

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Mihajlo V. Jakanovski

ŠEĆERI I ORGANSKE KISELINE KAO POKAZATELJI AUTENTIČNOSTI MEDA

Doktorska disertacija
Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Mihajlo V. Jakanovski

SUGARS AND ORGANIC ACIDS AS INDICATORS OF HONEY AUTHENTICITY

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026.

Mentori:

dr Dušanka M. Milojković–Opsenica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Sandra B. Šegan, naučni savetnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog
značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Jelena Đ. Trifković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Dražen Lušić, redovni profesor
Medicinski fakultet Univerziteta u Rijeci

dr Ivanka Ž. Ćirić, viši naučni saradnik
Inovacioni centar Hemijskog fakulteta

Datum odbrane:

U Beogradu, X. 10. 2026.

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Dušanke Milojković–Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta u Beogradu, i dr Sandre Šegan, naučnog savetnika Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Profesorki Dušanki Milojković–Opsenici izražavam najdublju zahvalnost na dugogodišnjem mentorstvu, izuzetnoj posvećenosti i poverenju koje mi ukazuje još od mojih osnovnih studija. Njeno bogato znanje, dragoceni saveti i nebrojeni stručni razgovori u velikoj meri su oblikovali moj naučni put. Hvala Vam na svakoj pruženoj prilici za usavršavanje, na zajedničkom radu i izuzetnom razumevanju. Vaša bezrezervna podrška je tokom svih ovih godina predstavljala najsnažniji oslonac i temelj mog celokupnog akademskog razvoja.

Dr Sandri Šegan iskreno zahvaljujem na izvanrednoj saradnji, srdačnosti i uvek blagonaklonom odnosu tokom rada na ovoj disertaciji. Od Vas sam zaista mnogo naučio, a Vaši dobronamerni saveti, stručna pomoć i podsticajna energija značajno su doprineli kvalitetu ovog rada. Hvala Vam na podršci i razumevanju koji su mi umnogome olakšali proces izrade i pisanja doktorata.

Veliku zahvalnost dugujem dr Jeleni Trifković, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu za nesebičnu pomoć i podršku koju mi je pružala od samog početka studija. Posebno joj zahvaljujem na pomoći tokom obrade i tumačenja rezultata proisteklih iz ove doktorske teze, kao i na dragocenim sugestijama i smernicama koje su značajno doprinele završnoj izradi doktorske disertacije. Njeni stručni saveti, nesebično deljenje znanja, prijateljski razgovori i kontinuirano ohrabrenje bili su mi od neprocenjivog značaja tokom celokupnog naučnog usavršavanja.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Draženu Lušiću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Univerziteta u Rijeci i predsedniku Međunarodne komisije za med, što je prihvatio da bude član komisija za ocenu i za odbranu ove doktorske disertacije. Zahvaljujem mu se na dragocenim sugestijama, nesebičnom deljenju znanja i stručnim savetima koje mi je pružao tokom usavršavanja u oblasti hemije meda. Posebno sam zahvalan na pomoći u ispitivanju i tumačenju senzorskih svojstava meda, što je značajno proširilo moje razumevanje ove oblasti.

Iskrenu zahvalnost dugujem dr Ivanki Ćirić, višem naučnom saradniku Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu, što je prihvatila da bude član komisija za ocenu i za odbranu ove doktorske disertacije. Zahvaljujem joj se na svim korisnim savetima, stručnim sugestijama i podršci koju mi je pružala tokom godina zajedničkog rada. Njeno iskustvo, posvećenost i spremnost da podeli svoje znanje značajno su doprineli mom profesionalnom razvoju i kvalitetu ovog rada.

Zahvalnost dugujem celokupnom timu InovaLaba: Dušanki Milojković–Opsenici, Jeleni Trifković, Ivanki Ćirić, Aleksandri Dramićanin, Aleksandri Pavlović, Aleksandri Radoičić, Đurđi Krstić, Milici Sredojević, Mirjani Mosić i Mirjani Vojić. Hvala vam na dugogodišnjoj saradnji, nesebičnom deljenju iskustva i podršci tokom mog stručnog usavršavanja u oblasti hemije meda. Posebno se zahvaljujem Mirjani Vojić na izuzetnoj pomoći u realizaciji eksperimentalnog dela rada i posvećenosti sa kojom mi je pomogla da ovako veliki broj podataka uspešno sistematizujem, kao i na svim lepim trenucima i dragocenim razgovorima koje smo podelili. Kao poseban i nerazdvojan deo mog radnog dana, Daci i Đuki dugujem veliku zahvalnost na sjajnoj energiji u našoj kancelariji 511, neprocenjivo vrednim razgovorima i prelepim zajedničkim druženjima van Fakulteta.

Veliku zahvalnost dugujem Igoru Opsenici, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, i Životi Selakoviću, docentu Hemijskog fakulteta, na stručnim savetima, profesionalnoj podršci i prijateljskim razgovorima. Hvala im na izuzetnoj podršci koju su godinama unazad pružali Klubu mladih hemičara. Vreme provedeno u Upravnom odboru Kluba donelo mi je dragoceno iskustvo, a taj put sam delio sa Milom Lazović i Jelenom Tadić (Kesić) – hvala vam na godinama zajedničkog truda i svemu što smo jedni od drugih naučili.

Svojim kolegama, a prvenstveno prijateljima – Marku Joviću, Mili Lazović, Milici Jankov, Đurđi Ivković, Milošu Iliću, Aleksandri Đunović i Dijani Jovanović – dugujem veliku zahvalnost što su mi ulepšali cele studije. Hvala vam što smo zajedno odrasli i što sam sve svoje najlepše i najteže trenutke mogao da podelim sa vama, kako u zgradi Fakulteta, tako i van nje.

Svom prvom diplomcu, a sadašnjem kolegi na Katedri za analitičku hemiju Farmaceutskog fakulteta, Urošu Popovu Tapavičkom, zahvaljujem na višegodišnjoj saradnji, druženju i izuzetnom kolegijalnom odnosu.

Posebnu zahvalnost dugujem Kristini Lazarević i Milici Jovetić na nesebično prenetom znanju i stručnom usmeravanju tokom mog rada u Centru za ispitivanje namirnica, a pre svega u oblasti hemije meda i hemije hrane. Zahvaljujem se Dejanu Bosančiću i Dragani Kokir na stručnoj pomoći prilikom izvođenja melizopalinološke analize uzoraka u okviru ove teze.

Zahvaljujem se Neveni Momirović na uspešnoj saradnji, zajedničkom radu na publikacijama, profesionalnom usavršavanju i međusobnoj podršci u savladavanju svakodnevnih istraživačkih izazova.

Mom prijatelju i razrednoj, Aleksandri Mihailović, dugujem posebnu zahvalnost. Bila je i ostala moj iskreni oslonac. Zahvaljujem joj se na prelepim trenucima tokom školovanja, ali još više na svim dragocenim razgovorima, razumevanju i bezrezervnoj podršci koja traje dugi niz godina nakon toga, prateći me sve do danas.

Biljani i Ani Kovačević od srca zahvaljujem na decenijskom prijateljstvu. Hvala vam na svakom zajedničkom putovanju, letovanju i druženju, ali pre svega na iskrenoj ljubavi, podršci i pravom prijateljstvu koje negujemo svih ovih godina.

Isidori Vuletić zahvaljujem na višedecenijskom prijateljstvu koje mi neizmerno znači. Hvala ti na svakom zajedničkom trenutku, druženju, iskrenoj ljubavi i podršci koja nikada nije izostala.

Sestrama Anđeli, Jovani, Stefani i Milici, kao i braći Petru i Marku, zahvaljujem na ljubavi, prelepim zajedničkim trenucima i osloncu na svakom koraku. Iako je zbog mojih obaveza ponekad nedostajalo zajedničkog vremena, vaša podrška i razumevanje nikada nisu izostali, na čemu sam vam beskrajno zahvalan.

Svojim učenicima i studentima želim da poručim da se iskreno nadam da sam im bio dobar uzor, jer sam ja od njih nesumnjivo mnogo toga naučio. Posebno hvala onima sa kojima sam vremenom izgradio i pravo prijateljstvo – Luki Grdiniću, Marku Terziću, Sofiji Zečević i Hristini Jović. Hvala vam na svim lepim trenucima i druženju, a naročito na onom posebnom periodu kada smo u istoj prostoriji delili trud i ambiciju – ja pišući ovu disertaciju, a vi spremajući vaše prijemne ispite.

Na samom kraju, svoju najveću zahvalnost i ljubav dugujem onima koji su moj najveći oslonac, mami Snežani Jakanovski, tati Vladimiru Jakanovskom, babama Stoji Ivanišević i Verki Jakanovski, te dedama Dobrosavu Jakanovskom i Marku Ivaniševiću, od srca hvala za bezrezervnu ljubav, neizmernu podršku tokom mog celokupnog života i školovanja, za sve prelepe zajedničke trenutke i za sve što ste učinili da stignem do ovog cilja.

ŠEĆERI I ORGANSKE KISELINE KAO POKAZATELJI AUTENTIČNOSTI MEDA

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio je razvoj, optimizacija i validacija analitičkih metoda za procenu autentičnosti meda zasnovanog na određivanju profila šećera i organskih kiselina, kao i njihovoj povezanosti sa fizičko–hemijskim parametrima i odnosom stabilnih izotopa ugljenika. Utvrđena je tačnost, preciznost, robusnost i osetljivost metoda za određivanje šećera i organskih kiselina primenom jonske hromatografije. Za obradu i interpretaciju dobijenih podataka primenjene su multivarijantne statističke metode. Rezultati su upoređeni sa podacima dobijenim analizom odnosa stabilnih izotopa ugljenika i visokoefikasnom tankoslojnom hromatografijom.

Rezultati su pokazali da sadržaj pojedinačnih šećera i organskih kiselina značajno zavisi od biljnog porekla meda. Bagremov med karakterisali su povišen sadržaj fruktoze, erloze i maltoze, kao i visok odnos fruktoze i glukoze u odnosu na druge vrste meda, dok je medljikovac izdvojen kao hemijski najdistinktivnija vrsta zahvaljujući povišenom sadržaju trehaloze, rafinoze, izomaltoze i melibioze, kao i limunske, jabučne, izolimunske, maleinske, ćilibarne i kininske kiseline. Multivarijantna analiza potvrdila je da kombinacija profila šećera i organskih kiselina sa fizičko–hemijskim parametrima i odnosima stabilnih izotopa ugljenika omogućava pouzdanu klasifikaciju medova prema biljnom poreklu, pri čemu su bagremov med i medljikovac pokazali potpuno razdvajanje bez pogrešne klasifikacije (misklasifikacije).

Rezultati potvrđuju da šećeri i organske kiseline predstavljaju značajan izvor informacija za karakterizaciju meda i procenu njegove autentičnosti. Razvijeni integralni analitički pristup doprinosi unapređenju postojećih procedura kontrole kvaliteta i autentičnosti meda i predstavlja osnovu za dalji razvoj metoda za otkrivanje prevara na tržištu meda.

Ključne reči: Med, Autentičnost, Šećeri, Organske kiseline, Biljno poreklo, Hromatografija, Validacija metode, Hemometrija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

SUGARS AND ORGANIC ACIDS AS INDICATORS OF THE HONEY AUTHENTICITY

The subject of this doctoral dissertation was the development, optimization, and validation of analytical methods for the assessment of honey authenticity based on the determination of sugar and organic acid profiles, as well as their relationship with physicochemical parameters and stable carbon isotope ratios. The accuracy, precision, robustness, and sensitivity of the ion chromatography methods for the determination of sugars and organic acids were established. Multivariate statistical methods were applied for the processing and interpretation of the obtained data. The results were compared with those obtained by stable carbon isotope ratio analysis and high-performance thin-layer chromatography.

The results demonstrated that the content of individual sugars and organic acids significantly depends on the botanical origin of honey. Acacia honey was characterized by an elevated content of fructose, erlose, and maltose, as well as a high fructose-to-glucose ratio compared to other honey types, whereas honeydew honey emerged as the most chemically distinctive type due to elevated levels of trehalose, raffinose, isomaltose, and melibiose, alongside citric, malic, isocitric, maleic, succinic, and quinic acids. Multivariate analysis confirmed that the integration of sugar and organic acid profiles with physicochemical parameters and stable carbon isotope ratios enables reliable classification of honeys according to their botanical origin, with acacia honey and honeydew honey demonstrating complete separation without misclassification.

Results confirm that sugars and organic acids represent a significant source of information for honey characterization and authenticity assessment. The developed integrated analytical approach contributes to the improvement of current honey quality and authenticity control procedures and provides a framework for the further development of methods aimed at detecting honey adulteration.

Keywords: Honey, Authenticity, Sugars, Organic acids, Botanical origin, Chromatography, Method validation, Chemometrics

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Med	3
2.2. Hemijski sastav meda	4
2.2.1. Šećeri	5
2.2.2. Organske kiseline	10
2.2.3. Amino–kiseline, proteini i enzimi	14
2.2.4. Minerali	14
2.2.5. Isparljive komponente	15
2.2.6. Fenolna jedinjenja	15
2.3. Biljno i geografsko poreklo meda	15
2.4. Autentičnost meda	16
2.5. Šećerni sirupi	18
2.6. Analitičke metode za proveru autentičnosti meda	19
2.6.1. Visokoefikasna anjonsko–izmenjivačka tečna hromatografija	20
2.6.2. Visokoefikasna tečna hromatografija	30
2.6.3. Visokoefikasna tankoslojna hromatografija	31
2.6.4. Masena spektrometrija odnosa izotopa	32
2.6.5. Gasna hromatografija	33
2.6.6. Kapilarna elektroforeza	33
2.6.7. Nuklearno–magnetna rezonancija	34
2.6.8. Metagenomska analiza (metabarkoding DNK markera)	35
2.7. Validacija analitičkih metoda	36
2.8. Statistička obrada rezultata	39
2.8.1. Analiza glavnih komponentata	40
2.8.2. Diskriminantna analiza delimičnih najmanjih kvadrata	41
2.8.3. Priprema i obrada slika hromatograma	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO	42
3.1. Uzorci meda	42
3.2. Reagensi i materijali	42
3.3. Melizopalinološka analiza	43
3.4. Fizičko–hemijski parametri	44
3.4.1. Određivanje sadržaja vode	44

3.4.2. Određivanje električne provodljivosti.....	45
3.4.3. Određivanje slobodne kiselosti	46
3.4.4. Određivanje sadržaja 5–hidroksimetilfurfurala	46
3.4.5. Određivanje aktivnosti dijastaze	47
3.5. Određivanje odnosa stabilnih izotopa ugljenika	48
3.6. Profil šećera	49
3.6.1. Optimizacija hromatografskih uslova	49
3.6.2. Validacija metode	49
3.6.3. Analiza profila šećera.....	50
3.6.4. Kvalitativna analiza profila šećera primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije.....	51
3.7. Profil organskih kiselina.....	52
3.7.1. Optimizacija hromatografskih uslova	52
3.7.2. Validacija metode	53
3.7.3. Analiza profila organskih kiselina	53
3.8. Statistička obrada rezultata	53
4. REZULTATI I DISKUSIJA	55
4.1. Melizopalinološka analiza	55
4.1.1. Bagremov med.....	56
4.1.2. Lipov med	57
4.1.3. Suncokretov med	58
4.1.4. Med od uljane repice.....	59
4.1.5. Medljikovac	60
4.2. Kontrola kvaliteta uzoraka	60
4.3. Fizičko–hemijski parametri	60
4.3.1. Sadržaj vode	61
4.3.2. Električna provodljivost	61
4.3.3. Slobodna kiselost	62
4.3.4. Aktivnost dijastaze	63
4.3.5. Sadržaj šećera.....	64
4.3.6. Sadržaj HMF–a	67
4.3.7. Analiza fizičko–hemijskih parametara	67
4.3.8. Studija stabilnosti odabranih fizičko–hemijskih parametara na primeru uzoraka bagremovog meda	70
4.4. Odnos stabilnih izotopa ugljenika	73
4.5. Profil šećera	76

4.5.1. Optimizacija hromatografskih uslova.....	76
4.5.2. Validacija metode	78
4.5.3. Analiza profila šećera.....	80
4.6. Integralni analitički pristup u detekciji prisustva egzogenih šećera	87
4.7. Profil organskih kiselina.....	95
4.7.1. Optimizacija hromatografskih uslova.....	96
4.7.2. Validacija metode	98
4.7.3. Analiza profila organskih kiselina	99
4.7.4. Model–sistem bagremovog meda sa udelom invertnog sirupa	104
4.8. Diferencijacija uzoraka meda prema biljnom poreklu	108
5. ZAKLJUČAK.....	116
6. LITERATURA	119
7. PRILOG.....	129

1. UVOD

Med je prirodna slatka supstanca koju pčele vrste *Apis mellifera* proizvode preradom biljnog nektara ili izlučevina biljnih vaši. Zahvaljujući specifičnim senzornim svojstvima, nutritivnoj vrednosti i prisustvu brojnih bioaktivnih komponenti, med predstavlja jednu od najcenjenijih prirodnih namirnica. Njegov hemijski sastav je izuzetno složen i zavisi od brojnih faktora, uključujući biljno i geografsko poreklo, klimatske uslove, tip zemljišta, vrstu pčela kao i način prikupljanja i skladištenja. U hemijskom smislu med je presićeni vodeni rastvor šećera. Dominantnu komponentu meda čine monosaharidi, pre svega fruktoza i glukoza, dok su u manjim količinama prisutni disaharidi, oligosaharidi, organske kiseline, proteini, enzimi, amino–kiseline, minerali, vitamini i fenolna jedinjenja. Razlike u sastavu i međusobnim odnosima ovih komponenti odgovorne su za specifična svojstva medova različitog porekla i predstavljaju osnovu njihove hemijske karakterizacije.

Visoka tržišna vrednost meda, ograničena proizvodnja pojedinih vrsta i rastuća potražnja učinili su ovu namirnicu jednim od najčešće falsifikovanih prehrambenih proizvoda na globalnom tržištu. Krivotvorenje se najčešće sprovodi direktnim dodatkom jeftinijih šećernih sirupa u med ili indirektno, prihranjivanjem pčela egzogenim izvorima ugljenih hidrata tokom perioda sakupljanja nektara. Takvi postupci mogu značajno izmeniti prirodni hemijski sastav meda, pri čemu se dobijeni proizvod često ne razlikuje značajno od autentičnog meda na osnovu rutinske kontrole kvaliteta analizom osnovnih fizičko–hemijskih parametara i senzorske ocene. Zbog toga procena autentičnosti meda predstavlja jedan od najvažnijih izazova savremene analitike hrane, što ima izuzetan ekonomski i regulatorni značaj.

Tokom prethodnih decenija razvijen je veliki broj analitičkih pristupa za kontrolu autentičnosti meda. Pored tzv. klasičnog pristupa koji kombinuje fizičko–hemijsku, senzorsku i polensku analizu, savremene strategije obuhvataju i određivanje velikog broja specifičnih parametara primenom sofisticiranih hromatografskih i spektroskopskih tehnika, analize odnosa stabilnih izotopa, kao i biohemijskih metoda zasnovanih na analizi DNK. Među njima, analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika smatra se jednom od najznačajnijih metoda za detektovanje dodatih šećernih sirupa poreklom od C4 biljaka, kao što su kukuruz i šećerna trska. Međutim, uprkos značajnom napretku u oblasti kontrole autentičnosti meda, otkrivanje određenih oblika krivotvorenja i dalje predstavljaju ozbiljan analitički izazov. Posebno se to odnosi na dodatak sirupa poreklom od C3 biljaka, poput šećerne repe, pirinča ili pšenice, čiji izotopski sastav može biti veoma sličan sastavu prirodnog meda. Ovakva ograničenja ukazuju na potrebu za identifikacijom dodatnih hemijskih pokazatelja koji bi mogli doprineti unapređenju postojećih pristupa u kontroli autentičnosti meda.

Među komponentama od posebnog značaja za hemijsku karakterizaciju meda izdvajaju se šećeri i organske kiseline. Šećeri predstavljaju dominantnu frakciju meda i u najvećoj meri određuju njegova osnovna fizičko–hemijska svojstva, dok organske kiseline, iako prisutne u znatno nižim koncentracijama, imaju važnu ulogu u formiranju kiselosti, arome, ukusa i ukupne stabilnosti proizvoda. Dosadašnja istraživanja pokazala su da sadržaj pojedinačnih šećera i organskih kiselina varira u zavisnosti od biljnog porekla meda, geografskog područja proizvodnje i uslova skladištenja. Istovremeno, varijacije u njihovom sastavu mogu da predstavljaju i direktnu posledicu neadekvatnog skladištenja, spontane fermentacije ili krivotvorenja egzogenim šećerima.

Iako su šećeri i organske kiseline relativno dobro proučeni sa aspekta karakterizacije meda, odnosno određivanja njegovog hemijskog sastava, njihova primena u proceni autentičnosti još uvek predstavlja aktivnu oblast istraživanja. Dosadašnji rezultati ukazuju na mogućnost povezivanja pojedinih komponenti sa biljnim poreklom meda, međutim značaj njihovih međusobnih odnosa i potencijal integrisane interpretacije ovih podataka u cilju ocene autentičnosti još uvek nisu u potpunosti provereni, odnosno potvrđeni. Poseban interes predstavlja mogućnost sveobuhvatnog sagledavanja uticaja velikog broja analitičkih podataka primenom savremenih statističkih metoda,

koje omogućavaju izdvajanje obrazaca i veza koje nije moguće uočiti analizom pojedinačnih parametara.

Polazeći od značaja pojedinačnih sastojaka kao parametara kvaliteta i indikatora porekla meda, analitičke pouzdanosti njihovog određivanja ali i dovoljno široke dostupnosti primenjenih metoda analize, cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje potencijala profila šećera i organskih kiselina kao pokazatelja autentičnosti meda. U tu svrhu razvijene su, optimizovane i validovane metode za određivanje pomenutih jedinjenja primenom jonske hromatografije sa elektrohemijском i konduktometrijskom detekcijom u uzorcima meda različitog biljnog porekla. Dobijeni rezultati obrađeni su primenom multivarijantnih statističkih metoda radi pronalaženja obrazaca grupisanja i parametara koji najviše doprinose diferencijaciji uzoraka. Dodatno, pouzdanost razvijenog pristupa procenjena je analizom uzoraka sa dodatim šećernim sirupima, a interpretacija rezultata dopunjena je i podacima dobijenim primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije i analize odnosa stabilnih izotopa ugljenika.

2. OPŠTI DEO

2.1. Med

Med je 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. Prema poreklu, med se klasifikuje kao cvetni (nektarni) med i medljikovac ^{1,2}.

