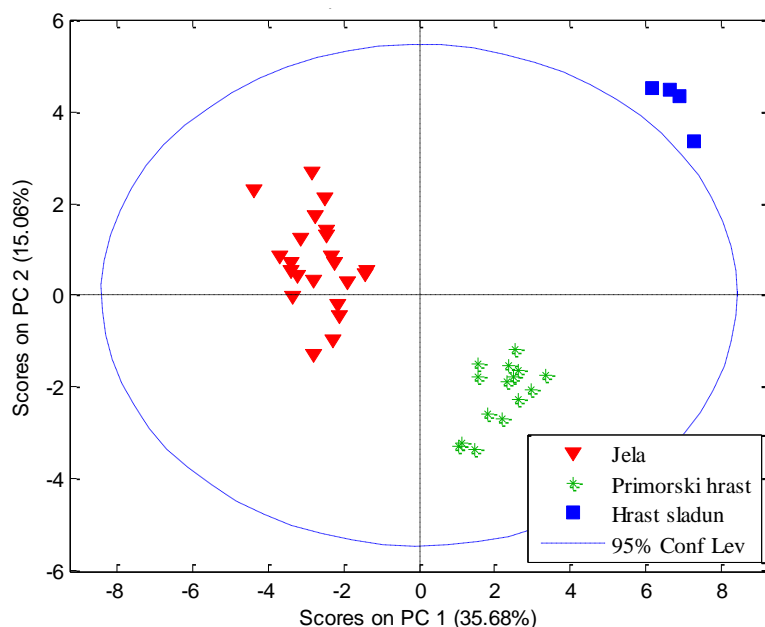
Slika 24a. PCA primenjena na vrednosti svih određenih parametara – grafik skorova



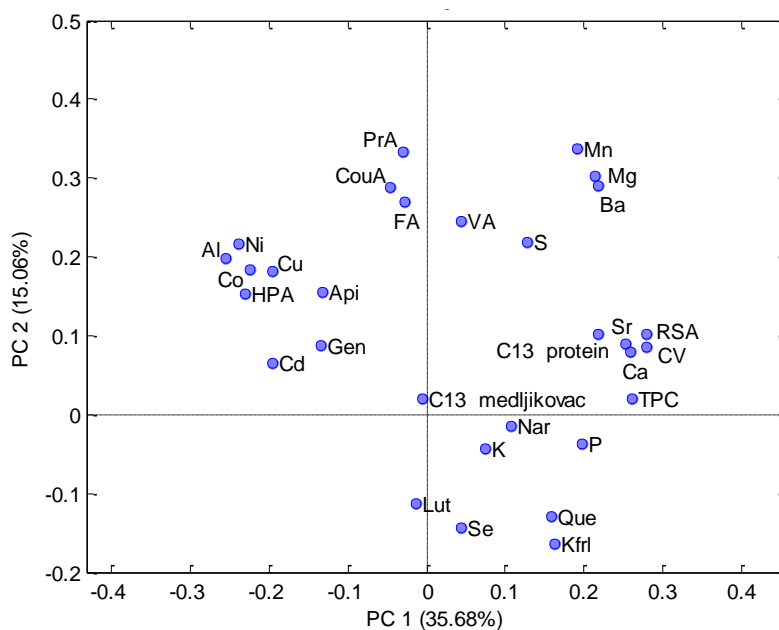
Slika 24b. PCA primenjena na vrednosti svih određenih parametara - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

4.9.7. Klasifikacija medljikovaca tri odabrane biljne vrste (jela, hrast sladun, primorski hrast)

Uzimajući u obzir prethodne rezultate, u cilju ispitivanja mogućnosti klasifikacije uzoraka, odabrane su tri biljne vrste (jela, hrast sladun, primorski hrast), i parametri koji su imali najveći uticaj na njihovo razlikovanje na osnovu prethodne PCA analize i *Kruskal-Wallis*-ovog testa koji su rađeni za svaki pojedinačni parametar. PCA model ukazuje na tri jasno grupisana klastera koja odgovaraju medu od jele, hrasta sladuna i primorskog hrasta (**Slika 25a**). Uticaj pojedinih parametara na formiranje klastera identičan je onom komenarisanom u prethodnoj analizi.



Slika 25a. PCA primenjena na vrednosti svih određenih parametara za tri odabrane biljne vrste – grafik skorova



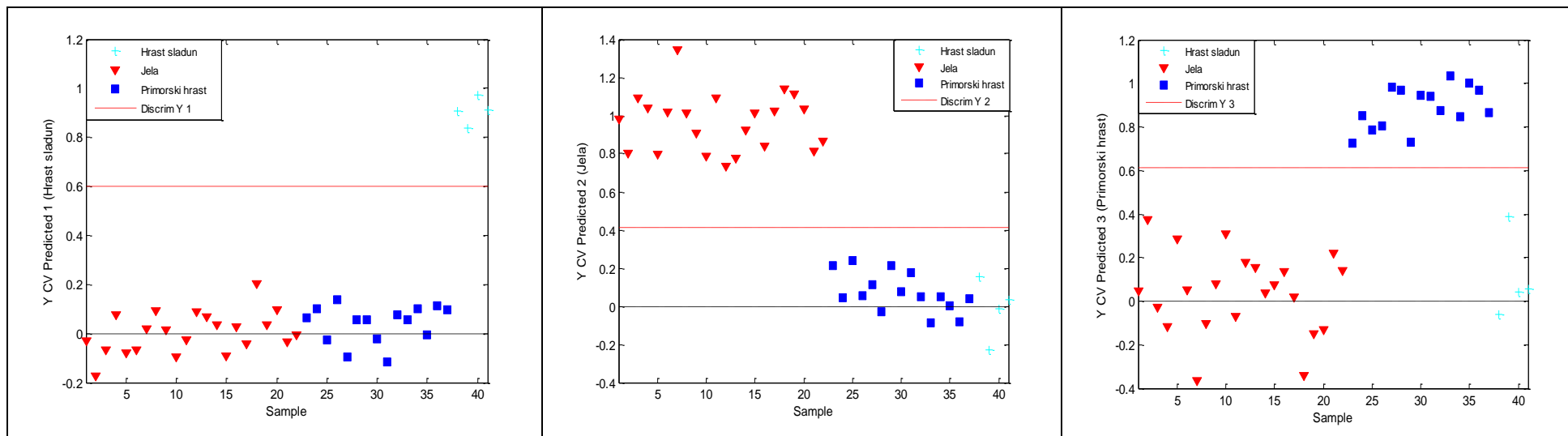
Slika 25b. PCA primenjena na vrednosti svih određenih parametara za tri odabrane biljne vrste - uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

U cilju definisanja autentičnosti tri odabrane vrste medljikovaca u pogledu njihovog biljnog porekla, primenjena je klasifikaciona metoda PLS-DA. Parametri PLS-DA modela bili su statistički značajni, sa relativno visokim vrednostima R^2_{cal} i R^2_{CV} i malom razlikom između $RMSEC$ i $RMSECV$ vrednosti (**Tabela 20**).