Cvetni ili nektarni med nastaje iz nektara, derivata floemskog i ksilemskog soka koji potiče iz specijalizovanih grupa biljnih ćelija koje se nazivaju nektarije. Nektarije se mogu naći u cvetu ili na delu cveta (floralne) ili se mogu formirati na drugim delovima biljke (ekstrafloralne). Nektar je po sastavu vodeni rastvor šećera (od 5% do 80%), amino–kiselina, organskih kiselina, proteina, lipida, minerala i drugih komponenti. Tačan sastav nektara veoma varira u zavisnosti od biljne vrste i uslova životne sredine ³.

Nakon sakupljanja nektara, medonosna pčela ga skladišti u mednoj kesi pri čemu dolazi do mešanja nektara sa sekretima pljuvačnih i hipofaringealnih žlezda. Tokom ovog procesa, sekreti pomenutih žlezda, koji sadrže različite enzime, počinju hemijski da menjaju nektar. Enzimi kao što su diastaza i invertaza, razlažu više saharide, posebno saharozu, na monosaharide, dok prisutna glukozo–oksidaza ima ulogu u oksidaciji glukoze do glukonske kiseline i proizvodnji vodonik–peroksida. Stoga, hemijska transformacija nektara u med započinje neposredno nakon njegovog prikupljanja ³.

Kombinacijom hidrolize saharoze u glukozu i fruktozu i isparavanjem viška vode dolazi do sazrevanja nektara u med. Med sadrži manje od 20% vode, stoga čak 80% ukupne mase nektara mora da ispari. Kako je prekomerna vlažnost u ćelijama saća štetna za proizvodnju meda, pčele mašući svojim krilima ubrzavaju isparavanje vode iz nektara ³.

Medljikovac je specifična vrsta meda koja ne potiče od nektara i najčešće ga pčele proizvode prikupljanjem i preradom izlučevina biljnih vaši (*Hemiptera*) na živim delovima biljaka. Redje, drugi izvor medljikovca je medljika (medna rosa), sladunjav floemski sok koji izlučuju biljke (najčešće četinari), pri čemu insekti ne deluju kao posrednici ^{3,4}.

Prema poreklu nektara, cvetni med se može klasifikovati kao jednocvetni (monoflorni) ili višecvetni (poliflorni) u zavisnosti od toga da li dominantno potiče od jedne ili više biljnih vrsta. Obično se med klasifikuje kao monofloran kada najmanje 45% ukupnih polenovih zrna potiče od jedne biljne vrste. Monoflorni medovi imaju karakteristična senzorska svojstva uslovljena dominantnim prisustvom jedne biljne vrste i uglavnom ostvaruju veću tržišnu vrednost u odnosu na poliflorne medove, koji nastaju od većeg broja biljnih vrsta ⁵⁻⁷.

Prema zvaničnim podacima Saveza pčelarskih organizacija Srbije (SPOS), najzastupljeniji monoflorni medovi u Srbiji su bagremov (41,70%), suncokretov (29,57%) i lipov (4,55%) med, dok su med od uljane repice (1,81%) i med od bagremca (0,38%) manje zastupljeni. Prinosi meda po godinama za koje SPOS ima kompletne podatke prikazani su u Tabeli 1. Dominacija pojedinih monoflornih medova u proizvodnji posledica je rasprostranjenosti odgovarajućih medonosnih biljnih vrsta i uslova paše na teritoriji Srbije.

Tabela 1. Količina (t) proizvedenih monoflornih vrsta meda u Srbiji u periodu od 2012. do 2022. godine[#]

Godina	Bagrem	Suncokret	Lipa	Uljana repica	Bagremac	Ostali
2012	2043,3	1757,1	450,6	49,8	34,0	31,7
2013	3052,3	2096,9	342,3	48,9	39,6	11,5
2014	547,0	1491,6	101,6	94,4	15,7	8,7
2015	4822,9	1819,2	255,5	85,9	26,0	14,7
2016	597,5	1583,6	322,6	89,4	18,7	22,8
2017	1474,5	1822,5	85,8	95,6	21,8	24,2
2018	3626,7	1535,8	298,1	87,4	29,6	72,4
2019	1150,6	1161,9	244,3	64,1	6,5	15,6
2020	1849,1	1174,6	209,0	126,1	4,9	4,4
2021	2056,7	1501,9	97,6	137,8	14,4	18,5
2022	3734,6	1755,3	318,0	205,6	18,5	13,2
Prosečan udeo* (%)	41,70	29,57	4,55	1,81	0,38	0,40

[#]Zvanični podaci sa sajta SPOS-a, *Ostatak do 100% čine medljikovac, poliflorni i mešane vrste meda

2.2. Hemijski sastav meda

Med je složena namirnica koja sadrži veliki broj različitih organskih i neorganskih supstanci od kojih su ugljeni hidrati i voda prisutni u najvećim količinama. Ugljeni hidrati su glavni sastojci meda i čine 95% njegove suve mase. Među njima, redukujući šećeri glukoza (22–40%) i fruktoza (30–44%) su dominantni monosaharidi, dok je glavni disaharid saharoza, prisutna u manjoj količini. Osim mono- i disaharida, u medu su prisutni i viši šećeri poput erloze, rafinoze, melezitose i maltotrioze. Supstance prisutne u manjoj količini uključuju amino-kiseline (naročito prolin) i proteine (uključujući enzime), organske kiseline, vitamine (naročito tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotensku kiselinu (B₅) i piridoksal (B₆)), minerale od kojih su kalcijum, magnezijum, kalijum i fosfor prisutni u većim količinama, i gvožđe, bakar, cink, kobalt, natrijum, mangan, selen, hrom, molibden i jod koji su prisutni u manjim količinama, pigmente, fenolna jedinjenja, kao i veći broj isparljivih jedinjenja. Iako je koncentracija fenolnih jedinjenja u medu niska, njihove glavne klase, flavonoidi i fenolne kiseline, suštinski doprinose antioksidativnom svojstvu meda ^{3, 6–8}.

Hemijski sastav (Tabela 2), boja, aroma i ukus meda zavise od biljnog izvora, geografskog područja prikupljanja, klimatskih uslova tokom paše, pčelinje vrste koja ga proizvodi, kao i od primenjene pčelarske prakse. Zbog uticaja navedenih faktora, sastav meda može značajno varirati i kod uzoraka istog biljnog porekla ^{3, 7, 9}.

Medljikovac uglavnom sadrži veću količinu oligosaharida u poređenju sa cvetnim medom. Pored toga, medljikovac je tamnije boje i ima znatno više vrednosti električne provodljivosti i slobodne kiselosti u odnosu na cvetne medove ⁷.

Određivanje biljnog i geografskog porekla meda od velikog je značaja zbog kontrole kvaliteta i autentičnosti proizvoda. Biljno poreklo meda procenjuje se na osnovu zastupljenosti polenovih zrna, kao i karakterističnih senzorskih i fizičko-hemijskih svojstava ⁷.

Tokom skladištenja med može pretrpeti promene u sastavu usled fermentacije, oksidacije i izlaganja povišenim temperaturama. Dugotrajno skladištenje i/ili zagrevanje dovode do dehidratacije monosaharida Majlardovom (*eng. Maillard*) reakcijom i nastanka 5–hidroksimetilfurfurala (HMF)³.

Tabela 2. Prosečan hemijski sastav meda (g/100 g)^{10–12}

Parametar	Cvetni med		Medljikovac	
	Opseg	Prosek	Opseg	Prosek
Voda	15 – 20	17,2	15 – 20	16,3
Monosaharidi				
Glukoza	24,0 – 40,0	31,3	19,0 – 32,0	26,1
Fruktoza	30,0 – 45,0	38,2	28,0 – 40,0	31,8
Disaharidi				
Saharoza	0,1 – 4,8	0,7	0,1 – 4,7	0,5
Maltoza	1,44 – 1,86	1,60	-	-
Izomaltoza	1,16 – 1,96	1,58	-	-
Turanoza	0,02 – 0,03	0,03	-	-
Trehaloza	0,11 – 0,26	0,18	-	-
Melibioza	0,09 – 0,18	0,13	-	-
Trisaharidi				
Erloza	0,36 – 0,69	0,51	-	-
Rafinoza	0,06 – 0,12	0,09	-	-
Maltotrioza	1,15 – 1,29	1,22	-	-
Melezitoza	0,26 – 0,39	0,35	-	-
Oligosaharidi		3,1		10,1
Ukupni šećeri	60,0 – 80,0	79,7	60,0 – 82,0	80,5
Organske kiseline	0,1 – 0,5	0,3	0,2 – 0,8	0,6
Amino–kiseline	0,2 – 0,4	0,3	0,4 – 0,7	0,6
Minerali	0,1 – 0,5	0,2	0,6 – 2,0	0,9
Vitamini	0,001 – 0,003	0,002	0,001 – 0,004	0,003
pH vrednost	3,5 – 4,5	3,9	4,5 – 6,5	5,2

Adaptirano prema Bogdanov et al., 2008; Kamboj et al., 2020; Schievano et al., 2012.

2.2.1. Šećeri

Monosaharidi predstavljaju dominantne šećere u medu, pri čemu su glukoza i fruktoza najzastupljeniji. Osim monosaharida, u medu su u manjim količinama prisutni i različiti oligosaharidi. Na sadržaj i odnos pojedinačnih šećera u medu, između ostalog, utiču sastav prikupljenog nektara kao i njegovo biljno i geografsko poreklo^{3, 5, 10, 13}.

Gasnom hromatografijom u medu je identifikovano 16 oligosaharida, uključujući 11 disaharida (maltozu, turanozu, kojibiozu, saharozu, palatinozu, gentiobiozu, celobiozu, izomaltozu, neotrehalozu, nigerozu i laminaribiozu) i 5 trisaharida, među kojima su melezitoza, izomaltotrioza, rafinoza, kestoza i izomelezitoza⁴. Daljim razvojem analitičkih metoda u uzorcima meda identifikovan je i veći broj tri- i tetrasaharida (Tabela 3)^{4, 13}.

Poznato je da između medljikovaca i cvetnih medova postoje razlike u sastavu šećera. Medljikovce odlikuje veći sadržaj oligosaharida, uglavnom melezitoze i rafinoze, koji su u cvetnom medu prisutni u manjim količinama^{4, 10, 13}. U nekim vrstama meda, poput meda od vreska (*Calluna vulgaris*), šiljaste lavande (*Lavandula latifolia*), francuske lavande (*Lavandula dentata*), timijana (*Thymus*

vulgaris) i medljikovca, identifikovani su i oligosaharidi kao što su panoza, izomaltotrioza, maltotrioza i erloza ¹³.

Koncentracija fruktoze i glukoze, kao i njihov odnos, korisni su pokazatelji za klasifikaciju i procenu autentičnosti monoflornih medova. U većini vrsta meda, fruktoza je šećer prisutan u najvećoj količini, osim u nekim medovima kao što su med od uljane repice (*Brassica napus*) i maslačka (*Taraxacum officinale*), kod kojih je sadržaj glukoze veći od sadržaja fruktoze, zbog čega ovi medovi pokazuju veću sklonost ka kristalizaciji ^{3, 5, 13}. Takođe, za razlikovanje monoflornih medova mogu se koristiti i drugi fizičko-hemijski parametri i njihovi odnosi, kao što su električna provodljivost i odnos glukoza/voda (G/V) ⁵.

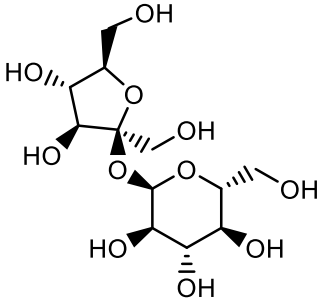
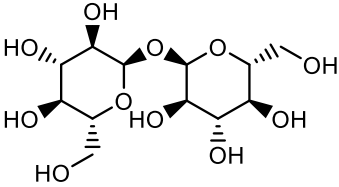
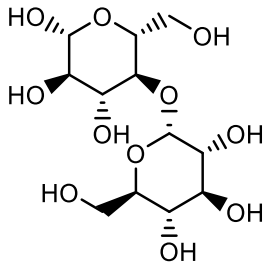
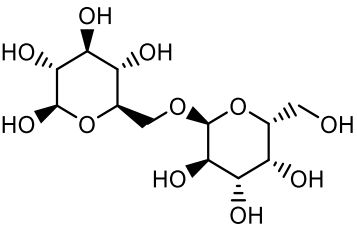
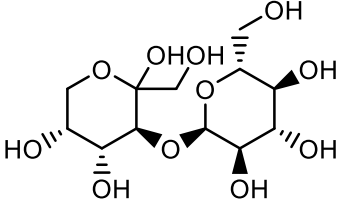
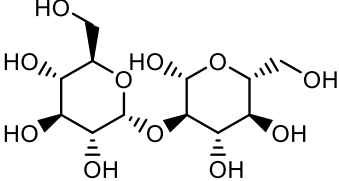
Pored monosaharida i disaharida, određeni viši oligosaharidi mogu biti korisni za ocenu autentičnosti i biljnog porekla meda. Profil ugljenih hidrata može biti koristan za karakterizaciju pojedinih monoflornih medova i medljikovaca, dok je kod poliflornih vrsta meda interpretacija rezultata otežana zbog složenijeg sastava uslovljenog prisustvom nektara različitih biljnih vrsta ¹³⁻¹⁶. Za određivanje šećera u medu koriste se različite tehnike tečne i gasne hromatografije, spektroskopske i enzimske metode ^{6, 7, 17}.

Tabela 3. Šećeri identifikovani u medu

Naziv	Složenost – Tip [#]	Struktura	Reference
Glukoza	Monosaharid – R		11, 14, 16, 18–24
Fruktoza	Monosaharid – R		11, 14, 16, 18–25
Manoza	Monosaharid – R		14, 16
Ksiloza	Monosaharid – R		11, 14
Arabinoza	Monosaharid – R		14, 16
Riboza	Monosaharid – R		14, 16

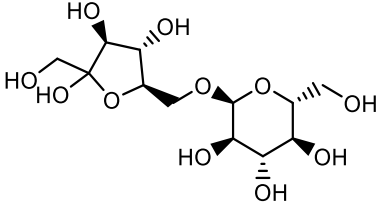
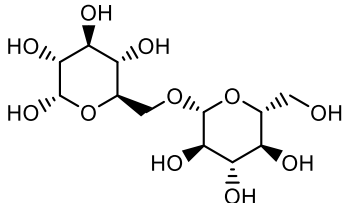
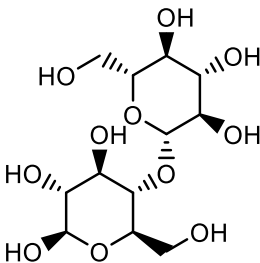
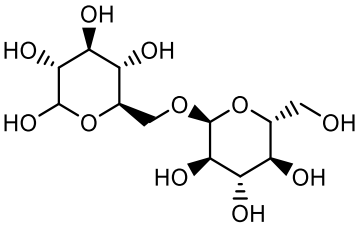
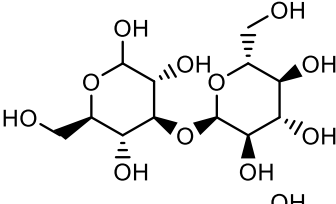
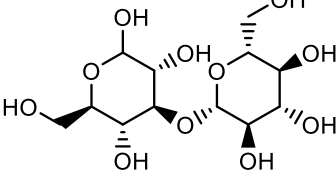
[#]Tip (R – redukujući šećer; N – neredukujući šećer)

Tabela 3. Nastavak

Naziv	Složenost – Tip [#]	Struktura	Reference
Saharoza	Disaharid – N		11, 14, 16, 17, 25–27
Trehaloza	Disaharid – N		11, 16, 17, 27, 28
Maltoza (Maltobioza)	Disaharid – R		11, 16, 17, 19, 25–27, 29
Melibioza	Disaharid – R		11, 14, 16, 19, 20, 30, 31
Turanoza	Disaharid – R		11, 14, 16, 19, 26, 27, 31
Kojibioza	Disaharid – R		14, 16, 19, 27, 32

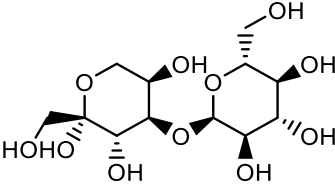
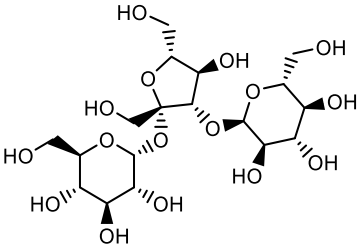
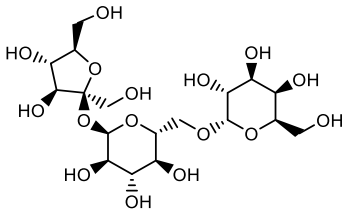
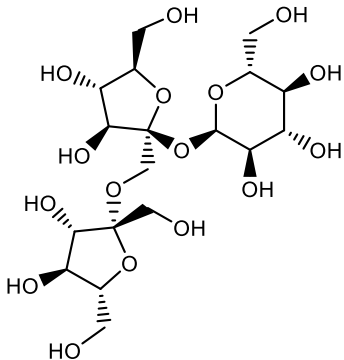
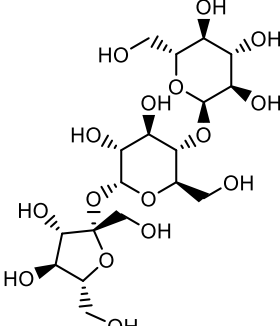
[#]Tip (R – redukujući šećer; N – neredukujući šećer)

Tabela 3. Nastavak

Naziv	Složenost – Tip [#]	Struktura	Reference
Palatinoza (Izomaltuloza)	Disaharid – R		14, 16, 19–21, 32, 33
Gentiobioza	Disaharid – R		16, 17, 19–21, 32, 34
Celobioza	Disaharid – R		16, 32
Izomaltoza	Disaharid – R		11, 16, 17, 19, 26–28
Nigeroza	Disaharid – R		14, 16, 19, 32–34
Laminariboza	Disaharid – R		16, 20, 32

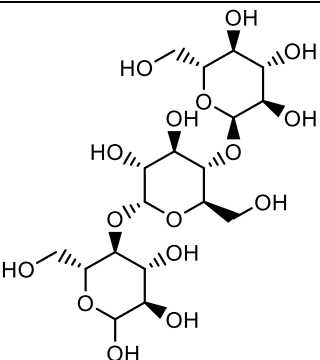
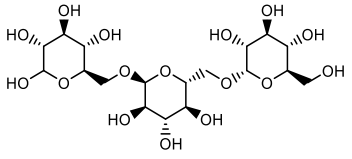
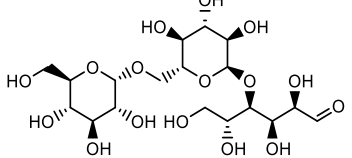
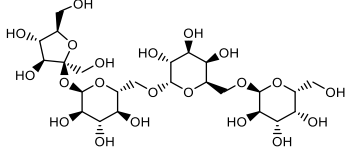
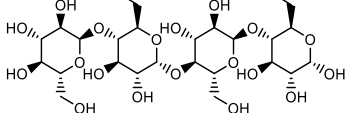
[#]Tip (R – redukujući šećer; N – neredukujući šećer)

Tabela 3. Nastavak

Naziv	Složenost – Tip [#]	Struktura	Reference
Maltuloza	Disaharid – R		16, 19, 20, 32
Melezitoza (Melicitoza)	Trisaharid – N		11, 14, 16, 17, 19, 25, 27
Rafinoza	Trisaharid – N		11, 14, 16, 17, 21, 27, 30
Kestoza	Trisaharid – N		16, 19, 20, 27, 32
Erloza	Trisaharid – N		11, 14, 16, 17, 19, 27, 35

[#]Tip (R – redukujući šećer; N – neredukujući šećer)

Tabela 3. Nastavak

Naziv	Složenost – Tip [#]	Struktura	Reference
Maltotrioza	Trisaharid – R		11, 16, 17, 19–21, 32
Izomaltotrioza	Trisaharid – R		14, 16, 17, 19, 32
Panoza	Trisaharid – R		16, 17, 20, 21, 34
Stahioza	Tetrasaharid – N		14, 16
Maltotetroza	Tetrasaharid – R		11, 16, 17, 19

[#]Tip (R – redukujući šećer; N – neredukujući šećer)

2.2.2. Organske kiseline

Organske kiseline, iako prisutne u količinama manjim od 0,5%, doprinose fizičko–hemijskim i senzorskim karakteristikama meda. Njihov sadržaj povezuje se sa antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima meda, a može ukazivati i na promene nastale tokom fermentacije i skladištenja. Organske kiseline potiču direktno iz nektara ili nastaju enzimskim procesima tokom sazrevanja meda. Pojedine organske kiseline, poput mravlje i oksalne kiseline, koriste se i u tretmanima protiv grinje *Varroa destructor* u pčelinjim društvima, zbog čega njihovi ostaci mogu biti prisutni u medu. Fizičko–hemijska svojstva, kao što su boja, ukus, pH–vrednost, kiselost i električna provodljivost meda, usko su povezana sa sadržajem organskih kiselina. Zbog toga organske kiseline mogu poslužiti i kao pokazatelji biljnog i geografskog porekla meda ^{3, 22, 31, 36, 37}.

Prvobitno se smatralo da su mravlja i limunska kiselina dominantne u medu, međutim, ustanovljeno je da je glukonska kiselina najzastupljenija organska kiselina ³⁸. Ona nastaje oksidacijom glukoze dejstvom enzima glukozo–oksidaze, koji pčele dodaju tokom sazrevanja meda, ali i aktivnošću bakterija roda *Gluconobacter spp.* prisutnih u digestivnom traktu pčela ^{36, 38}. Sadržaj glukonske

kiseline zavisi od stepena zrelosti meda, pri čemu duže zrenje doprinosi povećanoj aktivnosti glukozo–oksidaze i intenzivnijem formiranju glukonske kiseline ³⁶.

U sastav meda iz različitih regiona sveta ulaze kiseline kao što su glukonska, limunska, izolimunska, asparaginska, buterna, sirćetna, fumarna, galakturonska, mravlja, glutaminska, glutarna, glukonska, glikolna, glioksilna, α –hidroksiglutarina, α –ketoglutarina, jabučna, mlečna, malonska, metilmalonska, 2–oksopentanska, propionska, pirogroždana, kininska, šikiminska, ćilibarna, vinska, oksalna i druge (Tabela 4) ^{3, 22}.