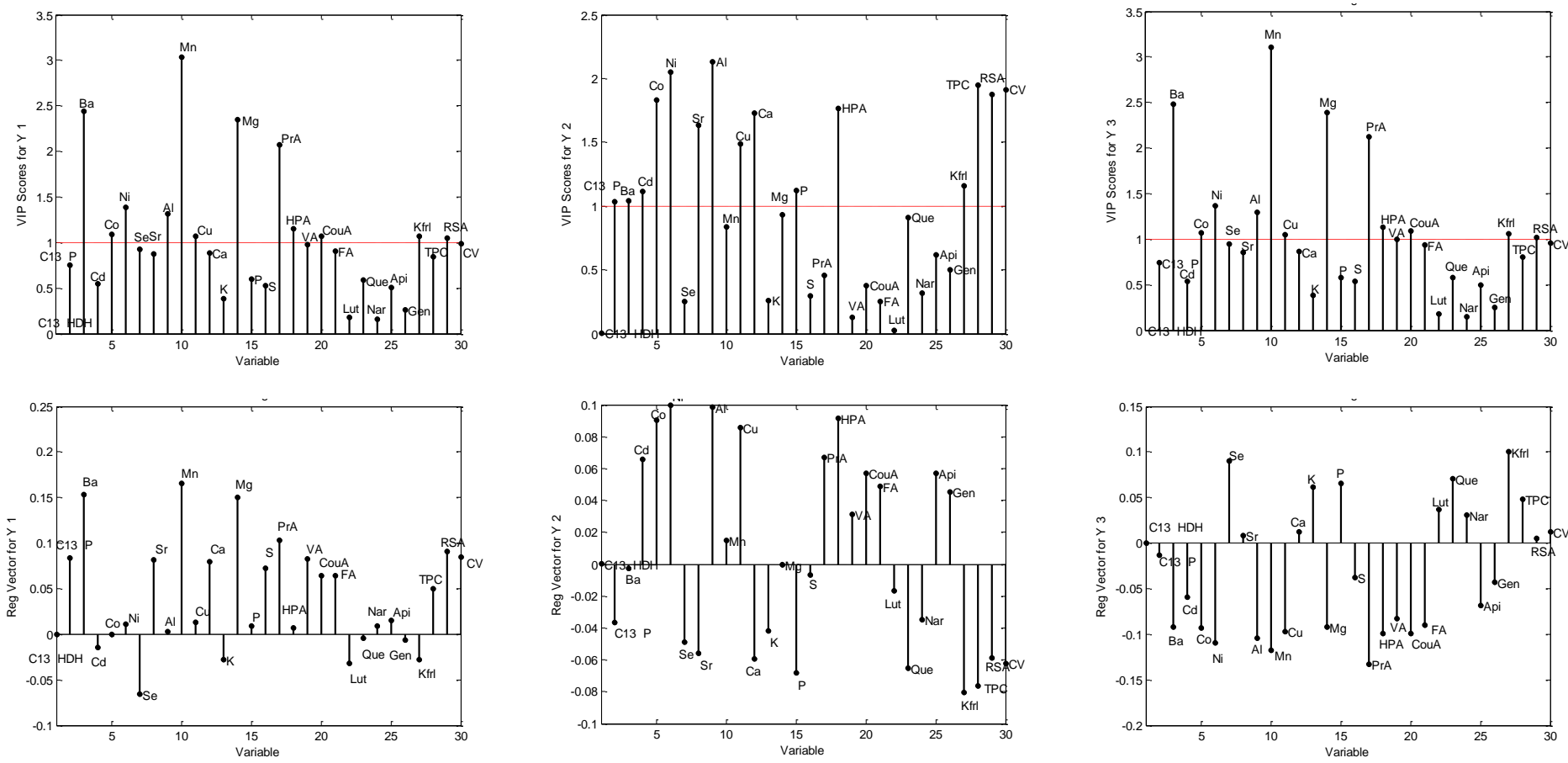
Tabela 20. Parametri za PLS-DA

	Hrast sladun	Jela	Primorski hrast
R^2_{cal}	0,9707	0,9627	0,9501
R^2_{CV}	0,9445	0,8912	0,8380
$RMSEC$	0,0508	0,0962	0,1076
$RMSECV$	0,0699	0,1664	0,1971

Grafik skorova za ove uzorke, takođe je potvrdio dobru prediktivnu sposobnost PLS-DA modela (**Slika 26a**). Varijable koje imaju najveći uticaj na razlikovanje uzoraka prema biljnom poreklu analizirane su pomoću VIP vrednosti (**Slika 26b**). Varijable sa VIP vrednostima većim od 1 smatrane su najrelevantnijim za određivanje pripadnosti određenoj biljnoj vrsti. Najvažnije varijable koje doprinose razlikama među uzorcima su elementi Ba, Ca, Mg, Sr, Al, Mn, Co, Ni i Se, fenolna jedinjenja **PrA** i **HPA**, sadržaj ukupnih fenola, kao i parametri antioksidativne aktivnosti ali sa različitim uticajem na svaki model. Standardizovani regresioni koeficijent koji ukazuje na značaj pojedinačne promenljive u regresionim modelima prikazan je na **Slici 26b**. Najveći pozitivni uticaj na klasifikaciju uzoraka meda od primorskog hrasta imaju elementi Se, Sr, Ca i K, kao i **Kfrl**, na uzorke meda od hrasta sladuna Ba, Mg i Mn, $\delta^{13}C$ vrednosti proteina izolovanih iz medljikovca, **PrA**, **RSA**, **CV** i **TPC**, dok je medljikovac od jele uglavnom okarakterisan visokim sadržajem Co, Ni, Al, Cd i Cu, i fenolnih jedinjenja **HPA**, **CouA** i **FA**. Dakle, podaci o sadržaju mineralnih elemenata u medljikovcima omogućavaju precizno predviđanje biljnog porekla medljikovaca od jele, hrasta sladuna i primorskog hrasta i predstavljaju korisno sredstvo za utvrđivanje autentičnosti uzoraka.



Slika 26a. PLS-DA model primenjen na tri odabrane biljne vrste – grafik skorova



Slika 26b. PLS-DA model primenjen na tri odabrane biljne vrste – grafik koeficijena parametara (VIP skorovi za Y1 - hrast sladun; VIP skorovi za Y2 - jela; VIP skorovi za Y3 - primorski hrast)

4.9.8. Analiza medljikovaca u odnosu na godinu proizvodnje

Medljikovci istog biljnog porekla, istog geografskog porekla (isti lokalitet i ista košnica), ali sakupljeni tokom različitih sezona mogli bi imati različit hemijski profil. Broj prikupljenih uzoraka određenog biljnog porekla po godini u periodu od 2011. do 2016. godine prikazan je u **Tabeli 21**. S obzirom na mali broj uzoraka medljikovca od hrasta sladuna sakupljenih u toku dve godine ova biljna vrsta nije analizirana sa ovog aspekta. Ni uzorci meda od crnogorice iz 2012. i 2013. godine nisu uzimani u razmatranje s obzirom da je samo po jedan uzorak iz tih godina. Šećeri **Tur, Tre, Ara i Raf**, elementi Ba, Sr, P, Cd i Se, i $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda, pokazali su statistički značajnu razliku prema godini proizvodnje (**Tabela 21**). Medljikovac od jele sadrži različite količine **Tur, Cd i Se**, i $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda, med od primorskog hrasta razlikovao se u sadržaju **Raf i P**, a medljikovac od crnogorice u količini **Tre, Ara, Ba i Sr** u zavisnosti od sezonskih uslova (**Tabela 21**).

Tabela 21. Prikaz rezultata *Kruskal-Wallis*-ovog testa

Parametar	Godina proizvodnje	
	P	Z-test ^a
Tur	0,0155	J2016(J2014,J2015) ^b
Tre	0,0479	C2015(C2016)
Ara	0,0492	C2014(C2015,C2016)
Raf	0,0301	PH2011(PH2014,PH2015) PH2016(PH2012,PH2014,PH2015)
Ba	0,0225	C2015(C2014,C2016)
Sr	0,0377	C2015(C2016)
P	0,0492	PH2011(PH2015,PH2016) PH2014(PH2016)
Cd	0,0396	J2014(J2015)
Se	0,0039	J2016(J2014,J2013)
$\delta^{13}\text{C}$ honey	0,0117	J2013(J2014,J2016)

^a Medijane se značajno razlikuju ako je z-vrednost > 1,9600

^b Jela (J); Crnogorica (C); Primorski hrast (PH).

4.9.9. Analiza isparljivih komponenata

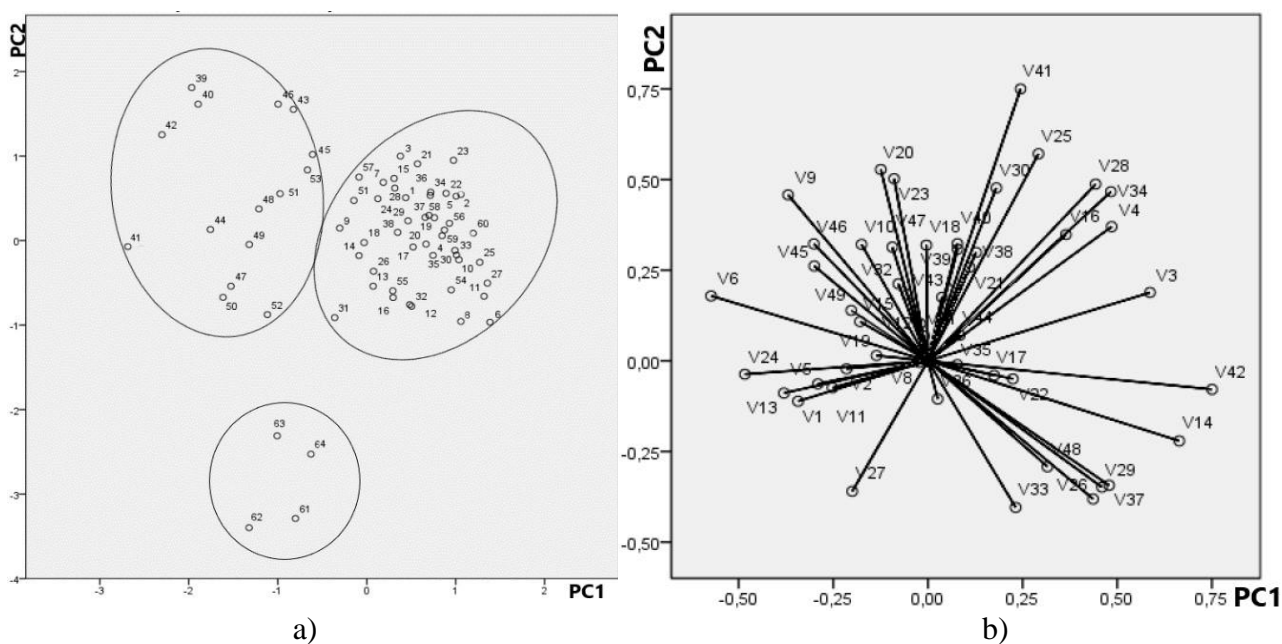
Nelinearna analiza glavnih komponenata primenjena je na podacima koji opisuju profil isparljivih komponenata ispitivanih uzoraka. Odgovarajući grafik koeficijenata latentnih varijabli može da ukaže na isparljiva jedinjenja koja u najvećoj meri određuju utvrđeno grupisanje. Dakle, u cilju boljeg sagledavanja rezultata i klasifikacije uzoraka prema biljnom poreklu, odnosno odabira parametara koji odgovaraju isparljivim komponentama medljikovaca, a koji nedvosmisleno karakterišu određenu biljnu vrstu, urađena je i NPCA. Jedinjenja identifikovana u analiziranim uzorcima kategorisana su za svaki uzorak pojedinačno sa vrednošću 1, ukoliko je jedinjenje prisutno u uzorku, odnosno 0 – ukoliko nije prisutno. Od ukupnog broja identifikovanih jedinjenja odabrano je 49 jedinjenja (**Tabela S2, Prilog**) kod kojih je postojao najizraženiji varijabilitet među podacima i ona su korišćena kao varijable za NPCA.

Nelinearna analiza glavnih komponenata je rezultirala trokomponentnim modelom u kojem prve dve glavne komponente (PC1 i PC2) opisuju 18,93% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva glavna komponenta (PC1) obuhvata 9,76 % varijabiliteta, dok druga glavna komponenta (PC2) objašnjava 9,17 %. Mala količina informacija sadržanih u prve dve glavne komponente nije dovoljna da ukaže na prirodu ispitivanih uzoraka, ali su odgovarajući grafici (**Slika 27a i 27b**) analizirani u cilju pronalaženja grupe jedinjenja koji bi mogli da ukažu na biljno poreklo medljikovaca.

Na grafiku skorova se može uočiti jasno grupisanje uzoraka meda od hrasta sladuna (uzorci br. **61, 62, 63 i 64**), kao i uzoraka od primorskog hrasta (uzorci br. **39-53**). Uzorci hrasta sladuna pokazuju specifičan profil isparljivih komponenata potvrđen izrazitim izdvajanjem ovih uzoraka u odnosu na ostale biljne vrste na grafiku skorova. Uzorci medljikovca od jele su zajedno sa uzorcima od crnogorice i primorskog javora, formirali kompaktnu grupu na suprotnom delu grafika skorova u odnosu na medljikovce od roda *Quercus spp.*

Dakle, kod uzoraka od jele, crnogorice i primorskog javora nije uočena zavisnost između biljne vrste i profila isparljivih komponenata. Selektovane varijable, tj. odabrana isparljiva jedinjenja ne mogu se koristiti kao markeri za karakterizaciju pomenute tri biljne vrste. Ukoliko bi se kao parametri koristili kvantitativni podaci, tj. količina određenih isparljivih jedinjenja u uzorcima, postoji mogućnost da bi isparljiva jedinjenja mogla da diferenciraju i medljikovce od jele, crnogorice i primorskog hrasta.

Jedinjenja koja imaju najveći uticaj na grupisanje uzoraka hrasta sladuna na osnovu profila isparljivih komponenata su jedinjenja sa oznakama V27, V33, V37, V26, V29, V48, dok jedinjenja koja grupišu uzorke primorskog hrasta označena su kao V6, V9, V20, V23, V47, V10 (**Tabela S2**). Isparljive komponente koje su najzastupljenije u uzorcima jele, crnogorice i primorskog javora su jedinjenja sa oznakama V41, V30, V25, V28, V34, V16, V4, V3 (**Tabela S2**).



Slika 27. PCA primenjena na identifikovana isparljiva jedinjenja iz medljikovaca a) grafik skorova, b) uzajamna projekcija koeficijenata latentnih varijabli

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije ispitivani su fizičko-hemijski parametri, antioksidativna svojstva i fitohemijski profil pet vrsta medljikovaca poreklom iz Hrvatske.

Autentičnost uzoraka medljikovaca u pogledu načina proizvodnje potvrđena je na osnovu vrednosti fizičko-hemijskih parametara i analizom odnosa stabilnih izotopa ugljenika. Vrednosti fizičko-hemijskih parametara bile su u okviru propisanih vrednosti prema nacionalnim i međunarodnim standardima, pri čemu su vrednosti električne provodljivosti i specifične optičke rotacije potvrdile da su uzorci dobijeni iz sekrecije koju proizvode biljke ili izlučevine insekata koji sišu biljke. Dodatno, na osnovu $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina izolovanih iz medljikovaca i $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti samih medljikovaca, potvrđeno je da u uzorcima nije bilo dodatog šećernog sirupa, tj. da su isti dobijeni iz C3 biljaka.

Autentičnost pet vrsta medljikovaca (*Abies alba* Mill., *Quercus ilex* L., *Quercus frainetto* Ten., *Acer monspessulanum* L. i crnogorice) prema biljnom poreklu, okarakterisana je na osnovu šećernog i fenolnog profila, $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti medljikovaca i proteina izolovanih iz medljikovaca, sadržaju esencijalnih i toksičnih elemenata, kao i sadržaju isparljivih jedinjenja. Za definisanje biljnog porekla korišćena je i antioksidativna sposobnost uzoraka koja je procenjena primenom spektroskopskog i elektrohemijskog pristupa.

Pored toga, iako se sadržaj šećera može koristiti za razlikovanje medljikovaca od cvetnog meda, visok stepen varijabiliteta unutar svake vrste medljikovaca onemogućava određivanje njihovog biljnog porekla samo na osnovu ovog parametra. Jedinstveni marker porekla nije pronađen u okviru ove klase jedinjenja. Sa druge strane, vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ proteina izolovanih iz medljikovaca mogu biti dobar pokazatelj biljnog porekla medljikovaca.

Makro- i mikroelementi (Ba, Ca, Mg, Sr, Mn, Al, Co, Ni i Se) u medljikovcima od vrste *Abies alba* i roda *Quercus spp.* (*Quercus frainetto* i *Quercus ilex*), kako je procenjeno na osnovu regresionog modela, mogu se smatrati markerima biljnog porekla i koristiti za tačnije označavanje pomenutih vrsta. Pored toga, dobijeni podaci ukazuju na dobar kvalitet svih ispitivanih uzoraka medljikovaca s obzirom na nisku koncentraciju toksičnih elemenata u tragovima i relativno veliku količinu nutritivno važnih minerala, kao što su Mn i S, između ostalih.

Parametri antioksidativne aktivnosti zajedno sa sadržajem ukupnih fenola, kao i pojedinačnih fenolnih jedinjenja Que, Narn, Kue-3-rha, Rut, Kfrl i Kfrd, karakterišu uzorke iz roda *Quercus spp.* S druge strane, najuticajniji parametri koji razlikuju uzorke meda od jele i crnogorice od drugih biljnih vrsta su Api, CQA, Gen i HPA.