Profil organskih kiselina predstavlja jedan od parametara koji može doprineti proceni autentičnosti i karakterizaciji meda. Za određivanje organskih kiselina u medu koriste se različite tehnike gasne i tečne hromatografije, kao i enzimске metode ³¹.

Tabela 4. Organske kiseline u medu

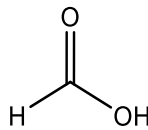
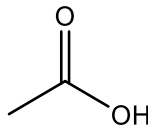
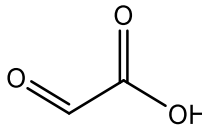
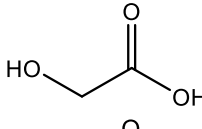
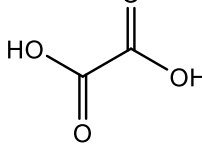
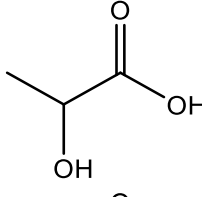
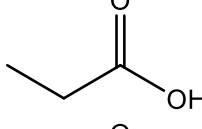
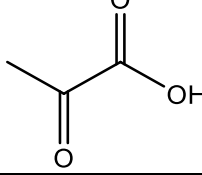
Naziv	Dužina niza/Tip	Struktura	Reference
Mravlja (metanska)	C1 – Zasićena		38–44
Sirćetna (etanska)	C2 – Zasićena		38, 40, 44
Glioksilna (oksoetanska)	C2 – Zasićena		40
Glikolna (Hidroksietanska)	C2 – Zasićena		44, 45
Oksalna	C2 – Zasićena		39, 42, 45
Mlečna (2–hidroksipropanska)	C3 – Zasićena		38, 40–42, 44, 45
Propionska (propanska)	C3 – Zasićena		40, 41
Pirogroždana (2–oksopropanska)	C3 – Zasićena		41, 42

Tabela 4. Nastavak

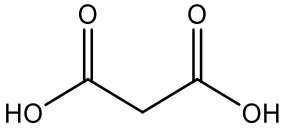
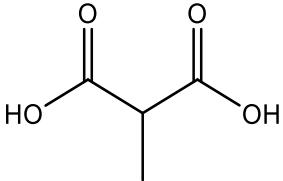
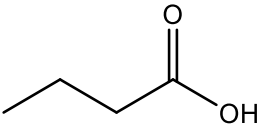
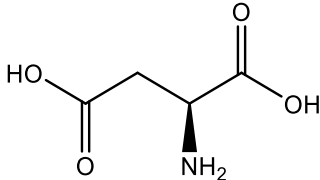
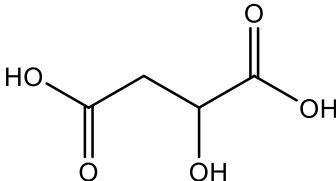
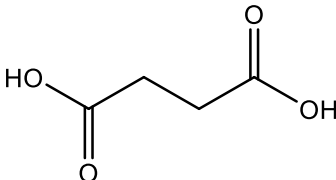
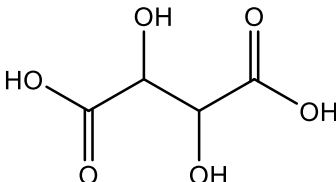
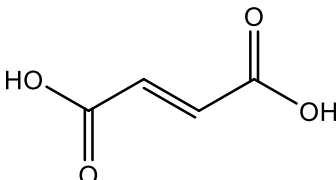
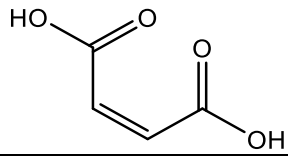
Naziv	Dužina niza/Tip	Struktura	Reference
Malonska (propandikiselina)	C3 – Zasićena		40
Metilmalonska (2-metilpropandikiselina)	C4 – Zasićena		3
Buterna (butanska)	C4 – Zasićena		41, 42
Asparaginska ((2S)-2-aminobutandikiselina)	C4 – Zasićena		3
Jabučna (2-hidroksibutandikiselina)	C4 – Zasićena		22, 38–40, 42, 44, 46, 47
Ćilibarna (butandikiselina)	C4 – Zasićena		22, 38–40, 44–47
Vinska (2,3-dihidroksibutandikiselina)	C4 – Zasićena		22, 40, 45, 47
Fumarna ((E)-But-2-endikiselina)	C4 – Nezasićena		22, 40, 45, 46
Maleinska ((Z)-But-2-endikiselina)	C4 – Nezasićena		40, 46

Tabela 4. Nastavak

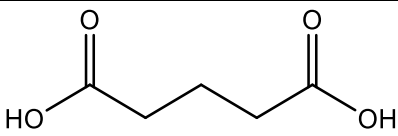
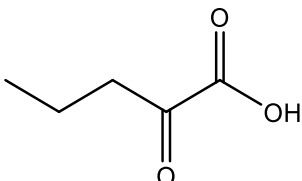
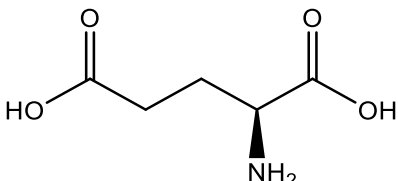
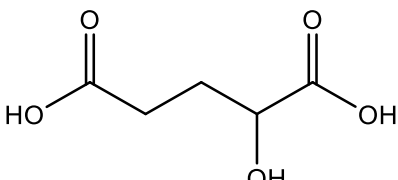
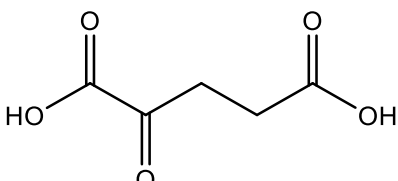
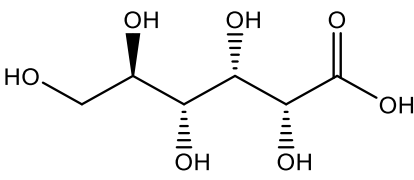
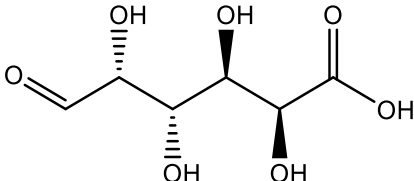
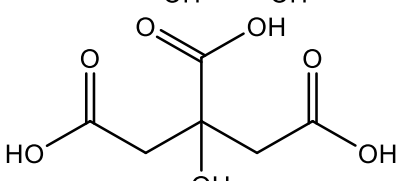
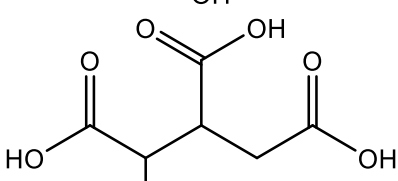
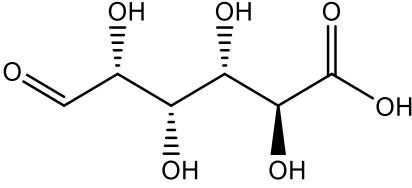
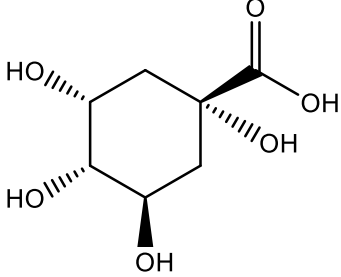
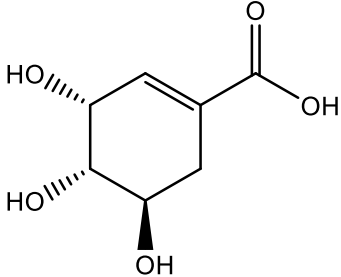
Naziv	Dužina niza/Tip	Struktura	Reference
Glutarna (pentandikiselina)	C5 – Zasićena		42, 44
2-Oksopentanska	C5 – Zasićena		3
Glutaminska ((2S)-2-aminopentandikiselina)	C5 – Zasićena		41
α -Hidroksiglutarna (2-hidroksipentandikiselina)	C5 – Zasićena		3
α -Ketoglutarna (2-oksopentandikiselina)	C5 – Zasićena		45
Glukonska ((2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanska)	C6 – Zasićena		39–42, 44, 45, 47
Galakturonska ((2S,3R,4S,5R)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-oksoheksanska)	C6 – Zasićena		41, 42
Limunska (2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna)	C6 – Zasićena		22, 37, 39–42, 44, 46, 47, 47
Izolimunska (1-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna)	C6 – Zasićena		22, 41

Tabela 4. Nastavak

Naziv	Dužina niza/Tip	Struktura	Reference
Glukuronska ((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,3,4,5- tetrahidroksi-6- oksoheksanska)	C6 – Zasićena		41, 42
Kininska ((1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1,3,4,5- tetrahidroksicikloheksan karboksilna)	C7 – Zasićena		22, 41, 42, 45
Šikiminska ((3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4,5- trihidroksicikloheks-1- enkarboksilna)	C7 – Nezasićena		22, 45

2.2.3. Amino–kiseline, proteini i enzimi

Amino–kiseline i proteini prisutni u medu su biljnog i životinjskog porekla. Uglavnom potiču iz nektara i polena biljaka, dok određeni deo amino–kiselina i proteina potiče iz sekreta pčela koji se dodaju tokom sazrevanja meda. Amino–kiseline su u medu prisutne u relativno malim količinama i čine manje od 1% njegove mase. Najzastupljenija amino–kiselina u medu i polenu je prolin sa 50–85% mase ukupnih amino–kiselina. Sadržaj prolina može se koristiti kao parametar ocene sazrevanja meda kao i u kontroli njegove autentičnosti, budući da niže koncentracije mogu ukazivati na dodatak šećernih sirupa ili nedovoljnu zrelost meda ^{5,9}. Osim prolina, u medu su identifikovane i druge amino–kiseline, uključujući glutaminsku i asparaginsku kiselinu, glutamin, histidin, glicin, treonin, alanin i arginin ^{3, 5, 37, 48}.

Deo proteina prisutnih u medu čine enzimi, među kojima su invertaza, α - i β -glukozidaza, katalaza, fosfataza, diastaza i glukozo–oksidaza. Dijastaza pripada grupi amilolitičkih enzima koji uključuju α - i β -amilazu koje učestvuju u hidrolizi skroba. α -Amilaza vrši hidrolizu α -D-(1→4) lanaca skroba, proizvodeći dekstrine dok β -amilaza hidrolizuje lanac skroba na krajevima formirajući maltozu. Glukozo–oksidaza konvertuje prisutnu glukozu u δ -glukolakton koji se naknadno hidrolizuje u glukonsku kiselinu. Pored δ -glukolaktona, glukozo–oksidaza proizvodi i vodonik–peroksid koji doprinosi antimikrobnim svojstvima meda ³.

2.2.4. Minerali

Minerali su u medu prisutni u relativno malim količinama, pri čemu medljikovci uglavnom sadrže više minerala od cvetnih medova. Sastav minerala u medu zavisi od biljnog i geografskog porekla, kao i od karakteristika zemljišta na kojem rastu medonosne biljke. Profil minerala često se koristi kao jedan od parametara za karakterizaciju i razlikovanje medova različitog porekla ^{3, 5, 48, 49}. Brojne studije pokazale su da biljno poreklo značajno utiče na sadržaj pojedinih elemenata u medu. Tako su Pisani i saradnici ⁵ analizom italijanskih medova različitog biljnog porekla utvrdili značajne razlike

u sastavu minerala među ispitivanim uzorcima ⁵. Pored karakterizacije porekla, određivanje elemenata u medu može biti značajno i za procenu izloženosti zagađujućim supstancama iz životne sredine, naročito potencijalno toksičnim elementima kao što su olovo, kadmijum, živa i arsen ⁵.

Kalijum je najzastupljeniji element u medu čineći trećinu ukupnog sadržaja minerala. Pored kalijuma, među zastupljenijim elementima nalaze se natrijum, kalcijum i magnezijum dok su gvožđe, bakar, cink, mangan, selen, jod, kobalt i nikl prisutni u manjim količinama ^{3,48}. Na elementalni sastav meda mogu uticati i materijali koji dolaze u kontakt sa medom tokom njegovog izdvajanja, prerade i skladištenja ⁵⁰.

2.2.5. Isparljive komponente

Senzorska svojstva meda, kao što su ukus, aroma i boja, značajno utiču na percepciju kvaliteta i prihvatljivost proizvoda kod potrošača. Biljno poreklo meda jedan je od najvažnijih faktora koji određuju njegova senzorska svojstva. Aroma meda rezultat je prisustva različitih isparljivih organskih jedinjenja (*eng. Volatile Organic Compounds*, VOCs). Budući da njihov sastav zavisi od biljnog porekla, profil isparljivih jedinjenja često se koristi za karakterizaciju i razlikovanje pojedinih vrsta meda. Ova jedinjenja mogu poticati iz nektara i medljike, ali i nastajati tokom sazrevanja i skladištenja meda ^{5,13}.

Savremene analitičke metode kao što je gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (GC–MS) omogućile su identifikovanje velikog broja isparljivih organskih jedinjenja u medu različitog biljnog porekla. Monoflorni medovi, za razliku od poliflornih, imaju karakterističnije profile isparljivih jedinjenja zbog dominantnog porekla od jedne biljne vrste. Isparljive komponente meda pripadaju različitim klasama jedinjenja, među kojima su najzastupljeniji aldehidi, ketoni, alkoholi, estri, ugljovodonici i karboksilne kiseline. Pojedina isparljiva jedinjenja, naročito određeni aldehidi i alkoholi, mogu nastati kao posledica mikrobiološke aktivnosti, skladištenja ili izlaganja povišenim temperaturama, te se koriste kao pokazatelji promena kvaliteta meda. Nasuprot tome, određena isparljiva jedinjenja povezana su sa specifičnim biljnim poreklom i mogu poslužiti kao markeri pojedinih vrsta monoflornih medova. Pored biljnog porekla, profil isparljivih jedinjenja može pružiti informacije i o geografskom poreklu meda ¹³.

2.2.6. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju grupu sekundarnih metabolita široko rasprostranjenih u biljkama. Imaju važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, uključujući oprašivanje, odbranu od biotičkog stresa, kao i formiranje boje i drugih senzorskih svojstava biljaka ^{51,52}.

Sastav i sadržaj fenolnih jedinjenja u medu u velikoj meri zavise od njegovog biljnog porekla. Fenolna jedinjenja prisutna u nektaru i polenu prenose se u med tokom njegovog nastajanja i doprinose njegovim antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima. Fenolna jedinjenja prisutna u medu uglavnom pripadaju grupama flavonoida i fenolnih kiselina. Među najčešće identifikovanim flavonoidima su kvercetin, luteolin, kempferol, apigenin, pinocembrin i galangin, dok su među fenolnim kiselinama zastupljene kafeinska, cimetna i siringinska kiselina ^{10,13,48,53}.

2.3. Biljno i geografsko poreklo meda

S obzirom na sve veću tržišnu vrednost monoflornih medova zaštićenog geografskog porekla, javlja se potreba za definisanjem jedinstvenih hemijskih parametara kao markera određenog geografskog i biljnog porekla meda ³¹. Med se klasifikuje kao monofloralan kada sadrži najmanje 45% polenovih zrna jedne biljne vrste, sa izuzetkom određenih medova koji imaju nedovoljno zastupljena (lavanda, žalfija, planika, itd.) ili prezastupljena zrna polena (facelija, uljana repica, kesten, eukaliptus, itd.). Zbog jedinstvenih senzorskih svojstava monoflorni medovi često su traženiji od poliflornih, pri čemu ova svojstva direktno proizilaze iz njihovog biljnog porekla, koje primarno određuje kvalitet meda. Pored biljnog, geografsko poreklo predstavlja važan faktor u diferencijaciji meda, s obzirom na to da

klimatski i pedološki uslovi određenog područja direktno oblikuju njegove karakteristike. Ova dva faktora su u uskoj vezi, jer je floristički sastav direktno uslovljen geografskim regionom. U pojedinim područjima, pčelinja paša je izrazito usmerena na dominantnu biljnu vrstu, što rezultira medom karakterističnog fitohemijskog profila. Tipičan primer je područje Fruške gore, gde rasprostranjenost lipe omogućava proizvodnju monoflornog lipovog meda sa visokim udelom polenovih zrna ove vrste (često i značajno više od 60%), što ga izdvaja kao proizvod prepoznatljivog geografskog i biljnog porekla ³¹.

Hemijski sastav se koristi za razlikovanje geografskog i biljnog porekla meda. Sadržaj minerala može poslužiti za potvrđivanje geografskog porekla, s obzirom na to da odražava karakteristike zemljišta, ali i stepen zagađenja životne sredine. Iako su zagađujuće supstance, poput toksičnih metala i pesticida, predložene kao indikatori specifičnih geografskih područja, u praksi nisu pokazale veći značaj ^{10, 37}. Kada je reč o organskim kiselinama, rezultati do kojih su došli Del Nozal i saradnici sugerišu da bi kvantitativni odnosi limunske, glukonske, jabučne, kininske i pirogroždane kiseline mogli poslužiti kao osnova za diferencijaciju meda po biljnom poreku. Isparljiva jedinjenja prisutna u medu veoma se teško izdvajaju iz složenog matriksa, kao takva ne pružaju dovoljno informacija o geografskom poreklu, ali mogu biti od koristi prilikom utvrđivanja biljnog porekla meda ³⁷. Da Silva i saradnici ³ navode da se određene isparljive komponente mogu koristiti kao biljni markeri; tako su jedinjenja sumpora, diketoni i alkani karakteristični za med od eukaliptusa, dok su heksanal i heptanal glavne komponente arome meda od lavande ³. Enzimaska aktivnost i proizvodi fermentacije pružaju informacije o uslovima skladištenja, ali nemaju poseban značaj za otkrivanje porekla meda. S druge strane, proteini i amino–kiseline predstavljaju korisne indikatore, pri čemu su različite studije pokazale da profil amino–kiselina omogućava uspešnu diferencijaciju medova na osnovu geografskog porekla ⁵⁴. Osim navedenih hemijskih parametara, melizopalinološka analiza ima fundamentalan doprinos u utvrđivanju biljnog porekla meda.

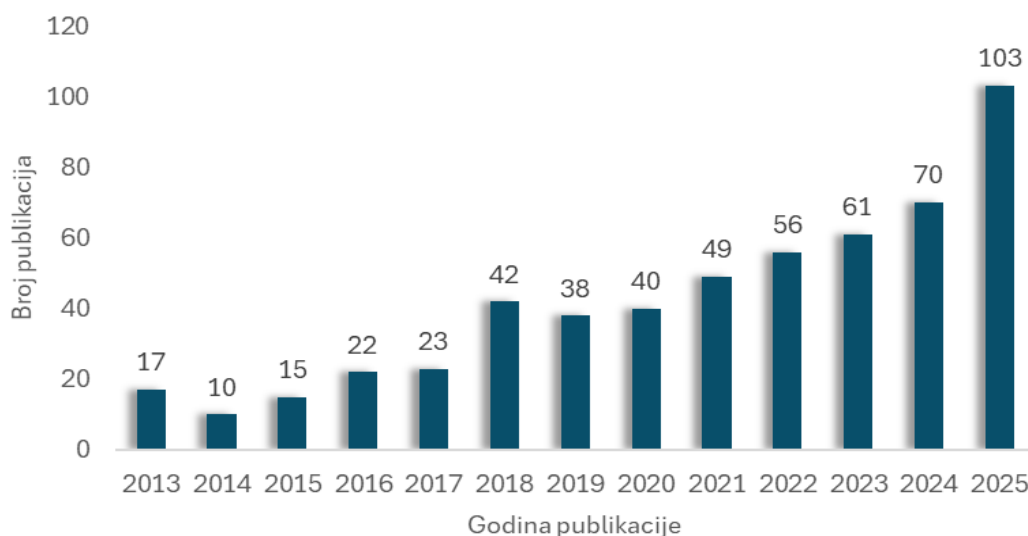
Iako se tradicionalno analitički parametri poput električne provodljivosti i profila šećera rutinski koriste za osnovnu diferencijaciju biljnog porekla meda (npr. razlikovanje medljikovca od cvetnih medova), sve složeniji zahtevi tržišta i kontrole kvaliteta zahtevaju napredniji pristup. Poslednjih godina, za precizno utvrđivanje biljnog i geografskog porekla uspešno se primenjuju savremene analitičke tehnike u kombinaciji sa multivarijantnom hemometrijskom analizom. Ovakav pristup omogućava da se širok opseg fizičko–hemijskih parametara (šećeri, električna provodljivost, optička rotacija, amino–kiseline, proteini, organske kiseline i isparljive komponente) iskoristi za pouzdanu klasifikaciju uzoraka. Pri tumačenju rezultata neophodno je isključiti parametre poput sadržaja HMF–a i aktivnosti diastaze, s obzirom na to da su podložni promenama usled zagrevanja i načina skladištenja, te ne predstavljaju pouzdane markere porekla. Primena hemometrijskih metoda na navedene parametre omogućava jasno razlikovanje monoflornih medova, zahvaljujući specifičnom hemijskom profilu koji potiče od nektara dominantne biljne vrste. S druge strane, diferencijacija poliflornih medova predstavlja znatno veći analitički izazov upravo zbog odsustva izražene dominacije jedne biljne vrste, što rezultira visoko–varijabilnim i preklapajućim hemijskim profilima ^{31, 37, 55}.

2.4. Autentičnost meda

Kontrola autentičnosti hrane je proces verifikacije usklađenosti proizvoda sa podacima navedenim na deklaraciji i predstavlja jedan od ključnih aspekata osiguranja kvaliteta i integriteta hrane. Autentičnost, između ostalog, obuhvata potvrdu porekla (vrste, geografsko ili genetsko), postupka proizvodnje (konvencionalni, organski, tradicionalni sistem) i primenjene tehnologije obrade (zračenje, zamrzavanje, termički tretman). Potreba za ovom vrstom kontrole posebno je izražena kod proizvoda visoke tržišne vrednosti, koji su usled svojih specifičnih karakteristika česta meta lažnog označavanja i falsifikovanja. Potvrda autentičnosti je od suštinskog značaja sa ekonomske tačke gledišta, jer se na taj način izbegava nelojalna konkurencija koja može destabilizovati tržište, odnosno poremetiti regionalnu i nacionalnu ekonomiju. Usaglašenost sa međunarodnim i nacionalnim

standardima neophodna je za dokazivanje porekla i obezbeđivanje potpune sledljivosti u sistemu kontrole kvaliteta hrane^{9, 10, 13, 37, 56, 57}.