Rezultati dobijeni GCxGC analizom u kombinaciji sa multivarijantnom analizom ukazuju na značaj korišćenja kategorijskih podataka, tj. profila definisanih samo prisustvom, odnosno odsustvom određenog jedinjenja u uzorku, bez njihovog kvantitativnog određivanja.

Dobijeni rezultati u okviru ove disertacije potvrđuju mogućnost procene autentičnosti medljikovca prema biljnom poreklu samo na osnovu fenolnog profila i antioksidativnog kapaciteta, sa jedne strane, i elementalnog sastava, sa druge. Ipak najbolji rezultati u klasifikaciji medljikovaca prema biljnom poreklu su dobijeni kombinovanjem više parametara, odnosno posmatranjem kompletnog hemijskog profila. Među ispitivanim biljnim vrstama medljikovca, medljikovci iz roda *Quercus spp.*, *Quercus frainetto* i *Quercus ilex*, su pokazali jedinstven hemijski profil.

S druge strane, šećeri Tur, Tre, Ara i Raf, elementi Ba, Sr, P, Cd i Se, i $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti za med, mogu da se dovedu u vezu sa godinom proizvodnje.

S obzirom da medljikovac do sada nije sistematski ispitivan, rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su od posebnog značaja za uspostavljanje standarda kvaliteta medljikovca i njegov plasman na domaćem i evropskom tržištu.

6. LITERATURA

1. Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, Službeni Glasnik RS br. 101/15.
2. Dong H, Xiao K, Xian Y, Wu Y. Authenticity determination of honeys with non-extractable proteins by means of elemental analyzer (EA) and liquid chromatography (LC) coupled to isotope ratio mass spectroscopy (IRMS). *Food Chem.* 2018;240:717–24.
3. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, de Torres C, Pérez-Coello MS. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Res Int.* 2010;43(10):2335–40.
4. Persano Oddo L, Piro R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie.* 2004;35:38–81.
5. Bogdanov S. Harmonized Methods of the International Honey Commission, International Honey Commission (IHC responsible for the methods: Stefan Bogdanov, Bee Product Science). 2011.
6. Pita-Calvo C, Vázquez M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2017;59:79–87.
7. Pita-Calvo C, Vázquez M. Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins. *J Agric Food Chem.* 2018;66(11):2523–37.
8. Persano Oddo L, Piana L, Bogdanov S, Bentabol A, Gotsiou P, Kerkivliet J, Martin P, Morlot, M, Valbuena Ortiz A, Ruoff K, Von der Ohe K. Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie.* 2004;35(1):82–93.
9. Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 2001/110/EC relating to honey. *Official Journal of the European Communities,* 2014; L164/1.
10. Crane E, Walker P. Important Honeydew Sources and their Honeys. *Bee World.* 1985;66(3):105–12.
11. Kirkwood KC, Mitchell TJ, Ross IC. An examination of the occurrence of honeydew in honey. Part II. *Analyst.* 1961;86(1020):164–5.
12. Primorac L, Mandić ML, Kenjeric D, Nedeljko M, Flanjak I, Pirički AP, et al. Comparison of the croatian and macedonian honeydew honey. *J Cent Eur Agric.* 2009;10(3):263–70.
13. Bogdanov S, Martin P. Honey authenticity: a review. *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg.* 2002;93:232-54.
14. Arvanitoyannis, IS. HACCP and ISO 22000: Application to Foods of Animal Origin. Wiley. 2009.
15. Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie.* 2004;35:4–17.
16. Lazarević KB, Andrić F, Trifković J, Tešić Ž, Milojković-Opsenica D. Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chem.* 2012;132(4):2060–4.
17. Jovetić M, Trifković J, Stanković D, Manojlović D, Milojković-Opsenica D. Mineral content as a tool for the assessment of honey authenticity. *J AOAC Int.* 2017;100(4):862–70.
18. Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bachir Bey M, Djoudad-Kadji H, Louaileche H. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.* 2010;121(2):561–8.
19. Arvanitoyannis IS, Chalhoub C, Gotsiou P, Lydakis-Simantiris N, Kefalas P. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(3):193–203.
20. Cajka T, Hajslova J, Pudil F, Riddellova K. Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks. *J Chromatogr A.* 2009;1216(9):1458–62.
21. Jerković I, Marijanović Z. A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. *Croat J Food Sci Technol.* 2009;1(2):28-34.
22. Kenjeric D, Mandić ML, Primorac L, Bubalo D, Perl A. Flavonoid profile of Robinia honeys

- produced in Croatia. *Food Chem.* 2007;102(3):683–90.
23. Kečkeš J, Trifković J, Andrić F, Jovetić M, Tešić Ž, Milojković-Opsenica D. Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. *J Sci Food Agric.* 2013;93(13):3368-76.
 24. Kropf U, Golob T, Nečemer M, Kump P, Korošec M, Bertonec J, et al. Carbon and nitrogen natural stable isotopes in slovene honey: Adulteration and botanical and geographical aspects. *J Agric Food Chem.* 2010;58(24):12794–803.
 25. Wedmore EB. The Accurate Determination of the Water Content of Honeys: Part I. Introduction and Results. *Bee World.* 1955;36(11):197–206.
 26. Singhal RS, Kulkarni PR, Rege DV. *Handbook of indices of food quality.* Elsevier, Cambridge. 1997.
 27. Doner LW. The sugars of honey-A review. *J Sci Food Agric.* 1977;28(5):443–56.
 28. Wang J, Li QX. Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. *Adv Food Nutr Res.* 2011;62:89-137.
 29. Escuredo O, Dobre I, Fernández-González M, Seijo MC. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 2014;149:84–90.
 30. Low NH, Sporns P. Analysis and Quantitation of Minor Di- and Trisaccharides in Honey, Using Capillary Gas Chromatography. *J Food Sci.* 1988;53(2):558–61.
 31. Ruiz-Matute AI, Brokl M, Soria AC, Sanz ML, Martínez-Castro I. Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chem.* 2010;120(2):637–42.
 32. Prodolliet J, Hischenhuber C. Food authentication by carbohydrate chromatography. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1998;207(1):1-12.
 33. Garcíá-Alvarez M, Ceresuela S, Huidobro JF, Hermida M, Rodríguez-Otero JL. Determination of polarimetric parameters of honey by near-infrared transreflectance spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2002;50(3):419–25.
 34. Peterson BJ, Fry B. Stable isotopes in ecosystem. *Ann Rev Ecol Syst.* 1987;18:293-320.
 35. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 1998;63(4):549–62.
 36. Padovan GJ, De Jong D, Rodrigues LP, Marchini JS. Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chem.* 2003;82(4):633–6.
 37. Simsek A, Bilsel M, Goren AC. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chem.* 2012;130(4):1115–21.
 38. Elflein L, Raetzke KP. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - Isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - Isotope ra. *Apidologie.* 2008;39(5):574–87.
 39. Sarić M, Stanković Ž, Krstić B. *Fiziologija biljaka.* Naučna knjiga, Beograd. 1989.
 40. White JWC. Stable hydrogen isotope ratios in plants: a review of current theory and some potential applications. *Stable Isotopes in Ecological Research.* Springer. 1989.
 41. Wu L, Du B, Vander Heyden Y, Chen L, Zhao L, Wang M, et al. Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challenge. *TrAC Trends Anal Chem.* 2017;86:25–38.
 42. Trifković J, Andrić F, Ristivojević P, Guzelmeric E, Yesilada E. Analytical methods in tracing honey authenticity. *J AOAC Int.* 2017;100(4):827–39.
 43. Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR. *Bioactive Compounds. Chapter 2-Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power.* Elsevier. 2019.
 44. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie - Int Ed.* 2011;50(3):586–621.
 45. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Akyuz Turumtay E, Silici S, Kolayli S. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food*

- Chem. 2015;180:133–41.
46. Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta*. 2005;533(2):185–91.
 47. Jerkovic I, Marijanovic Z. Oak (*quercus frainetto* ten.) honeydew honey-Approach to screening of volatile organic composition and antioxidant capacity (DPPH and FRAP assay). *Molecules*. 2010;15(5):3744–56.
 48. Bertonecelj J, Doberšek U, Jamnik M, Golob T. Evaluation of the phenolic 660 content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem*. 2007;105(2):822–8.
 49. Seraglio SKT, Valese AC, Daguer H, Bergamo G, Azevedo MS, Gonzaga LV, et al. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. *Food Res Int*. 2016;87:60–7.
 50. Tsiapara AV, Jaakkola M, Chinou I, Graikou K, Tolonen T, Virtanen V, et al. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chem*. 2009;116(3):702–8.
 51. Pohl P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *TrAC Trends Anal Chem*. 2009;28(1):117-28.
 52. Kiliç Altun S, Dinç H, Paksoy N, Temamoğullari FK, Savrunlu M. Analyses of Mineral Content and Heavy Metal of Honey Samples from South and East Region of Turkey by Using ICP-MS. *Int J Anal Chem*. 2017;2017(8):1-6.
 53. Escuredo O, Silva LR, Valentão P, Seijo MC, Andrade PB. Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chem*. 2012;130(3):671–8.
 54. Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Bello-López MA, Callejón-Mochón M, Jiménez-Sánchez JC, Guiraúm-Pérez A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*. 2005;65(3):686-91.
 55. Terrab A, Gonzalez AG, Diez MJ, Heredia FJ. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *J Sci Food Agric*. 2003;83(7):637-43.
 56. Bratu I, Georgescu C. Chemical contamination of bee honey—identifying sensor of the environment pollution. *J Cent Eur Agr*. 2005;6(1).
 57. Conti ME, Stripeikis J, Campanella L, Cucina D, Tudino, M.B. Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chem Cent J*. 2007;1(14).
 58. Čelechovska O, Malota L, Zima S. Entry of Heavy Metals into Food Chains: a 20-year Comparison Study in Northern Moravia (Czech Republic). *Acta Vet. Brno*. 2008;77(4):645-52.
 59. Marinova M, Gurgulova K, Kalinova G, Daskalov H. Content of some heavy metals in Bulgarian honeydew honey. *Trakia J Sci*. 2015;13(Suppl.2):296–302.
 60. Kaškonienė V, Kaškonas P, Maruška A. Volatile compounds composition and antioxidant activity of bee pollen collected in Lithuania. *Chem. Pap*. 2015;69(2):291–99.
 61. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. Volatile Composition and contribution to the aroma of spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *J Agric Food Chem*. 2006;54(13):4809–13.
 62. Jerković I, Mastelić J, Marijanović Z. A variety of volatile compounds as markers in unifloral honey from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem Biodivers*. 2006;3(12):1307-16.
 63. Naef R, Jaquier A, Velluz A, Bachofen B. From the Linden Flower to Linden Honey - Volatile Constituents of Linden Nectar, the Extract of Bee-Stomach and Ripe Honey. *Chem Biodivers*. 2004;1(12):1870-9.
 64. D'Arcy BR, Rintoul GB, Rowland CY, Blackman AJ. Composition of Australian Honey Extractives. 1. Norisoprenoids, Monoterpenes, and Other Natural Volatiles from Blue Gum

- (*Eucalyptus leucoxylo*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) Honeys. *J Agric Food Chem.* 1997;45(5):1834-43.
65. Karabagias IK, Vavoura MV, Nikolaou C, Badeka AV, Kontakos S, Kontominas MG. Floral authentication of Greek unifloral honeys based on the combination of phenolic compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Res Int.* 2014;62:753–60.
 66. Gašić UM, Natić MM, Mišić DM, Lušić DV, Milojković-Opšćenica DM, Tešić ŽL, et al. Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *J Food Compos Anal.* 2015;44:128–38.
 67. Oroian M, Amariei S, Leahu A, Gutt G. Multi-element composition of honey as a suitable tool for its authenticity analysis. *Polish J Food Nutr Sci.* 2015;65(2):93–100.
 68. Karabagias IK, Vlasiou M, Kontakos S, Drouza C, Kontominas MG, Keramidas AD. Geographical discrimination of pine and fir honeys using multivariate analyses of major and minor honey components identified by ¹H NMR and HPLC along with physicochemical data. *Eur Food Res Technol.* 2018;244(7):1249–59.
 69. Jánošková N, Vyviurska O, Špánik I. Identification of volatile organic compounds in honeydew honeys using comprehensive gas chromatography. 2014;53(4):353–62.
 70. Meyer V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Wiley. 2004.
 71. Swartz ME, Murphy B. *Ultra performance liquid chromatography: tomorrow's HPLC technology today*. LPI. 2004.
 72. Natić M. *Hromatografske metode odvajanja*. Hemijski fakultet, Beograd. 2015.
 73. Morales V, Corzo N, Sanz ML. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chem.* 2008;107(2):922–8.
 74. Biesaga M, Pyrzynska K. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *J Chromatogr A.* 2009;1216(38):6620–6.
 75. Bertonecelj J, Polak T, Kropf U, Korošec M, Golob T. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chem.* 2011;127(1):296–302.
 76. Halouzka R, Tarkowski P, Zeljkovic SČ. Characterisation of Phenolics and other Quality Parameters of Different Types of Honey. *Czech J Food Sci.* 2016;34(3):244–53.
 77. Carter JF, Barwick VJ. *Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry*. LGC/FIRMS. 2012.
 78. Milosavljević S. *Strukturne instrumentalne metode*, Hemijski fakultet, Beograd. 1994.
 79. Ristivojević P. *Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije*. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd. 2014.
 80. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB, *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1970.
 81. Stanković DM. *Primena metil-3,5-bis[(di(2-pikolil)amino)metil]benzoata za modifikaciju elektrode od staklastog ugljenika*. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd. 2012.
 82. Rehkämper M, Schönbacher M, Stirling CH. *Multiple collector ICP-MS: Introduction to instrumentation, measurement techniques and analytical capabilities*. *Geostand Newsl.* 2001;25(1):23–40.
 83. *Trace Elemental Analysis (TEA) Information*. Available from: <https://www.thermofisher.com/rs/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/trace-elemental-analysis-tea-information.html> [Accessed 8 December 2019].
 84. Lazarević KB, Jovetić MS, Tešić ŽL. Physicochemical parameters as a tool for the assessment of origin of honey. *J AOAC Int.* 2017;100(4):840–51.
 85. Welke JE, Zini CA. *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Analysis of Volatile Compounds in Foods and Beverages*. *J Braz Chem Soc.* 2011;22(4):609–22.
 86. Cardeal ZL, da Silva, MDRG, Marriott PJ. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles*, *Rapid Commun. Mass*

- Spectrom. 2006;20(19):2823-36.
87. Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour Fragr J.* 2005;20(2):136–40.
 88. Hajšlová J, Pulkrabová J, Poustka J, Čajka T, Randák T. Brominated flame retardants and related chlorinated persistent organic pollutants in fish from river Elbe and its main tributary Vltava. *Chemosphere.* 2007;69(8):1195–203.
 89. Rocha SM, Coelho E, Zrostlíková J, Delgadillo I, Coimbra MA. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability. *J Chromatogr A.* 2007;1161(1–2):292–9.
 90. Čajka T, Hajšlová J, Cochran J, Holadová K, Klimánková E. Solid phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *J Sep Sci.* 2007;30(4):534–46.
 91. Otto M. *Chemometrics.* Wiley-VCH. 2007.
 92. Hennessy S, Downey G, O'Donnell CP. Attempted confirmation of the provenance of corsican PDO honey using FT-IR spectroscopy and multivariate data analysis. *J Agric Food Chem.* 2010;58(17):9401-6.
 93. Camiña JM, Pellerano RG, Marchevsky EJ. Geographical and Botanical Classification of Honeys and Apicultural Products by Chemometric Methods-A Review. *Curr Anal Chem,* 2012;8(3):408-25.
 94. Baroni MV, Arrua C, Nores ML, Fayé P, del Pilar Díaz M, Chiabrando GA, Wunderlin DA. Composition of honey from Córdoba (Argentina): assessment of north/south provenance by chemometrics. *Food Chem.* 2009;114(2):727-33.
 95. Pierna JA, Abbas O, Dardenne P, Baeten V. Discrimination of Corsican honey by FT-Raman spectroscopy and chemometrics. *Biotech Agronomy Society Environ.* 2011;15(1):75-84.
 96. Latorre MJ, Peña R, García S, Herrero C. Authentication of Galician (N.W. Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *Analyst.* 2000;125(2):307–12.
 97. Aliferis K, Tarantilis P, Harizanis P, Alissandrakis E. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food chem.* 2010;121:856-62.
 98. Kanji G. *100 Statistical Tests.* Sage Publications Ltd., London. 2006.
 99. de Leeuw J. *Nonlinear Principal Component Analysis and Related Techniques.* 2006. DOI: 10.1201/9781420011319.ch4
 100. Briandet R, Kemsley EK, Wilson HR. Discrimination of Arabica and Robusta in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *J Agric Food Chem.* 1996;44(1):170-174.
 101. Ciosek P, Wróblewski W. The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes. *Talanta.* 2006;69(5):1156–61.
 102. Tewari J, Irudayaraj J. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2004;52:3237-43.
 103. Guimet F, Ferré J, Boqué R. Rapid detection of olive-pomace oil adulteration in extra virgin olive oils from the protected denomination of origin ‘Siurana’ using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. *Anal Chim Acta.* 2005;544(1–2 SPEC. ISS.):143–52.
 104. Giansante L, Di Vincenzo D, Bianchi G. Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *J Sci Food Agric.* 2003;83(9):905–11.
 105. Kallithraka S, Arvanitoyannis I, Kefalas P, El-Zajouli A, Soufleros EH, Psarra EP. Instrumental and sensory analysis of Greek wines; Implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food chem.* 2001;73(4):501-14.
 106. Silvano MF, Varela MS, Palacio MA, Ruffinengo S, Yamul DK. Physicochemical parameters