Pogrešno označavanje i krivotvorenje meda postali su problem globalnih razmera. Krivotvorenje se najčešće sprovodi razblaživanjem vodom, dodavanjem šećera i/ili različitih šećernih sirupa kao i prekomernim prihranjivanjem pčela sirupima ili veštačkim medom. Falsifikovanje meda podrazumeva takođe i namerno pogrešno označavanje njegovog biljnog i geografskog porekla^{9, 10, 13, 37, 56–58}. U cilju otkrivanja falsifikata i potvrde autentičnosti meda, danas se razvija i primenjuje veliki broj savremenih analitičkih metoda¹³. Značaj i aktuelnost ove problematike najbolje ilustruje podatak da je broj objavljenih naučnih radova na temu autentičnosti meda u poslednjoj deceniji u stalnom porastu (Slika 1).



Slika 1. Broj objavljenih radova na temu autentičnosti meda u periodu od 2013–2026. godine (Izvor: Scopus, januar 2026; ključna reč: „honey authenticity”)

Zahvaljujući jedinstvenim karakteristikama, nutritivnoj vrednosti, funkcionalnim svojstvima i prepoznatljivom ukusu, med ima znatno višu tržišnu vrednost od rafiniranih zaslađivača. S obzirom na to da ugljeni hidrati predstavljaju dominantnu komponentu meda, njegovo falsifikovanje se primarno zasniva na dodavanju jeftinijih industrijskih sirupa, koji su formulisani tako da u velikoj meri oponašaju prirodni hemijski profil meda. U tu svrhu najčešće se upotrebljavaju proizvodi kao što su pirinčani sirup (*eng. Rice Syrup*, RS), kukuruzni sirup (*eng. Corn Syrup*, CS), visokofruktozni kukuruzni sirup (*eng. High-Fructose Corn Syrup*, HFCS), glukozni sirup (*eng. Glucose Syrup*, GS), saharozni sirup (*eng. Sucrose Syrup*, SS), invertni sirup (*eng. Invert Syrup*, IS) kao i visokofruktozni inulinski sirup (*eng. High-Fructose Inulin Syrup*, HFIS)^{7, 31, 59}.

U zavisnosti od puta fotosinteze, biljke se dele u tri grupe. C3 biljke vrše fiksaciju ugljen–dioksida u jedinjenje koje se daljom transformacijom razlaže na dve C3 ugljenične jedinice; ovakav proces poznat je kao Calvin–Bensonov fotosintetski ciklus (*eng. Calvin–Benson*). Za razliku od njih, Hač–Slak (*eng. Hatch–Slack*) fotosintetski ciklus obuhvata biljke koje vrše fiksaciju ugljen–dioksida formirajući intermedijer sa četiri ugljenične jedinice. Biljke koje vrše fotosintezu na ovaj način poznate su kao C4 biljke. Određeni tip biljaka ima mogućnost da zbog svog specifičnog metabolizma učestvuje i u C3 i u C4 fotosintetskom ciklusu. Metabolički put ovakvih biljaka naziva se CAM put (*eng. Crassulacean Acid Metabolism*)^{9, 57}.

Dodatak šećernih sirupa dobijenih od C4 biljaka (kukuruz, šećerna trska) lakše se otkriva jer se njihov odnos stabilnih izotopa ugljenika (¹³C/¹²C) znatno razlikuje od izotopskog profila prirodnog meda. Nasuprot tome, sirupi poreklom od C3 biljaka (kao što su šećerna repa, pirinač, pšenica i cikorija)

odlikuju se izotopskim sastavom koji je veoma sličan medonosnim biljkama. Iz tog razloga se krivotvorenje ovim vrstama sirupa znatno teže dokazuje, budući da njihov dodatak ne menja u značajnoj meri ukupni izotopski odnos ugljenika u medu^{7, 59}.

Falsifikovanje meda (Slika 2) dodavanjem šećernih sirupa može dovesti do narušavanja njegovih prirodnih hemijskih i biohemijskih karakteristika, što se najčešće ogleda u izmeni enzimske aktivnosti i porastu sadržaja HMF-a. Donedavno se visok sadržaj HMF-a često koristio kao marker za detekciju prisustva invertnih sirupa. Međutim, s obzirom na to da se koncentracija ovog jedinjenja u medu može značajno povećati i prirodnim putem – usled dugotrajnog skladištenja ili termičkog tretmana – validnost HMF-a kao pouzdanog indikatora falsifikovanja danas se smatra upitnom^{31, 59}.

Pored dodavanja sirupa, falsifikovanje obuhvata i mešanje skupljih vrsta meda sa znatno jeftinijim medom drugog biljnog porekla. Kao tipičan primer izdvaja se falsifikovanje bagremovog meda dodatkom meda od uljane repice. Takođe, na tržištu je sve prisutniji vid krivotvorenja koji podrazumeva mešanje meda bezubodnih pčela (*Meliponini*) sa medom medonosne pčele (*Apis mellifera*). S obzirom na kompleksnost metoda falsifikovanja, primena metabolomičkog pristupa u cilju identifikacije specifičnih markera autentičnosti od presudnog je značaja za otkrivanje falsifikata^{7, 59}.



Slika 2. Šematski prikaz autentičnosti meda: specifični markeri porekla i najčešći oblici falsifikovanja^{29, 31, 36}

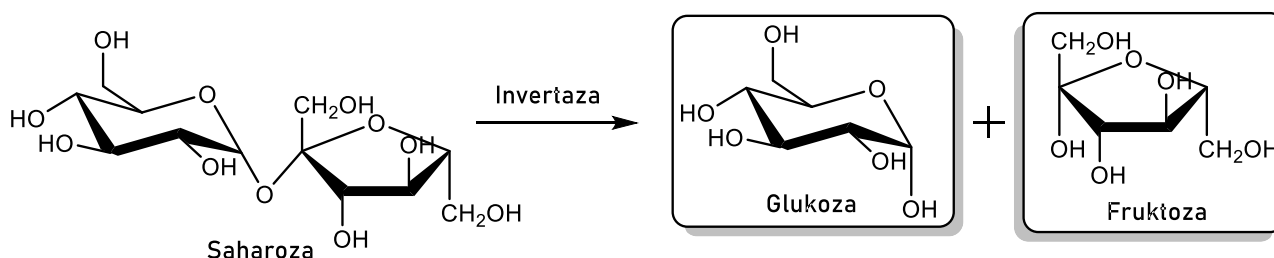
2.5. Šećerni sirupi

Saharozni sirup je koncentrovani vodeni rastvor saharoze, komercijalno dobijen pretežno iz šećerne trske ili šećerne repe. Zahvaljujući visokoj dostupnosti i niskoj ceni, ovaj sirup predstavlja jedan od najčešće upotrebljivanih zaslađivača u kontekstu falsifikovanja pčelinjih proizvoda. Njegova zloupotreba zabeležena je u oba ranije opisana oblika krivotvorenja – kako kroz direktno dodavanje u finalni proizvod, tako i indirektno, usled neadekvatne pčelarske prakse i prekomernog prihranjivanja pčela^{9, 57, 60}.

Kukuruzni sirup i visokofruktozni kukuruzni sirup (HFCS) su bezbojne, viskozne tečnosti bez mirisa, koji se dobijaju hidrolizom kukuruznog skroba. Na osnovu masenog udela fruktoze, komercijalni

visokofruktozni sirupi se klasifikuju u tri osnovne kategorije: HFCS–42 (42% fruktoze), HFCS–55 (55% fruktoze) i HFCS–90 (90% fruktoze). Zahvaljujući znatno nižoj ceni i lakšoj proizvodnji, HFCS danas u velikoj meri zamenjuje upotrebu tradicionalnog saharoznog i invertnog sirupa na tržištu. Upravo zbog ovih ekonomskih prednosti, kao i mogućnosti da oponašaju prirodni ugljenohidratni profil meda, kukuruzni sirupi predstavljaju jedne od najčešćih sirupa koji se koriste za krivotvorenje meda^{9, 57, 60}.

Invertni sirup se dobija hidrolizom saharoze na njene monosaharidne komponente, glukozu i fruktozu (Slika 3). Sam postupak inverzije sprovodi se zagrevanjem rastvora saharoze u prisustvu kiselina (poput limunske i jabučne), baza ili specifičnih enzima, pre svega invertaze^{61, 62}. U kontekstu falsifikovanja meda, hidroliza se najčešće vrši u kiseloj sredini, budući da se upotrebom organskih kiselina postiže pH–vrednost sirupa koja je veoma bliska prirodnoj kiselosti meda⁶¹. S obzirom na to da njegov ugljenohidratni sastav oponaša profil prirodnog meda, invertni sirup nalazi široku primenu u industriji hrane i pića, a posebno u proizvodnji tzv. veštačkog meda^{9, 57}. Otkrivanje falsifikovanja naročito je otežano kada se upotrebljava invertni sirup dobijen iz šećerne repe, s obzirom na to da on ima izotopski sastav gotovo identičan sastavu prirodnog meda^{9, 57}.



Slika 3. Enzimaska hidroliza saharoze katalizovana invertazom

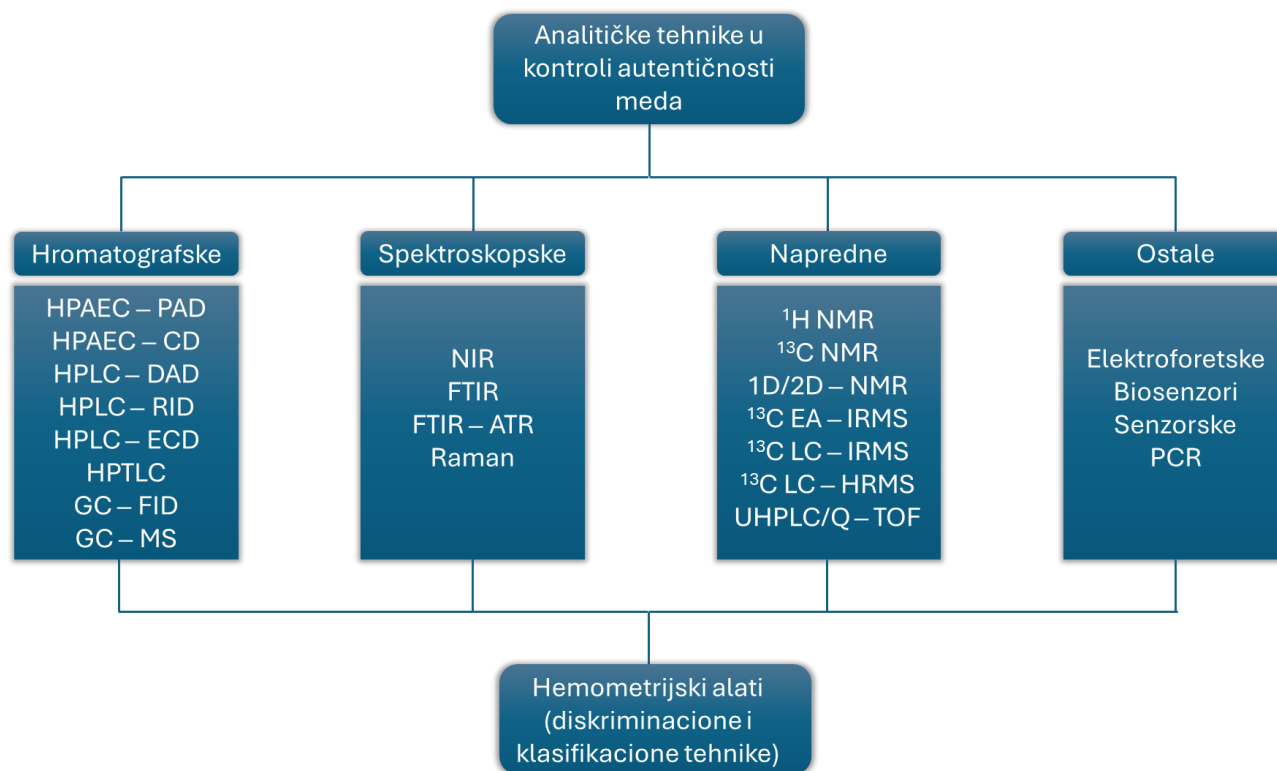
Pirinčani sirup se dobija postupkom hidrolize pirinčanog skroba i danas predstavlja jedan od najčešće korišćenih sirovina za falsifikovanje meda, naročito na azijskom tržištu. Specifičnost ovog sirupa ogleda se u njegovom ugljenohidratnom sastavu, koji je u potpunosti izgrađen od glukoznih jedinica; on se pretežno sastoji od maltotrioze (52%) i maltoze (45%), uz manji udeo slobodne glukoze (3%). Slično šećernoj repi, pirinač pripada grupi C3 biljaka. Shodno tome, prisustvo pirinčanog sirupa ne menja u značajnoj meri prirodni izotopski profil meda, što detekciju ovakvog vida krivotvorenja čini izuzetno zahtevnom^{9, 57}.

Maltozni sirup je prečišćeni i koncentrovani hidrolizat skroba, u čijem sastavu udeo maltoze varira između 40% i 90%. Iako je primarno namenjen prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, ovaj sirup se neretko koristi kao sirovina za krivotvorenje meda. Njegove specifične fizičko–hemijske i senzorske karakteristike, pre svega odsustvo boje, blag ukus, visoka termička stabilnost i nizak viskozitet, omogućavaju lako sjedinjavanje sa medom. Na ovaj način ne narušavaju se prirodna tekstura i vizuelni identitet originalnog proizvoda, što značajno otežava detekciju falsifikata⁶⁰.

2.6. Analitičke metode za proveru autentičnosti meda

Kontrola autentičnosti meda zahteva specifičan pristup, pre svega zbog izražene prirodne varijabilnosti njegovog hemijskog sastava. Istovremeno, pojava sve sofisticiranijih načina krivotvorenja uslovlja je potrebu za uvođenjem i prilagođavanjem brojnih instrumentalnih tehnika u sisteme redovne kontrole. Trenutno postoji nekoliko zvaničnih smernica i preporuka na nivou globalnog zakonodavstva koje regulišu autentičnost meda, međutim, ne postoje zvanične metode koje bi omogućile potpuno usaglašen pristup rešavanju ovog problema^{6, 17, 36, 59}. Trenutna kontrola autentičnosti meda oslanja se na upotrebu najsavremenijih analitičkih tehnika, naučnih dostignuća i kriterijuma kvaliteta a u cilju razlikovanja autentičnih od krivotvorenih uzoraka.

Analitičke tehnike (Slika 4) koje se primenjuju za kontrolu autentičnosti meda obuhvataju uobičajene hromatografske (HPAEC, HPLC, HPTLC i GC) i spektroskopske tehnike (IR, Raman, UV i ^1H NMR), kao i spregnute instrumentalne tehnike poput UPLC–HRMS i EA–IRMS/LC–IRMS. Navedene tehnike temelje se ili na specifičnosti detekcije određenih supstanci (markera) ili profilisanja u cilju otkrivanja falsifikata ^{6, 17, 36, 50, 59}.

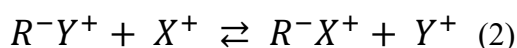
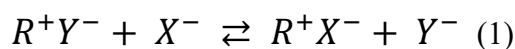


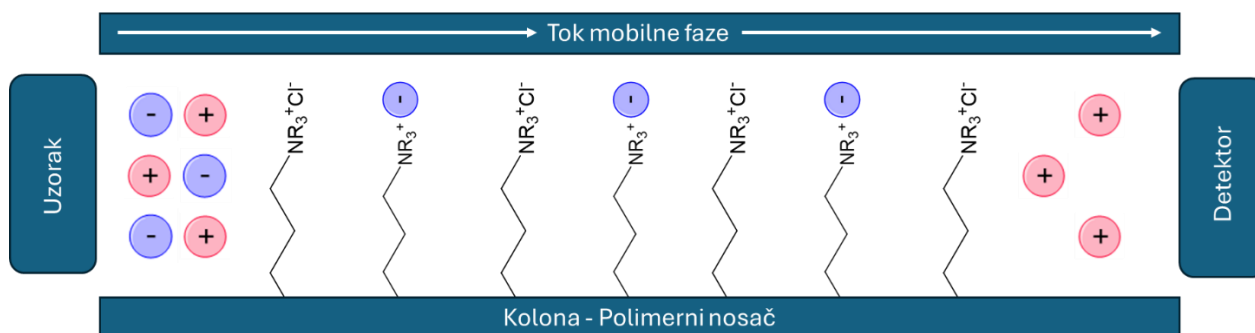
Slika 4. Analitičke tehnike i alati koji se koriste za kontrolu autentičnosti meda ^{6, 7, 17, 36, 50, 59}

2.6.1. Visokoefikasna anjonsko–izmenjivačka tečna hromatografija

Jonska hromatografija (*eng. Ion Chromatography, IC*) obuhvata metode razdvajanja jona primenom tečne hromatografije na koloni, integrisane sa sistemom za kontinuiranu detekciju i kvantifikaciju u protočnom sistemu (*online* detekcija). Jonoizmenjivački proces predstavlja njen dominantan mehanizam razdvajanja, a zasniva se na reverzibilnoj stehiometrijskoj reakciji između jona u rastvoru i jonogenih grupa stacionarne faze. Ove grupe, koje elektrostatičkim silama vezuju kontra–jone, kovalentno su vezane za površinu nerastvornog čvrstog polimernog nosača, odnosno smole ^{63, 64}.

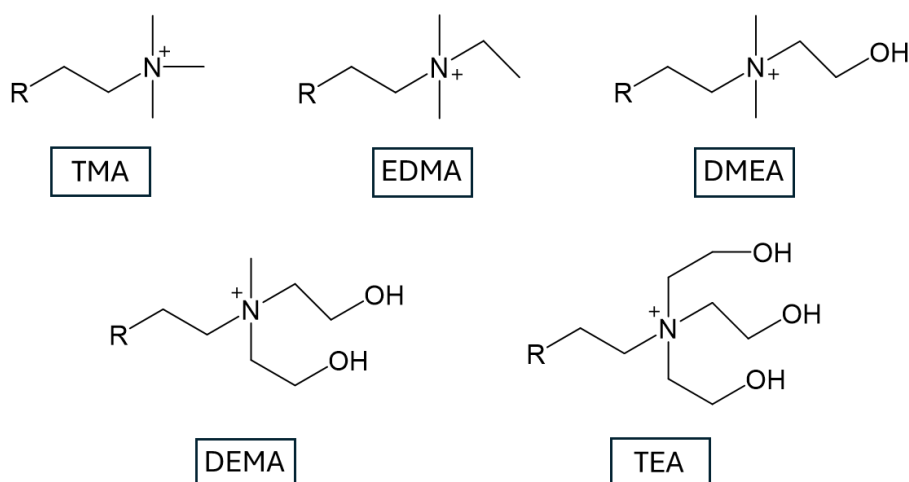
U zavisnosti od naelektrisanja, jonski izmenjivači u jonskoj hromatografiji se dele na anjonite (pozitivno naelektrisane grupe koje izmenjuju anjone), katjonite (negativno naelektrisane grupe koje izmenjuju katjone) i cviterjonske izmenjivače. Za ove izmenjivače su, posredstvom slabih elektrostatičkih interakcija, vezani joni suprotnog naelektrisanja (kontra–joni), koji tokom analize stupaju u reverzibilnu zamenu sa jonima analita prisutnim u rastvoru. Mehanizam jonske izmene (Slika 5) može se prikazati sledećim ravnotežnim reakcijama za anjonit (1) i katjonit (2), pri čemu R^+Y^- predstavlja jonogenu grupu, $Y^{-/+}$ odgovarajući kontra–jon, dok je $X^{-/+}$ prisutni jon analita iz smeše ^{63, 64}.





Slika 5. Shematski prikaz mehanizma jonske izmene

Jonogene grupe anjonita su pozitivno naelektrisane i po svojoj hemijskoj strukturi najčešće predstavljaju amonijum-jone ili različite alkilamonijum-soli. Funkcionalne grupe zasnovane na upotrebi amonijum-jona imaju najveći praktični značaj za odvajanje anjona tehnikom jonske hromatografije. Njihova visoka hemijska stabilnost i veoma veliki broj mogućih supstituenata na atomu azota omogućavaju izuzetnu strukturnu raznovrsnost ovih izmenjivača. Najjednostavniji oblik jonoizmenjivača je kada su za atom azota (pored veze sa samom polimernom osnovom) vezani isključivo atomi vodonika, čime na površini smole nastaje primarna amonijum-grupa. Međutim, pri višim pH-vrednostima eluenta, amonijum-jon se može deprotonovati, usled čega grupa gubi pozitivno naelektrisanje, što rezultuje smanjenjem ukupnog kapaciteta izmene. Zbog ove direktne zavisnosti kapaciteta od kiselosti sredine, ovakve grupe se klasifikuju kao slabo bazni anjoniti. Zamenom atoma vodonika alkil-grupama, prvenstveno se formiraju sekundarne, zatim tercijarne amonijum-soli koje su i dalje deprotonabilne usled prisustva dva ili jednog atoma vodonika u svojoj strukturi. Zamenom svih atoma vodonika alkil-grupama, nastaju kvaternerne amonijum-soli. S obzirom na to da ove grupe ne podležu deprotonovanju, njihov kapacitet jonske izmene nezavisan je od pH-vrednosti rastvora, čime se dobijaju jako bazni anjoniti. Strukturno najvažnije funkcionalne grupe savremenih anjonita (Slika 6) izvedene su iz trimetilamina i 2-dimetiletanolamina, pa se praktično sve komercijalno dostupne anjonske kolone danas baziraju na jednoj od ove dve grupe ^{63, 64}.