- and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food Chem.* 2014;152C:500–7.
107. Yucel Y, Sultanoglu P. Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES com-bined with chemometrics. *Food Chem.* 2013;140:231–37.
 108. Abdi H. Partial least square regression, projection on latent structure regression, PLS-Regression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics.* 2010;2:97-106.
 109. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2001;58:109-130.
 110. Gifi A. *Nonlinear Multivariate Analysis*, Wiley. 1990.
 111. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic.* 1965;16:144-58.
 112. Lugonja NM, Stanković DM, Spasić SD, Roglić GM, Manojlović DD, Vrvic MM. Comparative electrochemical determination of total antioxidant activity in infant formula with breast milk. *Food Anal Methods.* 2014;7(2):337-44.
 113. Gašić U, Šikoparija B, Tosti T, Trifković J, Milojković-Opsenica D, Natić M, et al. Phytochemical fingerprints of lime honey collected in Serbia. *J AOAC Int.* 2014;97(5):1259–67.
 114. AOAC Official Method 998.12, C-4 Plant Sugars in Honey, Internal Standard, Stable Carbon Isotope Ratio Method, 1999.
 115. Hintze, 2001, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT; www.ncss.com.
 116. Farjón A. *Pinaceae: drawings and descriptions of the genera Abies, Cedrus, Pseudolarix, Keteleeria, Nothotsuga, Tsuga, Cathaya, Pseudotsuga, Larix and Picea.* Königstein: Koeltz Scientific Books. 1990.
 117. Bogunović M, Vidaček Ž, Racz Z, Husnjak S, Špoljar A, Sraka M. *FAO UNESCO SOIL MAP, Republic of Croatia, Soil Science of Agricultural Faculty, University of Zagreb.* 1998.
 118. Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, Bogdanov S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem.* 2009;112(4):863–7.
 119. Kahraman T, Buyukunal SK, Vural A, Altunatmaz S. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chem.* 2010;123:41-4.
 120. Esti M, Panfili G, Marconi E, Trivisonno MC. Valorization of the honeys from the Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment. *Food Chem.* 1997;58(1):125–28.
 121. Cantarelli MA, Pellerano RG, Marchevsky EJ, Camiña JM. Quality of honey from Argentina: Study of chemical composition and trace elements. *J Argentine Chem Soc.* 2008;96:33–41.
 122. El Sohaimy SA, Masry SHD, Shehata MG. Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Ann Agric Sci.* 2015;60(2):279–87.
 123. Díez MJ, Andres C, Terrab A. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *Int J Food Sci Technol.* 2004;39:167–76.
 124. Rybak-Chmielewska H, Szczesna T, Waś E, Jaśkiewicz K, Teper D. Characteristics of Polish unifloral honeys IV. Honeydew honey, mainly *Abies alba* L. *J Apic Sci.* 2013;57(1):51–9.
 125. Vasić V, Đurđić S, Tosti T, Radoičić A, Lušić D, Milojković-Opsenica D, Tešić Ž, Trifković J. Two aspects of honeydew honey authenticity: Application of advance analytical methods and chemometrics. *Food Chem.* 2020;305:1-9.
 126. Devillers J, Morlot M, Pham-Delègue MH, Doré JC. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chem.* 2004;86(2):305–12.
 127. de la Fuente E, Sanz ML, Martínez-Castro I, Sanz J, Ruiz-Matute AI. Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chem.* 2007;105(1):84–93.
 128. Krauze A, Zalewski RI. Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1991;192(1):19–23.
 129. Dinca OR, Ionete RE, Popescu R, Costinel D, Radu GL. Geographical and Botanical Origin Discrimination of Romanian Honey Using Complex Stable Isotope Data and Chemometrics. *Food Anal Methods.* 2015;8(2):401–12.

130. Schellenberg A, Chmielus S, Schlicht C, Camin F, Perini M, Bontempo L, et al. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. *Food Chem.* 2010;121(3):770–7.
131. Karabagias IK, Casiello G, Kontakos S, Louppis AP, Longobardi F, Kontominas MG. Investigating the impact of botanical origin and harvesting period on carbon stable isotope ratio values ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and different parameter analysis of Greek unifloral honeys: A chemometric approach for correct botanical discrimination. *Int J Food Sci Technol.* 2016;51(11):2460–7.
132. Berriel V. Carbon stable-isotope and physicochemical data as a possible tool to differentiate between honey-production environments in Uruguay. *Foods.* 2018;7(6).
133. Berriel V, Perdomo CH. Differentiating pasture honey from eucalyptus honey based on carbon isotopic data in Uruguay. *Heliyon.* 2019;5(3):1228.
134. Shree M, Lingwan M, Masakapalli SK. *Metabolite Profiling and Metabolomics of Plant Systems Using ^1H NMR and GC-MS.* Wiley. 2019.
135. Vasić V, Gašić U, Stanković D, Lušić D, Vukić-Lušić D, Milojković-Opsenica D, et al. Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. *Food Chem.* 2019;274:629–41.
136. Ferreres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and penta-glycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004;39:312–21.
137. Cuyckens F, Claeys M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. *J Mass Spectrom.* 2005;40(3):364–72.
138. Yamauchi R, Kato K, Oida S, Kanaeda J, Ueno Y. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992;56:1321–22.
139. Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti BJ, da Silva Cunha IB, Danert C. et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J Apic Res.* 2016; 1-49.
140. Yang WZ, Ye M, Qiao X, Wang Q, Bo T, Guo DA. Collision-induced dissociation of flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom.* 2012;18(6):493–503.
141. Fabre N, Rustan I, De Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2001;12(6):707–15.
142. Kečkeš S, Gašić U, Veličković TĆ, Milojković-Opsenica D, Natić M, Tešić Ž. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem.* 2013;138(1):32–40.
143. Kachlicki P, Piasecka A, Stobiecki M, Marczak Ł. Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. *Molecules.* 2016;21(11):1–21.
144. Oroian M, Ropciuc S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Comput Electron Agric.* 2017;138:148–56.
145. Silici S, Sarioglu K, Karaman K. Determination of polyphenols of some turkish honeydew and nectar honeys using HPLC-DAD. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2013;36(16):2330–41.
146. Kuś MP, Jerković I, Marijanović Z, Tuberoso IGK. Screening of polish fir honeydew honey using GC/MS, HPLC-DAD, and physical-chemical parameters: benzene derivatives and terpenes as chemical markers. *Chem Biodivers.* 2017;14(9).
147. Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem.* 2018;264:471–5.