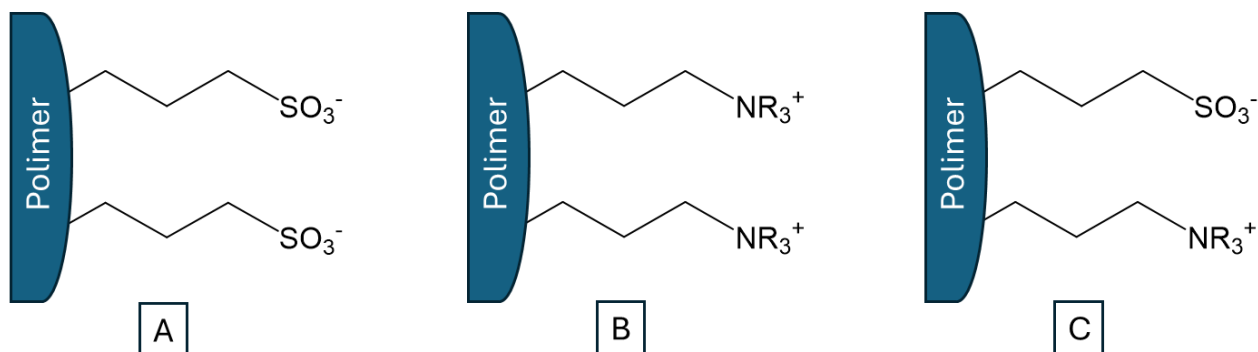


Slika 6. Strukture jonogenih grupa anjonita na bazi amonijum-soli; trimetilamin (eng. *Trimethylamine*, TMA), etildimetilamin (eng. *Ethyl dimethylamine*, EDMA), dimetiletanolamin (eng. *Dimethylethanolamine*, DMEA), dietanolmetilamin (eng. *Diethanol methylamine*, DEMA) i triethanolamin (eng. *Triethanolamine*, TEA)

Katjoniti se odlikuju prisustvom negativno naelektrisanih jonogenih grupa pri čemu se u jonskoj hromatografiji najčešće koriste materijali na bazi silika gela modifikovani sulfonskim grupama. Iako

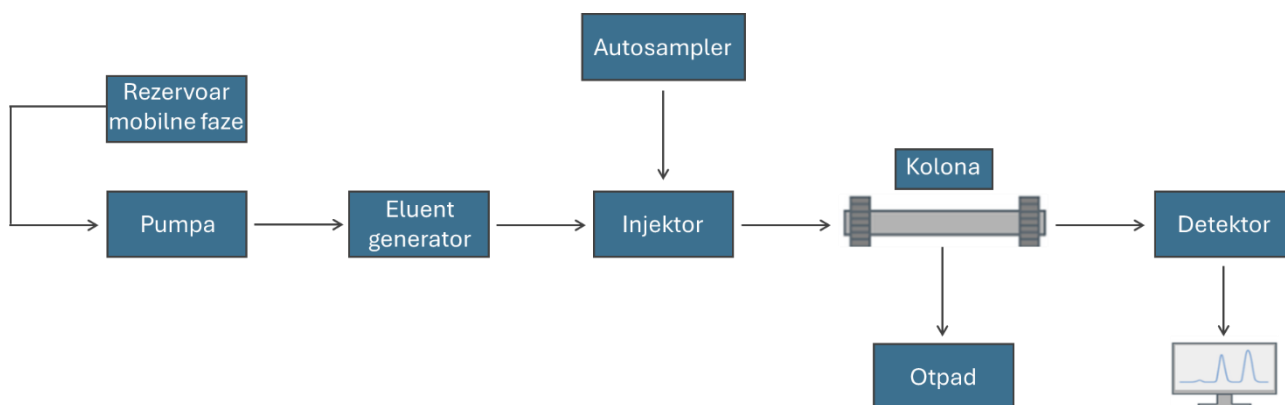
ovakve stacionarne faze pokazuju visoku hromatografsku efikasnost, njihova primena je ograničena kada je reč o istovremenom određivanju alkalnih i zemnoalkalnih metala, prevashodno usled izraženih razlika u afinitetu vezivanja ovih jona ^{63, 64}.

Cviterjonski (eng. *Zwitterionic*) izmenjivači (Slika 7) primenjuju se kada je neophodno postići selektivno razdvajanje kompleksnih jedinjenja iz složenih matriksa. Specifičnost ovih stacionarnih faza ogleda se u tome što na svojoj površini istovremeno sadrže i negativno i pozitivno naelektrisanje jonogene grupe u ekvivalentnim količinama (najčešće kombinaciju jako kiselih i jako baznih funkcionalnih grupa). Zahvaljujući ovakvoj strukturi, ovi izmenjivači su u ukupnom zbiru elektroneutralni što im omogućava ostvarivanje specifičnih interakcija sa analitima i pruža jedinstvenu hromatografsku selektivnost ^{63, 64}.



Slika 7. Tipovi jonskih izmenjivača: (A) katjonski izmenjivač sa negativno naelektrisanim funkcionalnim grupama, (B) anjonski izmenjivač sa pozitivno naelektrisanim funkcionalnim grupama i (C) cviterjonski izmenjivač sa negativnim i pozitivnim funkcionalnim grupama.

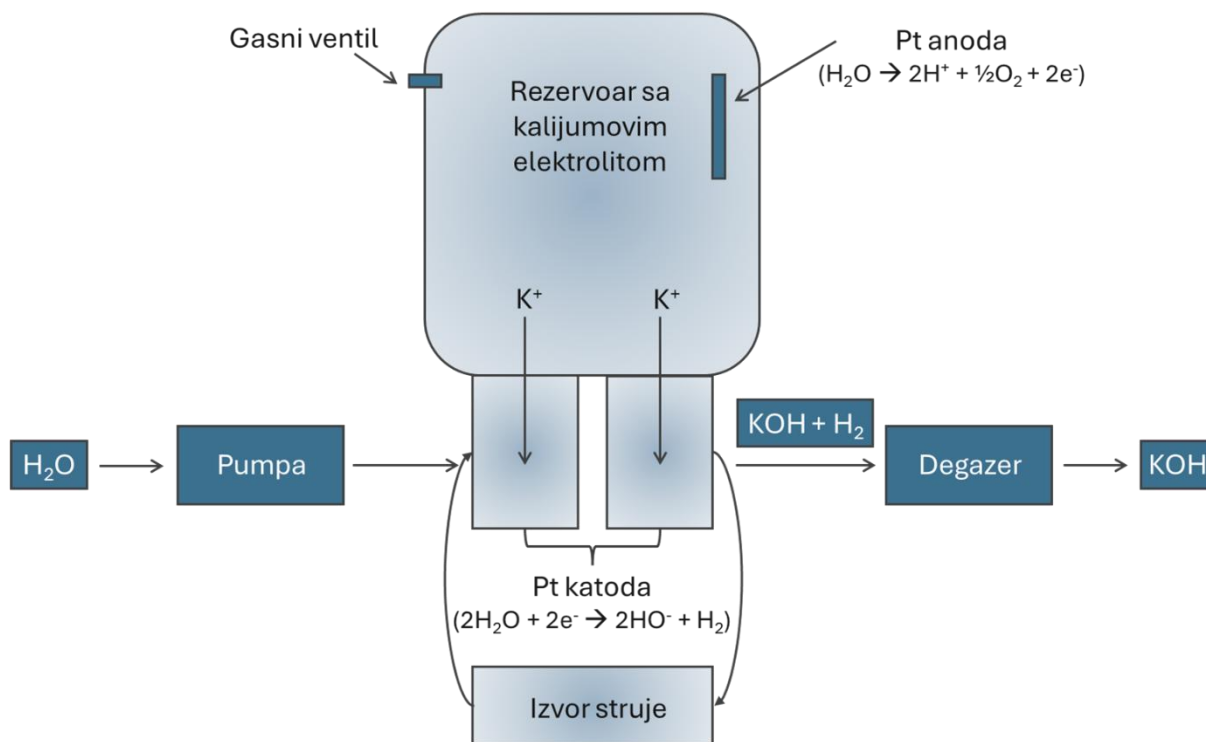
Jonski hromatograf sastoji se iz rezervoara mobilne faze, degazera za uklanjanje rastvorenih gasova iz eluenta, pumpe koja obezbeđuje kontinuiran protok eluenta kroz sistem, eluent-generatora i sistema za injektovanje uzorka. Samo razdvajanje analita dešava se na hromatografskoj koloni, nakon čega efluent prolazi kroz supresor (koji je neophodan ukoliko se primenjuje konduktometrijska detekcija) i stiže do detektora. U jonskoj hromatografiji najčešće se primenjuju konduktometrijski ili elektrohemijski detektori, dok se celokupan proces prati i analizira pomoću integrisanog sistema za obradu podataka. Shematski prikaz osnovnih komponenti jonskog hromatografa dat je na Slici 8 ^{63, 64}.



Slika 8. Shematski prikaz delova jonskog hromatografa

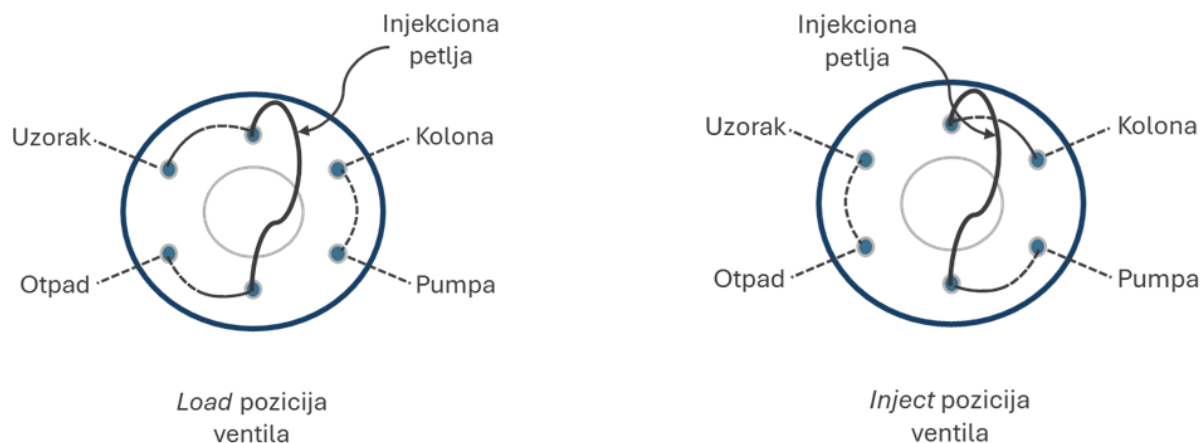
Eluent-generator (eng. *Reagent-Free Ion Chromatography Eluent-Generator*, RFIC-EG) deo je sistema jonskog hromatografa namenjen za elektrolitičku, *inline* proizvodnju eluenata visoke čistoće (poput hidroksida, karbonata, bikarbonata ili metansulfonske kiseline). Za njegovo optimalno funkcionisanje neophodan je isključivo konstantan dotok ultračiste vode. Sistem automatski generiše

eluent u koncentracijama koje zada operater, omogućavajući izvođenje preciznog gradijentnog eluiranja čak i prilikom korišćenja standardnih izokraskih pumpi, što predstavlja njegovu izuzetnu analitičku prednost. Elektrolitički proces dobijanja eluenta (Slika 9) odvija se u komori gde su anoda i katoda međusobno razdvojene jonoizmenjivačkom membranom. Primenom kontrolisane električne struje dolazi do elektrolize vode pri čemu se na katodi oslobađaju hidroksidni-joni, a na anodi hidronijum-joni. Prisutna membrana sprečava njihovu rekombinaciju u vodu, ali istovremeno omogućava usmerenu migraciju kontra-jona (na primer, K^+ jona iz odgovarajućeg rezervoara elektrolita) ka hidroksidnim jonima, čime se formira gotov eluent, poput kalijum–hidroksida. Budući da se koncentracija ovako dobijenog rastvora menja isključivo modulacijom jačine primenjene struje, sistem omogućava trenutne i kontinuirane promene sastava mobilne faze tokom trajanja jednog ciklusa. Ovakav pristup u potpunosti eliminiše potrebu za manuelnom pripremom eluenta iz koncentrovanih rastvora kiselina i baza.^{63, 64} Prilikom upotrebe RFIC–EG sistema, nezaobilazna komponenta pozicionirana nakon pumpe, a pre samog generatora eluenta jeste mala anjonsko–izmenjivačka kolona (eng. *Continuously Regenerated Trap Column*, CRTC). Njena osnovna uloga je uklanjanje tragova neželjenih jona iz vode (karbonata, hidrogenkarbonata i drugih), koji bi ulaskom u analitičku kolonu doveli do formiranja nepravilnih pikova ili do podizanja bazne linije. Ova kolona se kontinualno regeneriše elektrolizom (zato je i u nazivu *continuously regenerated*), tako da nije potrebno hemijsko obnavljanje smole.



Slika 9. Shematski prikaz rada eluent-generatora

Uvođenje uzorka u hromatografski sistem vrši se pomoću injekcionog ventila (Slika 10). Savremeni injekcioni ventili najčešće su dizajnirani sa šest portova (šestokraki ventili) i funkcionišu u dva osnovna radna položaja (*load* i *inject*). U položaju za punjenje (eng. *load*), injekciona petlja se ispunjava rastvorom uzorka. Prebacivanjem ventila u položaj za injektovanje (eng. *inject*), tok mobilne faze preusmerava se kroz petlju, čime se uzorak potiskuje mobilnom fazom do pretkolone, a zatim i do analitičke kolone^{63, 64}. Prilikom unošenja rastvora, samo se precizno definisana zapremina uzorka zadržava u injekcionoj petlji, dok se višak kontinuirano odvodi u otpad. Nakon što je petlja ispunjena, ventil se prebacuje u *inject* položaj. Ovim potezom, tok mobilne faze preusmerava se kroz petlju, potiskujući zadržani uzorak i prenoseći ga direktno na hromatografsku pretkolonu i analitičku kolonu na kojoj se dešava sam proces razdvajanja^{63, 64}.



Slika 10. Shematski prikaz funkcionisanja šestokrakog ventila jonskog hromatografa

Visokoefikasna anjonsko–izmenjivačka tečna hromatografija (eng. *High–Performance Anion–Exchange Chromatography*, HPAEC) je tehnika koja omogućava selektivno razdvajanje i eluiranje ugljenih hidrata ($pK_a \sim 12\text{--}14$) i organskih kiselina ($pK_a \sim 2\text{--}10$). Pomenute klase jedinjenja se pri visokim pH–vrednostima ponašaju kao slabe kiseline, odnosno prelaze u svoje anjonske oblike. U izrazito baznim uslovima njihovo razdvajanje se dešava na anjonsko–izmenjivačkim kolonama sa kvaternernim–amonijum grupama vezanim za specifične čestice nosača. Pri tome je redosled retencije analita u direktnoj korelaciji sa porastom njihove kiselosti, odnosno sa smanjenjem njihovih pK_a vrednosti ^{7, 59, 65, 66}.

Najvažniji strukturni parametri koji određuju hromatografsko razdvajanje ugljenih hidrata na koloni su broj hidroksilnih grupa, stepen polimerizacije, položajna izomerija i anomerija. S obzirom na to da monosaharidi po pravilu poseduju više potencijalno jonizabilnih hidroksilnih grupa, njihova parcijalna jonizacija pri visokim pH–vrednostima je ključna za retenciju. Uzimajući glukozu kao referentni primer, redosled opadanja kiselosti, odnosno afiniteta za deprotonovanje, njenih hidroksilnih grupa je sledeći: $1\text{--OH} > 2\text{--OH} > 6\text{--OH} > 3\text{--OH} > 4\text{--OH}$. Komercijalno najzastupljenije kolone za HPAEC analizu ugljenih hidrata (Tabela 5) proizvodi kompanija Termo Fišer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), čiji asortiman obuhvata širok opseg stacionarnih faza – od onih optimizovanih za razdvajanje monosaharida, do kolona specijalno dizajniranih za razdvajanje viših oligo– i polisaharida ^{7, 59, 65, 66}.

Za razdvajanje monosaharida najčešće se koriste kolone CarboPac PA1 i CarboPac PA10, koje pokazuju visoku selektivnost za odvajanje mono– i disaharida. Eluiranje ovih ugljenih hidrata uglavnom se vrši pomoću rastvora natrijum–hidroksida ili kalijum–hidroksida u rasponu koncentracija od 10 do 30 mM. Osnovni nedostatak manuelne pripreme ovakvih mobilnih faza ogleda se u visokom riziku od pojave tzv. karbonatne smetnje. Naime, usled apsorpcije atmosferskog ugljen–dioksida dolazi do formiranja natrijum– ili kalijum–karbonata, čiji se anjoni pri vrednostima pH ~ 12 izuzetno snažno vezuju za jonoizmenjivač u koloni. Ovo kompeticiono vezivanje direktno dovodi do pada selektivnosti, pomeranja retencionih vremena i drastičnog smanjenja rezolucije. Pomenuti problem se danas najefikasnije prevazilazi upotrebom elektrohemijskih eluent–generatora, gde je mogućnost karbonatne smetnje u potpunosti eliminisana zahvaljujući *in situ* generisanju mobilne faze u zatvorenom sistemu. S druge strane, kolone poput CarboPac PA100 i CarboPac PA200 specijalno su dizajnirane za razdvajanje oligosaharida sa stepenom polimerizacije do 85 jedinica. S obzirom na to da viši oligosaharidi ostvaruju znatno snažnije interakcije sa stacionarnom fazom, za njihovo eluiranje više nije dovoljna isključivo upotreba hidroksida, već je neophodna primena eluenata sa većom elucionom snagom. Iz tog razloga razdvajanje oligosaharida, po pravilu, podrazumeva uvođenje natrijum–acetata u gradijent mobilne faze. Dodatak acetatnog jona ne samo da omogućava

efikasnije eluiranje, već značajno doprinosi boljoj rezoluciji, većoj tačnosti analize i postizanju nižih granica detekcije^{63, 64}.

Tabela 5. Specifikacije analitičkih kolona koje se primenjuju za analizu ugljenih hidrata HPAEC–PAD metodom*

Kolona	Specifikacije	Uzorci	Primena
CarboPac MA1	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 7,5 µm (vinilbenzen–hlorid/divinilbenzen) modifikovan alkil–kvaternernim amonijum–grupama (stepen umreženosti 15%)	Prehrambeni proizvodi i fiziološki uzorci	Fukoza, N–acetil–(D)–glukozamin, N–acetil–(D)–galaktozamin, manoza, glukoza, galaktoza, neutralni oligosaharidi
CarboPac SA10	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 6 µm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%) modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 55 nm (stepen umreženosti 4,5%)	Prehrambeni proizvodi i biogoriva	Monosaharidi i disaharidi u roku od 10 minuta
CarboPac PA1	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 10 µm (polistiren umrežen divinilbenzenom, stepen umreženosti 2%) modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 500 nm (stepen umreženosti 5%)	Prehrambeni proizvodi	Monosaharidi, disaharidi i linearni polisaharidi (izokratski)
CarboPac PA10	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 10 µm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%) modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 460 nm (stepen umreženosti 5%)	Prehrambeni proizvodi, lekovi i biljni proizvodi	Monosaharidi, disaharidi, glukozamin, galaktozamin, sijalinska kiselina (izokratski)
CarboPac PA20	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 4 µm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%), modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 130 nm (stepen umreženosti 5,2%)	Hrana, osvežavajuća pića, farmaceutski proizvodi i biogoriva	Monosaharidi i disaharidi
CarboPac PA100	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 8,5 µm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%), modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 275 nm (stepen umreženosti 6%)	Prehrambeni proizvodi	Oligosaharidi različite veličine, naelektrisanja, grananja i povezanosti

*Podaci preuzeti sa sajta zvaničnog zastupnika prodaje

Tabela 5. Nastavak*

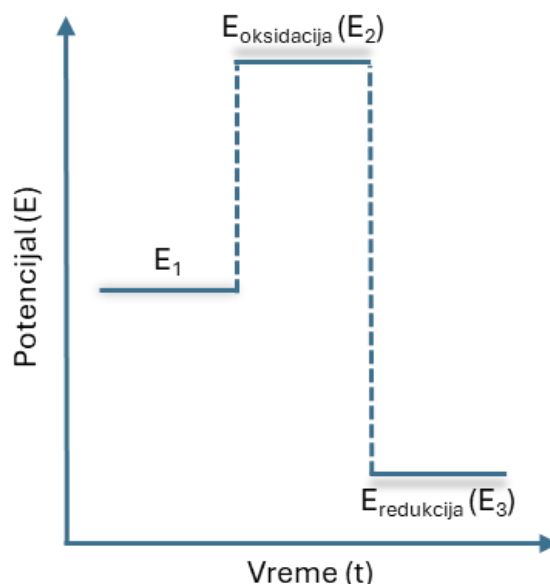
Kolona	Specifikacije	Uzorci	Primena
CarboPac PA200	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 5,5 μm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%), modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 43 nm (stepen umreženosti 6%)	Prehrambeni proizvodi	Oligosaharidi različite veličine, naelektrisanja, grananja i povezanosti (visoka rezolucija)
CarboPac PA210	Makroporozni polimerni nosač prečnika čestica 4 μm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%), modifikovan česticama kvaternernog amonijum–lateksa prečnika 43 nm (stepen umreženosti 6%)	Prehrambeni proizvodi	Monosaharidi, disaharidi, trisaharidi, tetrasaharidi i pentasaharidi (visoka rezolucija)
CarboPac PA300	Superporozni polimerni nosač prečnika čestica 4 μm (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%) sa vezanim kvaternernim–amonijum grupama.	Heterogeni biološki i prehrambeni proizvodi	Kompleksni oligosaharidi

*Podaci preuzeti sa sajta zvaničnog zastupnika prodaje

Razdvajanje jedinjenja HPLC–om u kombinaciji sa elektrohemijском detekcijom pokazalo se kao veoma produktivna kombinacija za jedinjenja koja poseduju elektroaktivne grupe poput ugljenih hidrata. Konvencionalna amperometrijska detekcija zasniva se na primeni konstantnog potencijala (DC amperometrija), a najčešće se izvodi na radnim elektrodama od zlata, platine ili staklastog ugljenika. Primenom DC amperetrije uspešno se detektuju aromatična jedinjenja poput fenola, aminofenola, kateholamina i srodnih biogenih amina. Kod ovih molekula rezonantna stabilizacija π –elektronskog sistema stabilizuje intermedijere anodne oksidacije usled čega se snižava energija aktivacije neophodna za dešavanje elektrohemijske reakcije. Za uspešnu primenu DC amperometrije od presudnog je značaja da površina radne elektrode ostane inertna, uz očuvanu sposobnost nesmetane razmene elektrona sa analitom. Iz tog razloga staklasti ugljenik predstavlja najzastupljeniji materijal radne elektrode pri radu sa konstantnim potencijalom. Međutim, ovakav tip elektroda je neadekvatan za analizu ugljenih hidrata, s obzirom na to da alifatična jedinjenja ne pokazuju elektrohemijski odziv na inertnim površinama. Kako bi se omogućila oksidacija aldehidnih i primarnih alkoholnih grupa prisutnih u strukturi ugljenih hidrata, neophodna je primena elektroda sa izraženim elektrokatalitičkim svojstvima, poput platine ili zlata, u strogo baznim uslovima (pH ~ 12) ^{63, 64}.

Elektrokatalitička aktivnost zlatnih elektroda najslabije je izražena u kiseljoj sredini (pri niskim pH–vrednostima). U takvim uslovima, one se prevashodno koriste za oksidaciju i detekciju jedinjenja sumpora, usled njihovog izuzetno visokog afiniteta vezivanja za zlato. S druge strane, prilikom analize ugljenih hidrata intermedijerni proizvodi oksidacije analita snažno se i nepovratno adsorbuju na površini elektrode. Ovo kontinuirano nagomilavanje oksidacionih produkata dovodi do brze pasivizacije (trovanja) radne površine elektrode, što za posledicu ima drastičan pad osetljivosti i konačan gubitak elektrohemijskog odziva. Navedeni problem inaktivacije elektrode uspešno se prevazilazi primenom pulsne amperometrijske detekcije (PAD), odnosno uvođenjem pulsne talasne potencijala ^{63, 64}.

Pulsna amperometrijska detekcija (PAD) inicijalno je razvijena za analizu prostih alkohola na platinskim elektrodama u protočnim sistemima, i to primenom repetitivnog talasa u tri koraka. Kako bi se očuvala visoka elektrokatalitička aktivnost radne površine, faza anodne detekcije analita naizmenično se smenjuje sa fazama čišćenja i reaktivacije elektrode. U tu svrhu se nakon detekcije prvo primenjuje visoko pozitivan potencijal, kojim se vrši oksidativno uklanjanje (desorpcija) nagomilanih proizvoda, a zatim sledi nagli prelazak na negativniji potencijal, čime se površina elektrode od plemenitog metala reduktivno regeneriše. Primenom pulsnog potencijala uspešno se, i sa visokom tačnošću, postiže detekcija polarnih alifatičnih jedinjenja^{63, 64}.



Slika 11. Izgled pulsnog potencijala detekcije ugljenih hidrata pomoću PAD^{63, 64}

Kombinovanjem visokoefikasne anjonsko–izmenjivačke tečne hromatografije i pulsne amperometrijske detekcije (HPAEC–PAD), uz primenu stacionarnih faza na bazi kvaternernih amonijum polimera pri visokim vrednostima pH, predstavlja analitički pristup od posebnog značaja za analizu ugljenih hidrata. Osetljivost PAD detekcije alditola, mono–, oligo– i polisaharida na radnoj zlatnoj elektrodi dostiže svoj maksimum upravo u izrazito baznoj sredini ($\text{pH} > 12$)^{63, 64}.

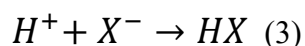
Detekcija ugljenih hidrata primenom PAD (Slika 11) postiže se cikličnom promenom potencijala radne elektrode kroz tri ključna stupnja (E_1 , E_2 i E_3). U prvom koraku, na elektrodi se uspostavlja potencijal detekcije analita (E_1), pri čemu dolazi do oksidacije analita i merenja strujnog odziva. Nakon toga, potencijal se prebacuje na višu vrednost, odnosno na potencijal oksidacionog čišćenja (E_2), gde dolazi do potpune oksidacije i desorpcije svih čvrsto adsorbovanih međuproduzaka na površini zlatne elektrode. Konačno, potencijal se naglo spušta na izrazito nisku, redukcionu vrednost (E_3). Ovaj korak rezultuje redukcijom nagrađenih metalnih oksida u elementarni metal, čime se radna površina elektrode u potpunosti obnavlja i priprema za naredni ciklus merenja^{63, 64}.

Sadržaj organskih kiselina u hrani se određuje primenom HPAEC kuplovanom sa konduktometrijskom detekcijom (*eng. Conductometric Detection, CD*). Analitički sistem za ovu namenu zahteva primenu eluent–generatora, hromatografskih kolona specifično dizajniranih za odvajanje organskih kiselina, kao i supresora čija je uloga uklanjanje pozadinske provodljivosti mobilne faze. Za razliku od CarboPac kolona čiji je opseg primene znatno širi, za razdvajanje i određivanje organskih kiselina u praksi se najčešće primenjuju dva tipa IonPac kolona. Kompanija *Thermo Fisher Scientific* u tu svrhu nudi kolone IonPac AS11 i IonPac AS15, čija se stacionarna faza bazira na makroporoznom polimernom nosaču (kopolimer etilvinilbenzena i divinilbenzena, stepen umreženosti 55%), modifikovanom alkanol–kvaternernim amonijum grupama^{63, 64}.

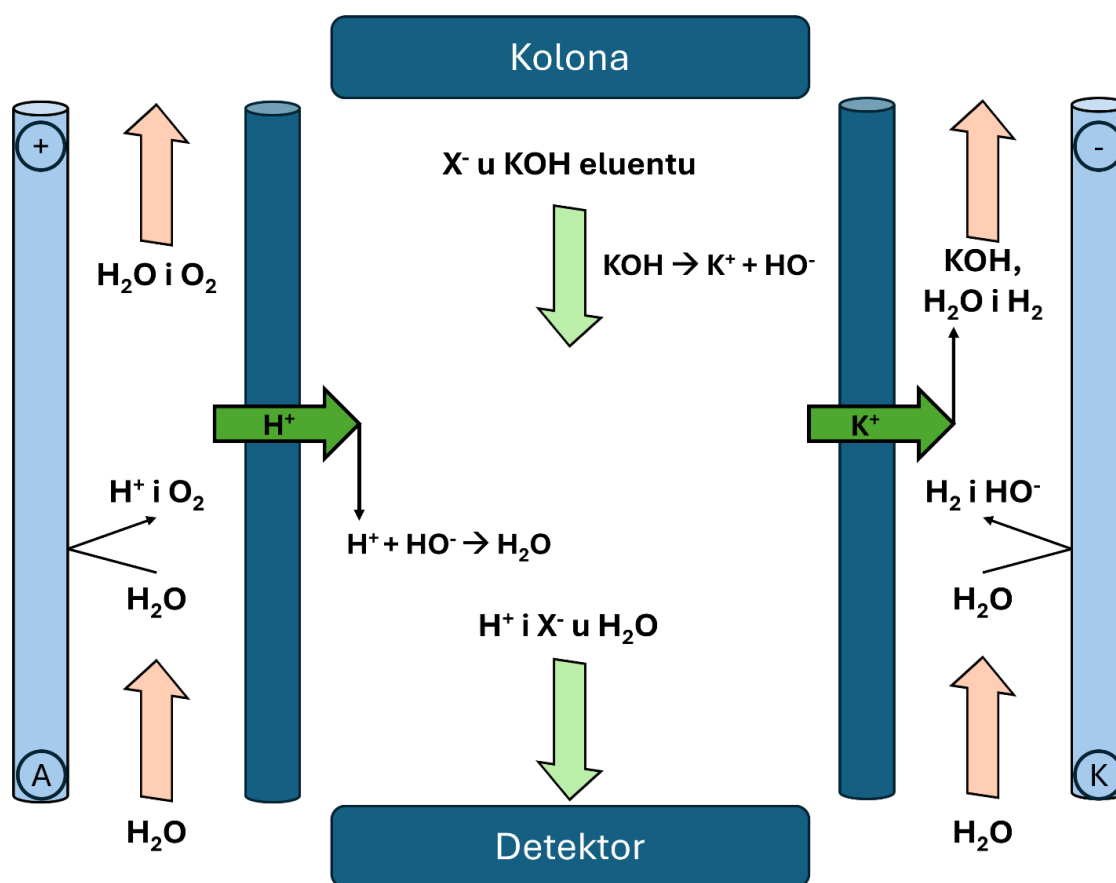
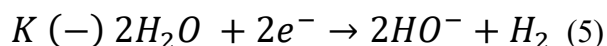
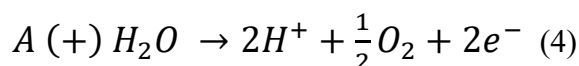
Supresor, u kombinaciji sa konduktometrijskom detekcijom, predstavlja nezaobilaznu komponentu u savremenim sistemima za jonsku hromatografiju, budući da obezbeđuje značajno povećanje osetljivosti merenja, prevashodno pri analizi anjona. Osnovna uloga tehnologije supresije ogleda se u istovremenom smanjenju visoke pozadinske provodljivosti mobilne faze i pojačavanju konduktometrijskog signala samog analita. Nakon završenog hromatografskog razdvajanja efluent prolazi kroz supresorsku ćeliju sa ugrađenim jonoizmenjivačkim membranama, u kojoj se odvija selektivna razmena jona. Na taj način se pozadinska provodljivost drastično snižava, bazna linija detektora se stabilizuje, čime pouzdana detekcija jona i na izuzetno niskim koncentracionim nivoima (u tragovima) postaje moguća^{63, 67–69}.

U analizi anjona primenjuju se dva osnovna tipa supresora: dinamički regenerisani supresori (*eng. Dynamically Regenerated Suppressors*, DRS) i samoregenerišući supresori (*eng. Self-Regenerating Suppressors*, SRS). Dinamički regenerisane supresore karakteriše veća robusnost i pouzdanost u poređenju sa membranskim samoregenerišućim sistemima. Međutim, njihov rad zahteva upotrebu dodatnih mehaničkih sklopova za preusmeravanje tokova i periodičnu regeneraciju, što narušava kontinuitet analitičkog procesa. Regeneracija ovih supresora zasniva se na hemijskom principu, pri čemu se koristi eksterni rastvor regeneranta (najčešće razblaženi rastvor kiseline ili baze). Tok regeneranta prolazi kroz supresor paralelno sa tokom efluenta, čime se obnavlja jonoizmenjivačka smola. Ovaj koncept, iako jednostavan i ekonomski povoljniji, bio je karakterističan pretežno za starije generacije sistema za jonsku hromatografiju. Nasuprot njima, membranski samoregenerišući supresori, iako osetljiviji na mehanička oštećenja, omogućavaju neprekidan rad i *in situ* regeneraciju, što ih čini veoma pogodnim za rutinsku upotrebu. Njihovo funkcionisanje zasniva se na elektrohemijском principu: unutar samog supresora procesom elektrolize kontinuirano se generišu H^+ joni (za analizu anjona) ili HO^- joni (za analizu katjona), koji obnavljaju jonoizmenjivačku smolu. U zavisnosti od namene, ovi uređaji se dele na anjonske (ASRS) i katjonske supresore (CSRS). Posebna prednost SRS supresora (Slika 12) ogleda se u tome što u jednom uređaju integrišu tri procesa: kontinuirana supresija, elektrohemijска regeneracija i degaziranje čime se dodatno unapređuju performanse sistema. Ovakav dizajn eliminiše potrebu za spoljnim regenerantima i dovodima vode. Pored uobičajene neutralizacije eluenta i snižavanja pozadinske provodljivosti, što je karakteristika i konvencionalnih DRS uređaja, SRS sistemi poseduju i sposobnost uklanjanja ugljen–dioksida iz mobilne faze. Na taj način pozadinska provodljivost karbonatno–hidrogenkarbonatnih mobilnih faza svodi se gotovo na nulu, što rezultuje boljim odnosom signal–šum, smanjenim interferencijama u ranim eluiranim pikovima i omogućava izvođenje gradijentnih razdvajanja uz minimalno pomeranje bazne linije^{63, 67–69}.

Pri procesu kontinuirane supresije efluent (mobilna faza i joni analita), nakon izlaska iz analitičke kolone, podleže reakcijama kiselinsko–bazne neutralizacije unutar supresorske ćelije. Ova ćelija je ispunjena jako kiselim katjonskim izmenjivačem u vodoničnom (H^+) obliku, što omogućava selektivnu zamenu katjona iz mobilne faze i uzorka protonima iz smole. Ukoliko se koristi hidroksidna mobilna faza, prisutni kontraioni (npr. Na^+ ili K^+) razmenjuju se sa H^+ jonima iz supresorske ćelije, pri čemu nastaje voda izuzetno niske provodljivosti. U slučaju primene karbonatnih ili hidrogenkarbonatnih mobilnih faza, procesom supresije dolazi do formiranja ugljene kiseline, koja se naknadno uklanja iz sistema u obliku gasovitog CO_2 . Istovremeno, anjoni analita se u prisustvu oslobođenih hidronijum–jona prevode u svoje odgovarajuće kiseline. S obzirom na to da su nastale kiseline jaki elektroliti, one obezbeđuju visok i jasan konduktometrijski odziv na detektoru^{63, 67–69}.



Kod samoregenerišućih supresora, elektrohemijaska regeneracija se ostvaruje kontinuiranim propuštanjem električne struje kroz supresorsku ćeliju tokom rada, uz neophodan uslov neprekidnog protoka mobilne faze. U ovakvim uslovima dolazi do elektrolize vode, pri čemu se na anodi oslobađaju hidronijum joni (H_3O^+) i gasoviti kiseonik (O_2), dok se na katodi formiraju hidroksidni-joni (HO^-) i gasoviti vodonik (H_2). Usmereni tok protona sa anode migrira kroz katjonsko–izmenjivačko punjenje supresora, potiskujući katjone iz mobilne faze (npr. Na^+ ili K^+), kao i katjone iz samog uzorka, ka katodi. Usled ovog procesa hidroksidni i karbonatni joni iz efluenta reaguju sa hidronijum–jonima gradeći vodu, odnosno ugljenu kiselinu, koje se potom eliminišu iz sistema preko anode. Na ovaj način SRS supresor omogućava neprekidnu *in situ* regeneraciju smole bez potrebe za dodavanjem eksternih hemijskih reagenasa. Posebnost SRS sistema ogleda se i u dizajnu sigurnosnog mehanizma koji dozvoljava napajanje ćelije isključivo u prisustvu protoka tečnosti; u odsustvu protoka, električno napajanje se automatski prekida. Ovakav režim rada značajno doprinosi sigurnosti i efikasnosti instrumenta, minimizuje rizik od oštećenja ćelije i sprečava nepotrebnu potrošnju energije^{63, 67–69}.



Slika 12. Shematski prikaz rada ASRS supresora

Nakon prolaska kroz supresor efluent koji sadrži neutralisanu mobilnu fazu – uključujući i ugljenu kiselinu u slučaju primene karbonatno–hidrogenkarbonatnih mobilnih faza – usmerava se ka komori za degaziranje. Tok tečnosti prolazi kroz specijalizovanu membranu (u obliku cevi), pri čemu se

nestabilna ugljena kiselina razlaže na gasoviti ugljen–dioksid i vodu. Generisani CO_2 potom selektivno difunduje kroz hidroforobnu gas–propusnu membranu, dok tečna faza sa drastično smanjenim sadržajem rastvorenih gasova nastavlja svoj tok ka detektoru. Ovaj proces ključno doprinosi stabilizaciji bazne linije, značajnom smanjenju šuma i eliminisanju hromatografskih interferencija kod analita sa kraćim retencionim vremenima, što u krajnjem ishodu rezultuje znatnim poboljšanjem preciznosti, osetljivosti i pouzdanosti detekcije ^{63, 67–69}.

Zahvaljujući izuzetnoj rezoluciji pri razdvajanju izomera, HPAEC–PAD predstavlja tehniku izbora za detaljno profilisanje ugljenih hidrata u medu. Iako su dominantni monosaharidi i disaharidi ključni za definisanje opšteg kvaliteta, dosadašnja istraživanja ukazuju na to da upravo specifičan profil oligosaharidna poseduje najveći analitički potencijal. Ovaj profil može poslužiti kao jedinstven hromatografski „otisak prsta” (eng. *Fingerprint*). Njegovom integracijom sa naprednim hemometrijskim alatima (poput analize glavnih komponenti, linearne diskriminantne analize ili veštačkih neuronskih mreža), može se modovati razlikovanje cvetnih medova od medljikovaca, kao i utvrđivanje biljnog porekla ispitivanih uzoraka. Pored karakterizacije porekla, profil oligosaharida se intenzivno proučava i u kontekstu detekcije krivotvorenja. Iako HPAEC–PAD omogućava prepoznavanje dodataka šećernih sirupa (HFCS, invertni sirupi) bogatih maltooligosaharidima čak i pri udelima od 5%, glavni analitički izazov i dalje ostaju visokofruktozni sirupi u kojima je zastupljenost oligosaharida značajno smanjena. Zbog ovakvih ograničenja izolovanih instrumentalnih tehnika, pouzdana procena autentičnosti meda zahteva kompleksniji pristup, u kojem se hromatografski profil šećera koreliše sa dodatnim fizičko–hemijskim parametrima kvaliteta ^{4, 7, 20, 21, 25, 30, 33, 34, 59, 70}.

2.6.2. Visokoeфикасна tečna hromatografija

Visokoeфикасна tečna hromatografija (eng. *High–Performance Liquid Chromatography*, HPLC) predstavlja jednu od najzastupljenijih analitičkih tehnika za karakterizaciju i kontrolu autentičnosti meda. U rutinskoj analizi profila šećera najčešće se primenjuje HPLC spregnut sa detektorom indeksa refrakcije (eng. *Refractive Index*, RI). Iako je ovaj pristup jednostavan, isplativ i precizan za identifikovanje mono–, di– i oligosaharida (sa stepenom polimerizacije do 7 monosaharidnih jedinica), njegova primena ima ograničenja kada je u pitanju detektovanje dodatka pojedinih šećernih sirupa. Zbog toga se fokus savremenih analitičkih postupaka pomera ka identifikovanju jedinstvenih hemijskih markera. Tako je, na primer, primenom tečne hromatografije sa detektorom sa nizom dioda (eng. *Diode Array Detector*, DAD; HPLC–DAD) uspešno identifikovano jedinjenje 2–acetilfuran–3–glukopiranozid. S obzirom na to da je ovo jedinjenje karakteristično isključivo za pirinčani sirup i nije prisutno u autentičnom medu, ono predstavlja pouzdan specifičan marker za detektovanje ovog oblika falsifikovanja ^{4, 7, 26, 28, 30, 46, 59, 71–74}.

Značajan iskorak u utvrđivanju autentičnosti meda postignut je sprežanjem tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Razvoj tehnika visoke (eng. *High–Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) i niske rezolucije (eng. *Low–Resolution Mass Spectrometry*, LRMS) omogućio je izuzetno precizno profilisanje sastava meda. Ultraefikasna tečna hromatografija (UPLC) u sprezi sa hibridnim (UHPLC–LTQ OrbiTrap MS) ili kvadrupolnim masenim spektrometrima (UHPLC–DAD–MS/MS) rutinski se koristi za kvantifikovanje fenolnih jedinjenja poput hrizina, siringinske kiseline, kvercetina i miricetina. Korelacijom prisustva ovih specifičnih markera sa fizičko–hemijskim parametrima, omogućena je pouzdana diferencijacija meda u odnosu na njegovo geografsko i biljno poreklo ⁵⁰.

Pored analize ugljenih hidrata i fenola, tečna hromatografija predstavlja nezamenljiv alat i za određivanje organskih kiselina u medu. Iako su rane metode zahtevale ekstrakciju šećera na čvrstoj fazi pre hromatografskog razdvajanja kiselina, uvođenjem sofisticiranih reverzno–faznih (eng.

Reversed-Phase, RP) i jonoizmenjivačkih kolona, danas je omogućena znatno brža i direktna kvantifikacija širokog opsega organskih kiselina. Savremeni trendovi se kreću i u pravcu razvoja sistema poput tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom odnosa izotopa (LC–IRMS). Ipak, evidentno je da nijedna izolovana instrumentalna tehnika ne može pružiti kompletnu analitičku sliku. Pouzdana potvrda autentičnosti meda danas isključivo zavisi od kombinacije više komplementarnih metoda i identifikovanja profila specifičnih markera koji jedinstveno karakterišu određeni tip meda ^{3, 36, 46}.

2.6.3. Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija

Tankoslojna hromatografija (*eng. Thin-Layer Chromatography, TLC*) predstavlja analitičku tehniku čija je primena u kontroli autentičnosti meda dugo bila ograničena. Međutim, kontinuiranom optimizacijom njenih analitičkih performansi razvijena je visokoeffikasna tankoslojna hromatografija (*eng. High-Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC*), koja danas postaje izuzetno važan alat u ovoj oblasti. Razvoj naprednih adsorbenata, automatizovanih sistema za nanošenje uzoraka i sofisticiranih softvera za obradu slika učinio je HPTLC visoko konkurentnom tehnikom. Njene glavne prednosti u odnosu na sisteme za hromatografiju u koloni (HPLC i GC) ogledaju se u jednostavnoj pripremi uzorka, niskoj ceni analize i mogućnosti simultane analize velikog broja uzoraka pod identičnim uslovima. Ipak, ova tehnika poseduje i određena analitička ograničenja. Zbog slabije rezolucije pri analizi složenih ugljenih hidrata, HPTLC pristup nije adekvatan za strukturnu analizu oligosaharida sa stepenom polimerizacije većim od deset. Pored toga, jedan od najvećih izazova pri detekciji krivotvorenja predstavlja rizik od lažno pozitivnih rezultata, koji mogu nastati usled delimične ili potpune hidrolize prirodno prisutnih oligo- i polisaharida iz meda ^{7, 65, 75, 76}.

Hromatografsko razdvajanje šećera na tankom sloju primarno je uslovljeno njihovom izrazito hidrofилnom prirodom. Nakon jednostavne ekstrakcije vodom ili polarnim organskim rastvaračem, razdvajanje se odvija na osnovu interakcija između polarnih hidroksilnih grupa analita i stacionarne faze (najčešće silika gela, amino-modifikovanog silika gela ili celuloze). U takvim normalno-faznim (*eng. Normal-Phase, NP*) sistemima, retencija analita je obrnuto proporcionalna njegovoj molekulskoj masi i polarnosti, strukturno složeniji ugljeni hidrati ostvaruju jače međumolekulske interakcije sa stacionarnom fazom i samim tim se sporije kreću. S obzirom na to da ugljeni hidrati ne apsorbuju UV svetlost, ključni korak analize je posthromatografska hemijska derivatizacija radi vizuelizacije. U rutinskoj praksi se najčešće primenjuju reagensi na bazi anilin–difenilamina u ortofosornoj kiselini ili anisaldehida u sumpornoj kiselini. Pored njih, za specifične klase šećera uspešno se koriste i rastvori naftol–rezorcinola, cerijum(IV)–sulfata, olovo(IV)–acetata sa dihlorofluoresceinom, kao i vanadijum(V)–oksida ⁶⁵.

Značajno proširenje mogućnosti ove metodologije postiže se sprežanjem visokoeffikasne tankoslojne hromatografije sa masenom spektrometrijom (HPTLC–MS). Ovakav hibridni pristup omogućava da se, neposredno nakon razdvajanja na ploči, analiti podvrgnu direktnoj masenoj detekciji primenom jonskih izvora poput elektrospreja (*eng. Electrospray Ionization, ESI*) ili matriksom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (*eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI*), u kombinaciji sa analizatorima vremena preleta (*eng. Time of Flight, TOF*) ili kvadrupolima (Q). Za razliku od ranih metoda detekcije falsifikovanja meda visokofruktoznim sirupima, koje su se oslanjale isključivo na vizuelnu detekciju specifičnih obojenih zona sa vrednostima retardacionog faktora iznad 0,35 ⁵⁹, savremeni pristupi odlikuju se znatno višim stepenom analitičke pouzdanosti ⁶⁵. Praktična primenljivost ovog pristupa demonstrirana je u radu Puskasa i saradnika ⁷⁷, koji su uspešno optimizovali i validovali preciznu HPTLC metodu za brzu kvantifikaciju dominantnih monosaharida i saharoze u medu. Shodno tome, primena HPTLC tehnike predstavlja izuzetno efikasan i ekonomski isplativ alat za rutinsku analizu velikog broja uzoraka. Ovakav pristup omogućava preliminarnu detekciju potencijalno falsifikovanih uzoraka, čime se obezbeđuje racionalnija upotreba znatno kompleksnijih i skupljih instrumentalnih sistema koji pružaju dublju strukturnu analizu, poput HPAEC–PAD ili IRMS ^{18, 78, 79}.