148. Sochor J, Dobes J, Krystofova O, Ruttkay-Nedecky B, Babula P, Pohanka M, et al. Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. *Int J Electrochem Sci.* 2013;8(8):8464–89.
149. Ristivojević P, Trifković J, Stanković DM, Radoičić A, Manojlović D, Milojković-Opsenica D. Cyclic voltammetry and UV/Vis spectroscopy in combination with multivariate data analysis for the assessment of authenticity of poplar type propolis. *J Apic Res.* 2017;56(5):559–68.
150. Gonzales-Paramas AM, Garcia-Villanova RJ, Gomez Barez AJ, Sanchez J, Ardanuy R. Botanical origin of monovarietal dark honeys (from heather, holm oak, pyrenean oak and sweet chestnut) based on their chromatic characters and amino acid profiles. *Eur Food Res Technol.* 2007;226(1):87–92.
151. Alves A, Ramos A, Gonçalves MM, Bernardo M, Mendes B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J Food Compos Anal.* 2013;30(2):130–8.
152. Simić A, Manojlović D, Šegan D, Todorović M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules.* 2007;12(10):2327–40.
153. Bogdanov S, Haldimann M, Luginbühl W, Gallmann P. Minerals in honey: Environmental, geographical and botanical aspects. *J Apic Res.* 2007;46(4):269–75.
154. Haouam L, Tahar A, Dailly H, Lahrichi A, Chaqroune A, Abdennour C. Physicochemical properties and major elements contents of Algerian honeys from semi-arid regions. *Emirates J Food Agric.* 2016;28(2):107–15.
155. Kováčik J, Grúz J, Biba O, Hedbavny J. Content of metals and metabolites in honey originated from the vicinity of industrial town Košice (eastern Slovakia). *Environ Sci Pollut Res.* 2016;23(5):4531–40.
156. Hernández OM, Fraga JMG, Jiménez AI, Jiménez F, Arias J. Characterization of honey from the Canary Islands: Determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chem.* 2005;93(3):449–58.
157. Pisani A, Protano G, Riccobono F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chem.* 2008;107(4):1553–60.
158. da Silva PM, Gauche C, Luciano V, Gonzaga AC, Costa RO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2016;196:309–23.
159. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: A review. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(6):677–89.
160. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. *EFSA Journal.* 2013;11:3419-63.
161. Manyi-Loh CE, Ndip RN, Clarke AM. Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):9514–32.
162. Bentabol Manzanares A, García ZH, Galdón BR, Rodríguez ER, Romero CD. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chem.* 2011;126(2):664–72.
163. Habib HM, Al Meqbali FT, Kamal H, Souka UD, Ibrahim WH. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chem.* 2014;153:35–43.

7. PRILOG

Tabela S1. Prisustvo određenih fenolnih jedinjenja u uzorcima medljikovaca

Pik No	tr, min	Naziv jedinjenja	Biljno poreklo medljikovaca ^b				
			Crnogorica	Jela	Primorski hrast	Hrast sladun	Primorski javor
1	4,20	Dihidroksibenzoeva kiselina heksozid	+	+	+	+	+
2	4,44	Protokatehinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
3	4,51	Hidroksibenzoeva kiselina heksozid I	+	+	+	+	+
4	4,74	Kofeinska kiselina heksozid I	+	+	+	+	+
5	4,91	Eskuletin 6- <i>O</i> -glukozid (Eskulin) ^a	+	+	+	+	+
6	4,92	Hidroksibenzoeva kiselina heksozid II	+	+	+	+	+
7	5,10	Kofeinska kiselina heksozid II	+	+	+	+	+
8	5,26	5- <i>O</i> -Kafeoilhinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
9	5,41	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina ^a	+	+	+	+	+
10	5,48	Gentisinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
11	5,62	<i>p</i> -Hidroksifenil sirćetna kiselina ^a	+	+	+	+	+
12	5,63	Vanilinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
13	5,77	Eskuletin ^a	+	+	+	+	+
14	5,80	Kofeinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
15	5,83	Kvercetin 3- <i>O</i> -(2"-heksozil)heksozid	-	-	+	-	+
16	6,13	Metoksi kempferol 3- <i>O</i> -(2"-heksozil)heksozid	+	+	+	+	+
17	6,39	Kempferol 7- <i>O</i> -(6"-heksozil)heksozid	+	+	+	+	+
18	6,44	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6"-ramnozil)glukozid (Rutin) ^a	+	+	+	+	+
19	6,45	Kempferol 3- <i>O</i> -(2"-ramnozil)heksozid	+	+	+	-	+
20	6,68	<i>p</i> -Kumarinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
21	6,71	Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid ^a	+	+	+	+	+
22	7,02	Sinapinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
23	7,03	Naringenin 7- <i>O</i> -(2"-ramozil)glukozid (Naringin) ^a	+	+	+	+	+
24	7,04	Ferulinska kiselina ^a	+	+	+	+	+
25	7,17	Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozil ^a	+	+	+	+	+
26	7,90	Koniferil aldehid ^a	+	+	+	+	+

Tabela S1. Nastavak

Pik Br.	t _R , min	Naziv jedinjenja	Biljno poreklo medljikovaca ^b				
			Crnogorica	Jela	Primorski hrast	Hrast sladun	Primorski javor
27	7,98	Luteolin 7- <i>O</i> -ramnozid	-	-	+	-	-
28	8,24	Kvercetin ^a	+	-	+	+	+
29	8,40	Kempferol 7- <i>O</i> -ramnozid	-	-	+	-	-
30	8,59	Eriodiktiol ^a	+	+	+	+	+
31	8,69	Luteolin ^a	+	+	+	+	+
32	9,33	Tehtohrizin	-	-	+	-	-
33	9,44	Naringenin ^a	+	+	+	+	+
34	9,52	Apigenin ^a	+	+	+	+	+
35	9,53	Genistein ^a	+	+	+	+	+
36	9,66	Metoksi-kempferol	+	+	+	+	+
37	9,70	Kempferol ^a	+	+	+	+	+
38	9,74	Pinobanksin ^a	+	+	+	+	+
39	9,87	Izoramnetin ^a	+	+	+	+	+
40	9,94	Hrizoeriol ^a	+	+	+	+	+
41	10,19	Dimetil-kvercetin	-	-	+	-	-
42	10,65	Ramnetin	+	+	+	+	+
43	10,67	Ramnocitrin	-	+	+	+	-
44	10,75	Genkvanin ^a	+	+	+	+	+
45	11,02	Tricin	+	+	+	+	-
46	11,30	Benzil kafeat	-	+	+	+	-
47	11,61	Hrizin ^a	+	+	+	+	+
48	11,70	Pinocembrin ^a	+	+	+	+	+
49	11,82	Kempferid ^a	+	+	+	+	+
50	11,84	Galangin ^a	+	+	+	+	+
51	12,20	Acacetin ^a	+	+	+	+	+
52	12,72	Pinobanksin 3- <i>O</i> -propionat	-	-	+	+	-

^a Potvrđeni pomoću standarda;

^b Smatrano je da je fenolno jedinjenje prisutno u medljikovcu određenog biljnog porekla ako je nađeno u više od 80% uzoraka tog porekla: "+" detektovano; "-" nije detektovano

Tabela S2. Prisustvo određenih isparljivih jedinjenja u uzorcima medljikovaca

Oznaka jedinjenja	Naziv jedinjenja	Biljno poreklo medljikovaca ^a				
		Crnogorica	Jela	Primorski hrast	Hrast sladun	Primorski javor
V1	pentadekan	1	1	1	0	1
V2	2,3,7-trimetiloktanal	1	1	0	0	0
V3	((dodeciloksi)metil)-oksiran	1	1	0	0	1
V4	1-metil-4-(1-metiletetil)-1,2-cikloheksandiol	1	1	0	0	1
V5	oktanal	1	1	0	0	0
V6	4-metoksifeniletetilenglikol	0	0	1	0	0
V7	1-oktanol	1	1	0	0	1
V8	benzaldehyd	1	1	1	1	1
V9	1-(1 <i>H</i> -pirol-2-il)-etanon	0	0	0	1	1
V10	6,10,14-trimetil-2-pentadekanon	0	0	1	0	0
V11	1-teradekanol	1	1	1	0	0
V12	1-(2-furanil)-2-hidroksietanon	1	1	1	1	1
V13	5-hidroksimetilfurfural	1	1	1	1	1
V14	(1-metilbutil)-ciklopentan	1	1	0	0	1
V15	dimetil-benzen	0	1	0	0	1
V16	1-nonanol	1	1	0	0	1
V17	2,6-dimetil-2,7-oktadien-1,6-diol	0	0	1	1	1
V18	2-heksil-1-dekanol	1	1	1	1	1
V19	2-butyl-1-oktanol	1	1	1	1	1
V20	dibutilftalat	0	0	1	0	0
V21	10-metil-eikosan	0	1	0	0	0
V22	1-dodekanol	1	1	1	1	1
V23	feniloksiran	0	0	1	0	0
V24	maltol	0	0	1	1	0
V25	2-hidroksi-2-metil-4-pentanon	1	1	0	0	1
V26	1-(1 <i>H</i> -pirol-2-il)-etanon	0	0	0	1	0