2.6.4. Masena spektrometrija odnosa izotopa

Masena spektrometrija odnosa izotopa (*eng. Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS*) predstavlja sofisticiranu analitičku tehniku specijalizovanu za određivanje sastava stabilnih izotopa elemenata. Za razliku od konvencionalnih masenih spektrometara, IRMS instrumenti ne skeniraju širok opseg masa karakterističnih jona, već vrše izuzetno precizna merenja finih razlika u masi stabilnih izotopa. U analitici hrane ova tehnika se primarno koristi za praćenje varijacija u odnosu lakih izotopa, kao što su $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ i $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Pouzdano merenje odnosa izotopa zahteva upotrebu univerzalnih standarda radi eliminacije slučajnih i sistematskih grešaka. Koncentracija stabilnih izotopa izražava se kao odnos manje zastupljenog i zastupljenijeg izotopa, odnosno kao relativno odstupanje ovog odnosa u uzorku u odnosu na standardni materijal. Rezultati se iskazuju u promilima (‰) primenom delta notacije (δ). S obzirom na to da su uzorci po pravilu osiromašeni teškim izotopom u poređenju sa standardom, dobijene δ vrednosti su uglavnom negativne ^{56, 80–82}.

Analiza stabilnih izotopa ugljenika predstavlja jednu od najpouzdanijih tehnika za kontrolu autentičnosti, a Udruženje zvaničnih analitičkih hemičara (*eng. Association of Official Analytical Chemists, AOAC*) preporučuje je kao referentnu metodu za detektovanje falsifikovanja meda šećerima poreklom iz C4 biljaka. Metoda se zasniva na razlici u fotosintetskom putu medonosnog bilja, koje primarno pripada C3 biljkama, i kukuruza ili šećerne trske kao C4 biljaka čiji šećerni sirupi se često koriste za krivotvorenje meda. Princip metode ogleda se u tome da je odnos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ u autentičnom medu gotovo identičan odnosu izotopa u iz njega izolovanoj proteinskoj frakciji, koja služi kao interni standard. Ukoliko razlika $\delta^{13}\text{C}$ između meda i njegove proteinske frakcije premašuje 1‰, to nedvosmisleno ukazuje na dodatak C4 šećera u udelu većem od 7%. Međutim, savremeni izazov predstavlja falsifikovanje meda pirinčanim sirupom kao i sirupima poreklom od drugih C3 biljaka, čije prisustvo konvencionalnom IRMS analizom nije moguće direktno detektovati ^{35, 37, 59, 83–87}.

Vrednost $\delta^{13}\text{C}$ direktno odražava izotopski $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ odnos biljke. Standardne vrednosti za C3 biljke variraju u opsegu od -22‰ do -33‰, dok se $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti C4 biljaka kreću od -10‰ do -20‰ ^{84, 88}. Budući da je odnos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ u nektaru medonosnog bilja ujednačen, sve vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ u medu koje su pozitivnije od definisanih granica smatraju se indikatorom falsifikovanja. Za rutinsku analizu izotopa ugljenika najčešće se primenjuje elementarni analizator u sprezi sa IRMS detektorom (EA–IRMS) ^{35–37, 59, 83–91}. S obzirom na to da metode falsifikovanja postaju sve složenije, detekcija dodatnih C3 sirupa predstavlja izuzetan analitički izazov koji zahteva primenu visoko sofisticirane instrumentalne opreme, odnosno kuplovanih ehnika poput gasne i tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom odnosa izotopa (GC–IRMS i LC–IRMS) ^{83, 84, 87}. Glavni tehnološki izazov pri uvođenju LC–IRMS interfejsa ostaje efikasno uklanjanje tečne mobilne faze koja ne sme dospeti u visoki vakuum masenog spektrometra ⁸³.

Potvrdu ovih trendova pružaju savremena istraživanja usmerena na definisanje preciznijih kriterijuma autentičnosti. Tako su, na primer, Dong i saradnici ⁸⁵ primenom EA–IRMS i LC–IRMS tehnika uporedili komercijalne uzorke i pokušali da standardizuju $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti, definišući oštrije granice za autentične medove. S druge strane, Kabanero i saradnici ⁸³ su dokazali da konvencionalna EA–IRMS metoda nije dovoljno osetljiva za detekciju malih udela (5% do 10%) sirupa od šećerne trske. Ipak, praćenjem specifičnih međusobnih odnosa $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti izolovanih monosaharida (glukoze i fruktoze) i saharoze, omogućena je znatno preciznija detekcija dodatnih egzogenih šećera ^{35, 83, 84, 92, 93}. Pored analize ugljenih hidrata, Kavašima i saradnici ⁹⁴ su nedavno primenili EA–IRMS i LC–IRMS i za određivanje profila organskih kiselina u medu, dok su Dinča i saradnici ⁹⁵ ispitali mogućnost kombinovanja IRMS tehnike (meranjem odnosa $\delta^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) sa nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR) u cilju postizanja obuhvatnije kontrole autentičnosti.

2.6.5. Gasna hromatografija

Gasna hromatografija (*eng. Gas Chromatography*, GC) predstavlja dominantnu tehniku za karakterizaciju isparljivih komponenti meda, koje su direktan indikator njegovog biljnog i geografskog porekla. Dominantne klase jedinjenja u isparljivoj frakciji obuhvataju furane, aldehide, estre, ketone, alkohole, karboksilne kiseline, terpene i derivate pirena. Zbog niske stabilnosti i niske koncentracije ovih analita, konvencionalne tehnike ekstrakcije tečno–tečno ili čvrsto–tečno često daju nedovoljan prinos. Savremeni analitički pristup zasniva se na upotrebi *headspace* čvrsto–tečne mikroekstrakcije (HS–SPME) ili dinamičke ekstrakcije (*purge and trap*), koje omogućavaju efikasnije izolovanje. Pri proceni autentičnosti, prednost se daje masenoj detekciji visoke (GC–HRMS) ili niske rezolucije (GC–LRMS)⁵⁰. U tom kontekstu, primena hemometrijskih metoda, poput OPLS–DA i OPLS–HCA, omogućila je Aliferisu i saradnicima⁹⁶ preciznu diskriminaciju medova na osnovu biomarkera, potvrđujući HS–SPME–GC–MS kao robustan alat za klasifikaciju isparljive frakcije.

S druge strane, GC tehnike su primenljive i za analizu profila šećera, uz neophodnu prethodnu derivatizaciju. Za razliku od analize isparljivih komponenti, ovde se fokus pomera ka identifikaciji specifičnih markera falsifikovanja, poput dianhidrida fruktoze (DFA). Ovi pseudo–disaharidi nastaju procesima karamelizacije pri zagrevanju šećernih sirupa, te njihovo odsustvo u autentičnom medu (ukoliko nije termički tretiran) omogućava njihovu upotrebu kao markera za detektovanje visoko–fruktoznog kukuruznog sirupa (HFCS)^{7, 59}. Dodatno, analiza profila inulotrioze pokazala se kao pouzdan indikator prisustva invertnih šećernih sirupa u udelima od 5% do 20%⁵⁹.

Metodološki razvoj gasne hromatografije omogućio je znatno detaljniju karakterizaciju sastava šećera u medu, pomerajući granice od rutinskog profilisanja ka identifikaciji strukturno kompleksnih oligosaharida. Početni koraci u ovoj oblasti, poput rada Matea i saradnika⁴, bili su fokusirani na određivanje profila šećera u različitim biljnim vrstama meda (lavanda, suncokret, eukaliptus i medljikovac). Daljim tehnološkim usavršavanjem, Sanz i saradnici⁹⁷ su primenom GC–MS tehnike identifikovali specifične di– i trisaharide koji do tada nisu bili detektovani primenom standardnih GC metoda. Značajan pomak načinili su Kote i saradnici²⁰, koji su poredeći LC i GC metode, ukazali na to da ove tehnike, za razliku od standardnih izotopskih metoda, omogućavaju detekciju šireg opsega dodatih šećernih sirupa u komercijalnim uzorcima, čime su ove metode pozicionirali kao ozbiljnu alternativu izotopskoj analizi. U kasnijim studijama, Ruiz Matut i saradnici⁹⁸ su proširili analitički opseg karakterizacijom 25 trisaharida, od kojih je 12 potvrđeno korišćenjem referentnih standarda, dok je naknadnom optimizacijom metoda omogućena i analiza tetrasaharida, čime je znatno produbljeno poznavanje kompleksnog sastava šećera u medu⁹⁸. Zahvaljujući visokoj rezoluciji, mogućnosti identifikacije strukturno srodnih jedinjenja i kompatibilnosti sa naprednim masenim detektorima, gasna hromatografija danas predstavlja jednu od značajnijih analitičkih platformi za određivanje biljnog porekla i detekciju falsifikovanja meda.

2.6.6. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (*eng. Capillary Electrophoresis*, CE) predstavlja elektroanalitičku tehniku čija se primena u analizi meda zasniva na efikasnom razdvajanju polarnih analita. Osnovne prednosti ove tehnike su dobra rezolucija, kratko vreme trajanja analize, minimalna potrošnja reagenasa i jednostavna priprema uzorka. Radi postizanja veće osetljivosti i selektivnosti pri određivanju ugljenih hidrata, organskih kiselina i fenolnih jedinjenja, tehnike CE se u aktuelnim istraživanjima sprežu sa masenom spektrometrijom (CE–MS)^{7, 31, 39, 40, 99}.

Unapređenje CE metoda za analizu organskih kiselina u medu ostvareno je kontinuiranom optimizacijom uslova razdvajanja. U prvim studijama³¹, metoda je primenjivana za identifikaciju limunske kiseline i neorganskih anjona, dok je dalje usavršavanje elektroforetskih parametara omogućilo karakterizaciju složenijih sistema. Primenom optimizovanih uslova postignuta je odgovarajuća rezolucija pri razdvajanju kompleksnih smeša nearomatičnih organskih kiselina

(oksalne, mravlje, jabučne, ćilibarne, pirogroždane, sirćetne, mlečne, limunske i glukonske), uz vreme analize u opsegu od 4 do 14 minuta^{17, 31}. Dobijeni parametri validacije metode potvrdili su da kapilarna elektroforeza predstavlja pouzdanu i robusnu analitičku tehniku za rutinsku analizu složenih matrica sa visokim sadržajem šećera. Daljim proširenjem analitičkog opsega razvijeni su protokoli koji omogućavaju simultano određivanje 14 alifatičnih organskih kiselina u vremenskom intervalu od svega 10 minuta. Unapređenje osetljivosti i selektivnosti metode rezultovalo je prvom uspešnom detekcijom malonske i glikolne kiseline u cvetnom medu i medljikovcu, kao i prvom kvantifikacijom mlečne kiseline u medljikovcu⁴⁷.

Pored određivanja organskih kiselina, kapilarna elektroforeza se uspešno primenjuje i za analizu ugljenih hidrata u medu, najčešće u kombinaciji sa elektrohemijom detekcijom. Analitičke performanse ove tehnike značajno su unapređene primenom modifikovanih radnih elektroda, uključujući elektrode od ugljenične paste modifikovane nano–nikl(II)–oksidom (nano–NiO), kao i grafen–kobalt mikrosferama^{7, 99}. Takve elektrode obezbeđuju efikasnu i stabilnu elektrokatalitičku oksidaciju ugljenih hidrata, uz niske granice detekcije i zadovoljavajuću selektivnost za određivanje šećera u medu, pre svega glukoze, fruktoze i saharoze^{7, 99}. Pored navedenih jedinjenja, omogućena je i identifikacija drugih ugljenih hidrata, uključujući manitol i laktozu, čime se proširuju mogućnosti primene CE u proceni autentičnosti i otkrivanju potencijalnog falsifikovanja meda^{7, 99}. Dodatno, razvijeni su postupci koji omogućavaju simultano određivanje HMF–a i profila šećera, što pruža mogućnost istovremenog praćenja sastava ugljenih hidrata i stepena termičke degradacije meda u okviru jedne analize¹⁷.

2.6.7. Nuklearno–magnetna rezonancija

Nuklearna magnetna rezonancija (*eng. Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) predstavlja jednu od najnaprednijih analitičkih tehnika koja poslednjih decenija zauzima sve značajnije mesto u kontroli autentičnosti hrane. Njena ključna prednost ogleda se u mogućnosti simultane detekcije, strukturne karakterizacije i kvantifikacije velikog broja jedinjenja prisutnih u složenim smešama, bez potrebe za prethodnim razdvajanjem ili prečišćavanjem analita. Za razliku od većine hromatografskih metoda, NMR omogućava dobijanje sveobuhvatnog *otiska prsta* uzorka tokom jednog eksperimenta, pri čemu snimanje ¹H NMR spektra traje svega nekoliko minuta. Ovakav pristup posebno je značajan za analizu meda, jer omogućava istovremeno profilisanje šećera, organskih kiselina, fenolnih jedinjenja, terpena i drugih metabolita uz minimalnu pripremu uzorka. Međutim, složenost generisanih spektara zahteva primenu naprednih multivarijantnih statističkih metoda, kao što su PCA, HCA i OPLS–DA, radi izdvajanja relevantnih informacija i identifikacije obrazaca povezanih sa autentičnošću. Razvoj instrumenata sa snažnijim magnetnim poljima, većom osetljivošću i boljom spektralnom rezolucijom dodatno je podstakao primenu 1D i 2D NMR tehnika kao moćnih alata za autentifikaciju složenih matriksa hrane^{7, 12, 38, 50, 58, 59, 100–106}.

Primena NMR spektroskopije u analizi meda dominantno je usmerena na diferencijaciju biljnog porekla i simultanu kvantifikaciju karakterističnih sastojaka. Kombinacija ¹H NMR i heteronuklearne spektroskopije višestrukih veza (¹H–¹³C HMBC) sa modelima prepoznavanja obrazaca omogućila je uspešnu klasifikaciju medova različitog biljnog porekla, uključujući bagremov, kestenov, citrusni, eukaliptusov i poliflorni med¹⁰¹. Potencijal NMR metodologije dodatno je potvrđen primenom ¹H 1D NMR i 2D HSQC spektroskopije, pri čemu je identifikovano 19 različitih saharida i omogućena diskriminacija medova poreklom sa viših nadmorskih visina u odnosu na ostale vrste¹⁰⁷. Pored ne ciljanog profilisanja, NMR omogućava i direktnu kvantifikaciju bez koraka razdvajanja ili koncentrovanja. Tako je primenom ¹H NMR spektroskopije uspešno određeno 13 jedinjenja, uključujući glukozu, fruktozu, organske kiseline, amino–kiseline, etanol i HMF, u okviru jednog analitičkog postupka³⁸. Ovakva sposobnost simultanog određivanja velikog broja hemijskih markera predstavlja jednu od najznačajnijih prednosti NMR pristupa u odnosu na konvencionalne analitičke tehnike.

Pored određivanja biljnog porekla, NMR pokazuje izuzetan potencijal u otkrivanju falsifikovanja meda dodatkom različitih šećernih sirupa. Komparativne studije zasnovane na 1D i 2D NMR tehnikama pokazale su da obe metodologije omogućavaju pouzdanu diskriminaciju autentičnih i falsifikovanih uzoraka, pri čemu je 1D NMR ostvario veći prediktivni kapacitet (95,2%) u odnosu na 2D pristup (90,5%) ¹⁰⁴. Iako 2D NMR pruža detaljnije strukturne informacije, brzina analize, jednostavnija obrada podataka i visoka tačnost čine 1D NMR metodom izbora za rutinski skrining. Posebno značajan doprinos NMR metodologije ogleda se u mogućnosti detekcije falsifikovanja visokofruktoznim kukuruznim sirupima (HFCS) poreklom od C3 biljaka, čime se prevazilaze neka od ograničenja tradicionalnih izotopskih metoda ⁵⁹. Ipak, uprkos izuzetnim analitičkim performansama i širokom spektru primena, visoki troškovi nabavke, održavanja i eksploatacije opreme i dalje predstavljaju glavni faktor koji ograničava širu primenu NMR tehnologije u rutinskoj kontroli autentičnosti meda ⁵⁹.

2.6.8. Metagenomska analiza (metabarkoding DNK markera)

Metode za procenu autentičnosti meda zasnovane na analizi dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) predstavljaju jednu od najperspektivnijih grupa savremenih bioloških pristupa za određivanje porekla i otkrivanje falsifikovanja meda. Njihova primena zasniva se na izolovanju i amplifikaciji nukleinskih kiselina iz izuzetno kompleksne matrice bogate šećerima, polisaharidima i polifenolima, koji mogu značajno inhibirati lančanu reakciju polimeraze (*eng. Polymerase Chain Reaction, PCR*). Zbog toga je optimizacija postupka ekstrakcije ključni preduslov za uspešnu analizu. Dosadašnja istraživanja pokazala su da primena različitih predtretmana, uključujući dijalizu radi uklanjanja šećera, koncentrovanje na membranama odgovarajuće poroznosti i modifikovane CTAB (cetiltrimetilamonijum–bromid) protokole, omogućava izolovanje DNK fragmenata dovoljnog kvaliteta za amplifikaciju i sekvencionu analizu. Dodatna unapređenja, poput razlaganja pri nižim temperaturama i precipitacije alkoholima pod uslovima koji favorizuju renaturaciju DNK, doprinose povećanju prinosa i očuvanju integriteta genetičkog materijala ^{50, 108–111}.

DNK izolovana iz meda predstavlja zbirni genetički materijal poreklom od biljaka, polena, mikroorganizama i samih pčela, čime se formira jedinstveni „*otisak prsta*” karakterističan za dati uzorak. Na toj osnovi razvijeno je DNK metabarkodiranje, koje kombinuje univerzalne genske markere (*rbcL*, *trnL*, *trnH-psbA*, *ITS2*) sa tehnologijama sekvenciranja sledeće generacije (*eng. Next-Generation Sequencing, NGS*), omogućavajući simultanu identifikaciju velikog broja taksona bez prethodnog poznavanja sastava uzorka. U poređenju sa hemijskim i konvencionalnim melizopalinološkim pristupima, DNK metabarkodiranje obezbeđuje veću taksonomsku rezoluciju, višu analitičku propusnost i mogućnost identifikacije biljnih vrsta koje proizvode male količine polena ili ostavljaju samo tragove drugih bioloških komponenti. Efikasnost ove metodologije potvrđena je uspešnom identifikacijom velikog broja biljnih vrsta, uključujući endemske taksone, kao i preciznijim određivanjem biljnog porekla u odnosu na klasične mikroskopske metode ^{50, 108–114}.

Uprkos značajnim prednostima, DNK metabarkodiranje poseduje i određena ograničenja. Metoda nije strogo kvantitativna, budući da broj sekvencionih očitavanja zavisi od broja kopija ciljnih gena, efikasnosti razlaganja polenovih zrna, uspešnosti PCR amplifikacije i drugih eksperimentalnih faktora. Zbog toga se za povećanje analitičke pouzdanosti preporučuje simultana primena više genskih markera, kao i korišćenje lokalno razvijenih referentnih baza podataka. U savremenoj analitičkoj praksi DNK metabarkodiranje se ne posmatra kao zamena za melizopalinološke ili hemijske metode, već kao njihova komplementarna nadogradnja. Integracija genetičkih, melizopalinoloških i hemijskih podataka omogućava najkompletniju procenu autentičnosti, porekla i eventualnog falsifikovanja meda, pri čemu uključivanje biljnih, gljivičnih i bakterijskih komponenti značajno unapređuje rezoluciju i interpretativnu vrednost dobijenih rezultata ^{50, 108–114}.

2.7. Validacija analitičkih metoda

Validacija analitičke metode predstavlja sistematski proces kojim se uspostavljaju dokumentovani dokazi da je određeni metodološki postupak pouzdan, precizan i adekvatan za definisanu analitičku primenu. Ovim procesom uspostavlja se sledljivost rezultata i osigurava striktna kontrola nad mernom nesigurnošću. Za razliku od verifikacije, koja podrazumeva potvrdu da već standardizovana metoda funkcioniše u specifičnim uslovima konkretne laboratorije, validacija se primenjuje u slučajevima kada se razvija nova metoda, kada se postojeća metoda primenjuje na drugačiji matriks ili kada dolazi do promene instrumentacije. Validacija se sprovodi pre početka rutinske primene metode, naročito za nestandardne, modifikovane ili preuzete metode, a njen cilj je definisanje ključnih performansi kao što su selektivnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, radni opseg, tačnost, preciznost i robusnost. Validacija podrazumeva prethodnu optimizaciju metode i korišćenje različitih alata kao što su slepe probe, standardni i referentni materijali, spajkovani uzorci i statistička obrada podataka. Proces se završava validacionim izveštajem koji dokumentuje sve relevantne informacije. Jednom validovana metoda zadržava taj status sve dok se koristi u istim eksperimentalnim uslovima^{40, 115–120}.

Selektivnost analitičke metode predstavlja njenu sposobnost da pouzdano detektuje i kvantifikuje ciljani analit u prisustvu drugih komponenti (matriks supstanci, nečistoća itd.), pri čemu analitički signal potiče isključivo od analita od interesa. Specifičnost se smatra posebnim slučajem selektivnosti – odnosi se na idealnu situaciju u kojoj analitička metoda reaguje isključivo na jedan analit, bez uticaja bilo kakvih interferencija. Drugim rečima, metoda je specifična kada pokazuje potpunu selektivnost prema ciljanom analitu. Selektivnost zavisi od prirode analita, sastava matriksa i same analitičke tehnike, a posebno je važna kod analiza u tragovima. Mogućnosti za njeno unapređenje uključuju izbor selektivnijih metoda, uklanjanje interferencija, njihovo maskiranje ili prethodno odvajanje analita od interesa. Kod hromatografskih tehnika selektivnost se izražava preko rezolucije (R_s), koja izražava stepen razdvajanja pikova i računa se na osnovu retencionih vremena (t_R) i širina pikova (w) (jednačina 6); vrednosti $R_s > 1,5$ ukazuju na potpuno razdvojene komponente (pikove). Kao jedan od osnovnih parametara validacije, selektivnost je od ključne važnosti za tačnost i pouzdanost analitičkog postupka^{115–120}.