Tabela S2. Nastavak

Oznaka jedinjenja	Naziv jedinjenja	Biljno poreklo medljikovaca ^a				
		Crnogorica	Jela	Primorski hrast	Hrast sladun	Primorski javor
V27	1-(2-furani)-1-propanon	0	0	0	1	0
V28	(1-metiletil)-benzen	1	1	0	0	1
V29	2-metoksi-4-vinilfenol	0	0	0	1	0
V30	1-tridekan	1	1	0	0	1
V31	1-fenil-2-etanol	1	1	1	1	1
V32	4-hidroksibenzenetanol	1	0	0	1	0
V33	5-metil-2-furankarboksaldehid	0	0	0	1	0
V34	1-heptadekanal	1	1	0	0	1
V35	3-heksenil estar butanske kiseline	0	0	0	1	1
V36	dekanal	1	1	1	1	1
V37	butirolakton	0	0	0	1	0
V38	2,3,7-trimetiloktanal	1	1	1	0	0
V39	2-etil-1-heksanol	1	1	1	1	1
V40	1-heksadekanol	1	1	0	1	1
V41	1-nonanol	1	1	0	0	1
V42	1-(2-furani)-2-hidroksietanon	1	1	1	1	1
V43	1,1'-oksibis-oktan	1	1	1	0	1
V44	dietil estri benzendikarboksilne kiseline	1	1	1	1	1
V45	nonanal	1	1	1	1	1
V46	oktakosan	1	1	1	1	1
V47	2-(4-metoksifenil)etanol	0	0	0	0	1
V48	1-metil-oktadekanoat	0	0	0	1	0
V49	tetradekan	1	1	1	1	1

^a Smatrano je da je isparljivo jedinjenje prisutno u medljikovcu određenog biljnog porekla ako je nađeno u više od 40% uzoraka tog porekla: "1" detektovano; "0" nije detektovano

8. BIOGRAFIJA

Vesna Vasić rođena je 30.06.1988. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer Hemija, upisala je 2007. godine, a diplomirala februara 2013. godine. Master akademske studije na studijskom programu Hemija upisala je školske 2013/2014. godine, a završila septembra 2014. godine. Doktorske akademske studije na studijskom programu Hemija upisala je školske 2015/2016. godine pri Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U toku doktorskih studija angažovana je kao saradnik u nastavi na Hemijskom fakultetu na predmetima Praktikum iz analitičke hemije 1 i Klasična analitička hemija. Takođe, bila je angažovana na bilateralnom projektu „Novi pristupi u praćenju falsifikovanja proizvoda od voća”, u okviru kojeg je boravila mesec dana na *Justus Liebig University* u Nemačkoj u istraživačkoj grupi profesorke Gertrud Morlok.

Dobitnik je nekoliko stipendija i grantova za učešće na međunarodnim skupovima: grant Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za učešće na konferenciji *25th SCTM*, Ohrid, Makedonija; grant putem projekta „Putovanjem do znanja - Podrška talenata”; grant Zadužbine Đoke Vlajkovića; *Chromaleont* stipendija za učešće na *15th GCxGC* Simpozijumu, Riva del Garda, Italija; grant Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za učešće na Konferenciji *Euroanalysis*, Stockholm, Švedska.

Tokom doktorskih studija pohađala je program TRAIN (*Training and Research for Academic Newcomers*). Moduli: Istraživačka metodologija, Visokoškolska didaktika, Pisanje projekata, Prezentacija i komunikacija, Preduzetništvo, Umrežavanje i timski rad.

Pored engleskog, govori nemački i španski jezik.

Objavljeni i saopšteneni radovi koji čine deo disertacije

1. Radovi objavljeni u časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)

1) **Vesna Vasić**, Slađana Đurđić, Tomislav Tosti, Aleksandra Radoičić, Dražen Lušić, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, Jelena Trifković, "Two aspects of honeydew honey authenticity: Application of advance analytical methods and chemometrics", *Food chemistry*, 305, (2020); IF2018=5,399; DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125457.

2) **Vesna Vasić**, Uroš Gašić, Dalibor Stanković, Dražen Lušić, Darija Lukić-Lušić, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, Jelena Trifković, "Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity", *Food Chemistry*, 247, (2019); IF2018=5,399; DOI 10.1016/j.foodchem.2018.09.045.

2. Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M 34)

1) **Vesna Vasić**, Slađana Đurđić, Jelena Mutić, Dražen Lušić, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, Jelena Trifković, *Authenticity assesment and quality control of Croatian honeydew honeys on the basis of multi-element analysis with chemometric approach*, 25th Congress of SCTM, Ohrid, Macedonia, September 2018., Book of Abstracts, page 113.

2) **Vesna P. Vasić**, Tomislav B. Tosti, Dražen Lušić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Jelena Đ. Trifković and Živoslav Lj. Tešić, *Honeydew honey: carbohydrate profile as a tool for determination of natural and botanical origin*, World Conference on Analytical and Bioanalytical Chemistry, Barcelona, Spain, July 2018.

3) **Vesna Vasic**, Vladimir Beskoski, Kristina Dacic, Drazen Lusic, Dusanka Milojkovic Opsenica, Jelena Trifkovic, *Volatile organic compounds as marker of authenticity of honeydew honey*, 15th GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, May 2018., Book of Abstracts, page 31.

4) **Vesna Vasić**, Uroš Gašić, Jelena Trifković, Dražen Lušić, Darija Vukić-Lušić, Dušanka Milojković Opsenica, Živoslav Tešić, *Authenticity assessment of honeydew honey: phenolic profile and antioxidativ activity*, Euroanalysis 2017, Stockholm, Sweden, August 2017, Poster presentation abstracts, Poster No 161.

3. Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M 64)

1) **Vesna Vasić**, Vladimir Beškoski, Kristina Dacić, Dražen Lušić, Dušanka Milojkovic Opsenica, Jelena Trifković, *Different approaches for multivariate data analysis in GC×GC-MS fingerprinting of honeydew honey*, UNIFood, Belgrade, Serbia, October 2018., Book of abstracts, OHP44/FCHP44, page 282.

2) Aleksandra Radoičić, Jelena Trifković, **Vesna Vasić**, Dražen Lušić, Darija Lukić Lušić, Živoslav Tešić, *Botanical discrimination of honeydew honey by stable carbon isotope ratio analysis*, UNIFood, Belgrade, Serbia, October 2018., Book of abstracts, BKHP57/FQSP57, page 211.

3) **Vesna Vasić**, Aleksandra Dramićanin, Petar Ristivojević, Dražen Lušić, Darija Vukić-Lušić, Dušanka Milojković Opsenica, Živoslav Tešić, *Authenticity assessment of honeydew honey*, 54. Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, September 2017., Book of Abstracts, page 7.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Vesna Vasić

Broj indeksa: DH12/2015

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Korelacija fizičko-hemijskih parametara i fitohemijskog profila medljikovaca sa njihovim biljnim poreklom”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora



Vesna Vasić

U Beogradu, 16.01.2020.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Vesna Vasić

Broj indeksa: DH12/2015

Studijski program: doktor hemijskih nauka

Naslov rada: „Korelacija fizičko-hemijskih parametara i fitohemijskog profila medljikovaca sa njihovim biljnim poreklom”

Mentor: dr Jelena Trifković, vanredni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora



Vesna Vasić

U Beogradu, 16. 01. 2020.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Korelacija fizičko-hemijskih parametara i fitohemijskog profila medljikovaca sa njihovim biljnim poreklom”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora



Vesna Vasić

U Beogradu, 16. 01. 2020.

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.