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_2 + w_1} \quad (6)$$

Linearnost opisuje sposobnost analitičke metode da obezbedi proporcionalan odnos između izlaznog signala i koncentracije analita u definisanom opsegu merenja. Za procenu linearne zavisnosti najčešće se primenjuje metoda linearne regresije. Pirsonov koeficijent korelacije (eng. *Pearson correlation coefficient*, r) koristi se za procenu jačine linearne veze između dve promeljive, dok koeficijent determinacije (R^2) pokazuje koji deo varijabilnosti izlaznog signala može da se objasni promenama koncentracije analita. Iako se vrednosti R^2 veće od 0,9900 često smatraju pokazateljem zadovoljavajuće linearosti, visok stepen korelacije ne garantuje nužno postojanje stvarne linearne funkcionalne zavisnosti. Stoga je, pored vizuelne procene kalibracione prave, preporučljivo sprovesti dodatne statističke testove kao što su analiza varijanse (eng. *Analysis of Variance*, ANOVA), Studentov t -test (eng. *Student's t-test*), Fišerov F -test (eng. *Fisher F-test*) i analiza reziduala. Vrednosti t i F parametara izračunavaju se prema odgovarajućim jednačinama 7 i 8, a zatim se upoređuju sa kritičnim vrednostima za izabrani nivo poverenja i odgovarajući broj stepeni slobode^{115–120}.

$$t = \frac{r/\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (7) \qquad F = \frac{r^2(n-2)}{1-r^2} \quad (8)$$

Kod t -testa, broj stepeni slobode iznosi $\nu = n - 2$, dok se za F -test određuje kao $\nu_1 = 1$ i $\nu_2 = n - 2$, gde je n broj tačaka koje definišu kalibracionu pravu. Ako je izračunata vrednost testa veća od kritične vrednosti, nulta hipoteza se odbacuje, što ukazuje na postojanje statistički značajne korelacije između analitičkog signala i koncentracije analita. Reziduali predstavljaju razliku između eksperimentalno dobijene y -vrednosti i vrednosti koje predviđa regresioni model za određenu koncentraciju analita. Grafik reziduala predstavlja zavisnost vrednosti reziduala od nezavisno promenljive. Ukoliko je njihova raspodela nasumična i centrirana oko nule, pretpostavka o linearnoj zavisnosti se potvrđuje. U slučaju prisustva trenda ili odstupanja, preporučuje se primena ponderisane linearne regresije. Linearnost se najčešće procenjuje merenjem standardnih rastvora na najmanje šest nivoa koncentracija (u opsegu od 50% do 150% očekivane vrednosti), uz najmanje tri ponavljanja po nivou, nakon čega se grafički prikazuje zavisnost signala od koncentracije. Za razliku od korelacije, koja meri stepen povezanosti, regresija opisuje oblik te zavisnosti, što je ključno za pravilno definisanje opsega validnosti metode i pouzdano kvantifikovanje analita. U regresionoj analizi, standardna greška kalibracionog modela ($S_{y/x}$), poznata i kao standardna devijacija reziduala, predstavlja meru rasipanja eksperimentalnih tačaka oko regresione linije (jednačina 9). Ovaj parametar pokazuje koliko dobro regresioni model opisuje posmatrane podatke – što je njegova vrednost manja, to je poklapanje modela sa eksperimentalnim podacima bolje^{115–120}.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (9)$$

Granica detekcije (*eng. Limit of Detection*, LOD) i granica kvantifikacije (*eng. Limit of Quantification*, LOQ) predstavljaju važne parametre validacije, usko povezane sa nivoom šuma mernog sistema. Odnos signal/šum (*eng. Signal-to-Noise ratio*, S/N) opisuje proporcionalnost analitičkog signala u odnosu na prosečan nivo šuma i može poslužiti kao osnova za procenu LOD i LOQ. Granica detekcije označava najnižu koncentraciju analita koja se sa statističkom značajnošću može pouzdano detektovati, i obično se definiše kao signal koji je tri puta veći od standardne devijacije šuma, dok je granica kvantifikacije najniža koncentracija koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom tačnošću i preciznošću, najčešće postavljena na desetostruku vrednost šuma. Postoji više metoda za određivanje ovih parametara (vizuelna procena, metoda na osnovu slepih proba, grafička metoda, metoda nagiba kalibracione krive itd.). Metoda na osnovu nagiba kalibracione krive koristi se kod instrumentalnih tehnika i podrazumeva računanje LOD i LOQ prema jednačinama 10 i 11, gde je $S_{y/x}$ standardna greška kalibracionog modela, a b nagib kalibracione krive. S obzirom na razlike u primenljivosti i tačnosti, izbor metode određivanja LOD i LOQ zavisi od prirode analitičke tehnike i raspoložive opreme^{115–120}.

$$LOD = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (10) \qquad LOQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (11)$$

Određivanje linearnosti i granice kvantifikacije predstavlja osnovu za definisanje mernog opsega analitičke metode, odnosno intervala koncentracija analita u kojem merni sistem daje tačne, precizne i pouzdane rezultate. U idealnim uslovima, opseg merenja se definiše kao interval između LOQ i najviše koncentracije analita pri kojoj je očuvana proporcionalnost između koncentracije i analitičkog odziva. Međutim, u praksi se često ne ispituju krajnje granice metode, već se radni opseg sužava i prilagođava realnim koncentracijama analita koje se očekuju u uzorcima. Tako, kod metoda koje se koriste za kvantifikovanje, prema ICH (*eng. International Council for Harmonisation*, Međunarodni savet za harmonizaciju) smernicama, preporučuje se da radni opseg obuhvata interval od 80% do 120% očekivane koncentracije analita. Nasuprot tome, kod metoda namenjenih za određivanje nečistoća, donja granica radnog opsega može odgovarati LOQ vrednosti ili 50% maksimalno

dozvoljene koncentracije nečistoće (u zavisnosti od toga koja je vrednost veća), dok se kao gornja granica uzima 120% maksimalno dozvoljene količine date nečistoće^{115–121}.

Osetljivost predstavlja odnos između promene analitičkog signala i odgovarajuće promene koncentracije analita, odnosno izražava sposobnost metode da uoči male promene u koncentraciji. U praksi se osetljivost određuje kao nagib kalibracione krive (b), pri čemu veći nagib ukazuje na veću osetljivost metode. Iako osetljivost nije obavezni parametar u postupku validacije analitičke metode, može biti od značaja pri izboru metode u zavisnosti od zahteva analize, naročito kada je potrebno pouzdano detektovati male razlike u koncentraciji. Ovaj parametar, za razliku od granice detekcije i kvantifikacije, ne definiše minimalnu merljivu koncentraciju, već najmanju razliku između koncentracija koju je metoda sposobna da razlikuje^{115–120}.

Preciznost je mera međusobne bliskosti rezultata ponovljenih merenja istog uzorka pod unapred definisanim uslovima. Odnosi se na rasipanje rezultata oko srednje vrednosti, a izražava se standardnom devijacijom (s , jednačina 12), relativnom standardnom devijacijom (RSD) odnosno koeficijentom varijacije (CV, jednačina 13). Preciznost je povezana sa slučajnim greškama i meri se analizom varijabiliteta dobijenih rezultata. U zavisnosti od uslova u kojima se merenje sprovodi, razlikuju se tri nivoa preciznosti – ponovljivost (*eng. Repeatability*), unutarlaboratorijska preciznost (intermedijerna reproduktivnost) i reproduktivnost (*eng. Reproducibility*). Ponovljivost označava preciznost u uslovima kada su svi faktori konstantni – ista laboratorija, analitičar, instrument, reagensi i kratak vremenski interval merenja. Tipičan primer je ponovljeno izvođenje klasične titracije istog uzorka u roku od 30 minuta. Rezultati se izražavaju standardnom devijacijom ponovljivosti (s_r) i relativnom standardnom devijacijom ponovljivosti (RSD_r). Unutarlaboratorijska preciznost obuhvata šire uslove unutar jedne laboratorije – različiti dani, analitičari, instrumenti ili serije reagenasa (duži vremenski interval). Standardna devijacija i RSD u ovom slučaju se označavaju kao s_l i RSD_l . Ovaj nivo preciznosti daje uvid u pouzdanost metode tokom dugotrajnijeg korišćenja u realnim laboratorijskim uslovima. Reproductivnost procenjuje varijabilnost rezultata između različitih laboratorija, analitičara i opreme. Označava se kao s_R i RSD_R . Ovaj parametar se najčešće procenjuje kroz kolaborativne (međulaboratorijske) studije i predstavlja najviši (opšti) nivo procene preciznosti^{115–120}.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (12) \qquad RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (13)$$

Ponovljivost, kao jedna od komponenti preciznosti, definiše se kao stepen slaganja rezultata dobijenih pri analizi 6 do 15 nezavisnih uzoraka, pri čemu svaki uzorak prolazi kroz celu analitičku proceduru – uključujući pripremu uzorka, izvođenje analize i očitavanje rezultata. Na osnovu dobijenih rezultata izračunavaju se standardna devijacija ili relativna standardna devijacija koje kvantifikuju ponovljivost metode. Analogno se računaju vrednosti za intermedijernu preciznost (s_l , RSD_l) i reproduktivnost (s_R , RSD_R)^{115–120}.

Granice ponovljivosti (*eng. Repeatability limit, r*), intermedijerne preciznosti i reproduktivnosti (R) predstavljaju maksimalnu prihvatljivu razliku između dva rezultata dobijenu analizom istog uzorka pri uslovima ponovljivosti, na odgovarajućem nivou poverenja (jednačina 14):

$$r = 2,8 \cdot s_r \quad (14)$$

Za procenu prihvatljivosti vrednosti RSD_R koristi se Horvicova (*eng. Horwitz*) jednačina (15), gde je $RSD_{R,H}$ teorijski predviđena relativna standardna devijacija reproduktivnosti, a C je koncentracija analita izražena kao bezdimenzioni maseni udeo (npr. 1% = 0,01; 1 ppm = 10^{-6})¹²².

$$RSD_{R,H} (\%) = 2^{(1 - 0,5\log C)} = 2 C^{-0,15} \quad (15)$$

HorRat parametar predstavlja odnos eksperimentalno određene relativne standardne devijacije reproduktivnosti (RSD_R) i relativne standardne devijacije reproduktivnosti predviđene Horvicovom jednačinom ($RSD_{R,H}$) (jednačina 16). Pri uslovima reproduktivnosti, prihvatljive vrednosti HorRat parametra su između 0,5 i 2. HorRat(r) parametar se koristi za procenu rezultata studija ponovljivosti i predstavlja odnos eksperimentalno dobijene relativne standardne devijacije ponovljivosti (RSD_r) i relativne standardne devijacije reproduktivnosti izračunate pomoću Horvicove jednačine ($RSD_{R,H}$). Prihvatljive vrednosti su između 0,3 i 1,3¹²².

$$HorRat = \frac{RSD_R}{RSD_{R,H}} \quad (16)$$

Tačnost se definiše kao bliskost slaganja izmerene vrednosti i stvarne (referentne) vrednosti merene veličine, dok se pouzdanost odnosi na bliskost proseka beskonačnog broja ponovljenih merenja i referentne vrednosti. U savremenoj terminologiji pojam *tačnost* zamenjen je pojmom *pouzdanost*, dok se *tačnost jednog merenja* pojednostavljeno naziva *tačnost*. Pouzdanost opisuje usklađenost rezultata analitičke metode sa stvarnim vrednostima, pri čemu na nju najviše utiče sistematska greška metode. Tačnost predstavlja kombinaciju pouzdanosti i preciznosti – što su rezultati pouzdaniji i precizniji, to je pojedinačno merenje tačnije. Istinitost (*eng. Trueness*) označava stepen slaganja prosečne vrednosti serije merenja sa referentnom vrednošću, dok preciznost izražava međusobnu bliskost rezultata ponovljenih merenja i posledica je slučajnih grešaka. Sistematska greška ili *bias* je osnovni faktor koji utiče na istinitost, a ukupna tačnost uzima u obzir oba tipa grešaka. U praksi, tačnost se najčešće određuje metodom spajkovanja (*eng. Spike*), pri čemu se uzorcima poznatog ili nepoznatog sastava dodaje poznata količina standardnog rastvora analita. Na osnovu analitičkog prinosa (*eng. Recovery*) to jest odnosa između izmerene i dodate količine analita procenjuje se stepen usklađenosti merenja sa očekivanim vrednostima (jednačina 17). Tako, na primer, za koncentracioni opseg merenja reda veličine 10^{-6} (npr. mg/kg), preporučene vrednosti analitičkog prinosa nalaze se u užem rasponu, obično od 60% do 115%, u skladu sa zahtevima za analize u tragovima, gde su tolerancije nešto šire zbog veće verovatnoće greške pri niskim koncentracijama^{115–120}.

$$Recovery (\%) = \frac{C_{spajkovanog\ uzorka}}{C_{nespajkovanog\ uzorka} + C_{dodata}} \cdot 100 \quad (17)$$

Robusnost predstavlja meru pouzdanosti analitičke metode da u prisustvu blagih, ali namernih varijacija eksperimentalnih uslova, kao što su promena temperature, pH-vrednosti, sastava rastvarača ili čistoće reagensa. Ispitivanje robusnosti ima za cilj da proceni u kojoj meri takve promene mogu uticati na krajnji rezultat analize. Ukoliko i male fluktuacije izazivaju značajna odstupanja u rezultatima, neophodna je stroga kontrola uslova merenja tokom primene metode. S druge strane, fleksibilnost metode odnosi se na njenu sposobnost da daje pouzdane rezultate u različitim laboratorijskim okruženjima i pri variranju uslova primene. Dok se robusnost najčešće ispituje unutar jedne laboratorije, kroz kontrolisane promene faktora kao što su temperatura, pH-vrednost, reagensi ili uslovi hromatografskog razdvajanja, fleksibilnost se procenjuje putem međulaboratorijskih studija koje uključuju širi opseg promenljivih uslova. Zajednički cilj ispitivanja robusnosti i fleksibilnosti jeste potvrda praktične primenljivosti i otpornosti metode u realnim analitičkim scenarijima^{115–120}.

2.8. Statistička obrada rezultata

Savremene analitičke metode pružaju mogućnost za vrlo lako prikupljanje velikog broja podataka, te se veliki značaj pridaje odabiru statističke metode koja se koristi za interpretaciju dobijenih rezultata.

Deskriptivna statistika je oblast statistike koja se bavi prikupljanjem i organizacijom prikupljenih numeričkih podataka u cilju pružanja osnovnih informacija grupisanja podataka oko određenih vrednosti ili o prirodi njihovog rasipanja. Mere centralne tendencije su veličine oko kojih se rezultati nekog merenja grupišu (aritmetička sredina, medijana, moda, geometrijska i harmonijska sredina), dok rasipanje podataka opisuju mere varijabiliteta (raspon, standardna devijacija, varijansa, koeficijent varijacije i interval varijacije)^{123, 124}. Grafičko prikazivanje rezultata predstavlja slikovit način prikazivanja podataka prikazanih u tabelama. Naime, grafičko prikazivanje rezultata uglavnom sumira tabelarne podatke na pregledniji način te omogućava potpuniju analizu i mogućnost lakšeg uočavanja pravilnosti i izvođenja verodostojnijih zaključaka¹³¹. U okviru ove doktorske disertacije rezultati su grafički prikazivani pomoću štapićastih, kružnih i rasutih grafikona.

Inferencijalna statistika predstavlja deo statistike koji razvija i primenjuje statističke metode kojima se donose zaključci o vrednostima parametara nekog skupa merenja. Statističko zaključivanje se u inferencijalnoj statistici vrši kroz ocenjivanje i testiranje statističkih hipoteza. Prvenstveno se definiše nulta hipoteza koja označava odsustvo statističke značajnosti, odnosno pretpostavlja da je rezultat testiranja posledica slučajnog događaja. Nakon definisanja nulte hipoteze vrši se statističko testiranje, pri čemu se nulta hipoteza zadržava ili odbacuje. U cilju provere definisanih hipoteza koriste se parametrijski i neparametrijski testovi značajnosti, čiji rezultati ukazuju da li treba prihvatiti ili odbaciti nultu hipotezu sa određenim stepenom verovatnoće. Parametrijski testovi se oslanjaju na pretpostavku da podaci podležu normalnoj (Gausovoj) raspodeli i u obzir uzimaju numeričke parametre prilikom testiranja. Ukoliko se s određenom verovatnoćom ne može utvrditi raspodela podataka nekog obeležja, koriste se neparametrijski testovi, pri čemu je interpretacija rezultata neparametrijskih testova kompleksnija od interpretacije rezultata analognih parametrijskih testova^{123, 124}.

Skupovi podataka dobijeni hromatografskim tehnikama sadrže veliki broj korisnih informacija. Usled postojanja velikog broja podataka, uočavanje pravilnosti među podacima i njihova obrada prvenstveno zahteva smanjivanje njihove dimenzionalnosti. U odnosu na način na koji se vrši obrada, multivarijantna analiza se može podeliti na klasifikacionu, koja dodeljuje objekte unapred definisanim grupama i na diskriminativnu, kojom se različiti skupovi objekata mogu odvojiti^{86, 125}. U okviru ove doktorske disertacije korišćena je multivarijantna analiza varijanse, analiza glavnih komponenta, kao i tehnike diskriminante analize, poput regresije metodom delimičnih najmanjih kvadrata.

2.8.1. Analiza glavnih komponenta

Analiza glavnih komponenta (*eng. Principal Component Analysis, PCA*) je matematički algoritam koji za cilj ima smanjenje dimenzionalnosti podataka pri čemu zadržava većinu varijabiliteta skupa podataka. PCA je najčešće primenjivana hemometrijska tehnika koja izračunava linearne latentne varijable duž kojih je varijabilitet podataka maksimalan^{126–128}. PCA se može posmatrati i kao metoda koja izračunava i projektuje nov koordinatni sistem formiran od ortogonalnih latentnih varijabli pri čemu se koriste samo najinformativnije dimenzije. Latentne varijable PCA predstavljaju optimalno rastojanje objekata u visokodimenzionalnom prostoru. Pravac koji najbolje opisuje varijabilitet podataka je latentna varijabla maksimalnog varijabiliteta (projektovane vrednosti podataka na latentnoj promenljivoj) i označava se kao prva glavna komponenta (PC1). Druga glavna komponenta (PC2) definiše se kao ortogonalni pravac prema PC1 i ima ulogu da opiše maksimalni varijabilitet preostalih (neopisanih) podataka. Sve dalje latentne varijable opisuju varijanse podataka koje nisu obuhvaćene sa prve dve glavne komponente i normalne su u odnosu na njih. Glavne komponente koje nisu informativne, jer opisuju mali broj podataka, se odbacuju^{128, 129}. Grafičko prikazivanje rezultata PCA od suštinskog je značaja za grupisanje podataka odnosno za uočavanje postojanja spoljnih vrednosti. Nakon PCA analize formira se grafik skorova najčešće prve dve glavne komponente kojim se opisuje maksimalan varijabilitet podataka. Za identifikaciju varijabli koje najviše utiču na

grupisanje podataka na PCA grafiku, odnosno na pozicioniranje uzoraka na grafiku skorova, formira se grafik vektora koeficijenata latentnih varijabli (*eng. loading vector*).

2.8.2. Diskriminantna analiza delimičnih najmanjih kvadrata

Regresija delimičnih najmanjih kvadrata (*eng. Partial Least Squares regression*, PLS) je hemometrijska tehnika koja se koristi za modelovanje odnosa između velikog broja nezavisnih varijabli (x -matrice) i jedne ili više zavisno promenljivih (y -matrica). Od originalnih podataka formira se manji broj novih latentnih promenljivih koje istovremeno objašnjavaju maksimalni varijabilitet između nezavisnih varijabli i imaju najveću povezanost sa zavisno promenljivom. Kombinacijom PLS regresije sa diskriminantnim pristupom (*eng. Partial Least Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA) dobija se linearni model pomoću kojeg se vrši klasifikacija uzoraka i odabir varijabli koje dovode do razlike između klasifikovanih uzoraka. Klasifikaciona i predikciona sposobnost modela ocenjuje se na osnovu koeficijenta determinacije (R^2) i korena kvadratnog odstupanja (*eng. Root Mean Square Error*, RMSE), pri čemu vrednosti koeficijenta determinacije bliske jedinici i niske vrednosti RMSE ukazuju na visok kvalitet i predikcionu moć modela ^{123, 129-131}.

2.8.3. Priprema i obrada slika hromatograma

Komercijalno dostupni softver ImageJ (<https://imagej.en.softonic.com/download>) koristi se za obradu slike hromatograma i ima funkciju prevođenja slike u matricu numeričkih podataka koji se mogu upotrebiti prilikom multivarijantne analize podataka. Korišćenje ImageJ podrazumeva obradu slike hromatograma u smislu rotacije, obeležavanja površina slike hromatograma od interesa, isecanje traka razdvojenih uzoraka i standarda, podele slike kroz crveni, plavi i zeleni kanal kod hromatograma čije su zone obojene ili na sivi kanal kod jednobojnih hromatograma i na kraju grafičko prikazivanje zavisnosti intenziteta dobijenih boja. Varijable numeričkih podataka predstavljaju intenzitete razdvojenih zona u funkciji R_F vrednosti ¹²⁹.

Pre sprovođenja multivarijantne analize, neophodna je dodatna obrada sirovih podataka dobijenih iz hromatograma i slika, kako bi se osigurala njihova tačnost i uporedivost. Ovi postupci uključuju poravnanje, normiranje, centriranje i skaliranje podataka, a mogu se izvesti pomoću algoritama implementiranih u softverima kao što su PLS ToolBox u okviru MATLAB paketa i ImageJ.

Poravnanje pikova (*eng. Warping procedure*) predstavlja ključni korak u obradi podataka, naročito u slučaju kada dolazi do pomeranja hromatografskih zona usled promena eksperimentalnih uslova (fluktuacija temperature i vlažnosti, neravnomerno zasićenje kade parama mobilne faze, instrumentalna nestabilnost ili analitičke greške). Primena metoda kao što su korelacija optimizacije savijanja (*eng. Correlation Optimized Warping*, COW) i poravnanje signala (*eng. Peak alignment*) omogućava usklađivanje R_F vrednosti traka i njihovo dovođenje u istu referentnu tačku. Ovim postupkom se osigurava konzistentnost podataka, što je ključno za konstrukciju pouzdanih statističkih modela u okviru multivarijantne analize. Normiranje podataka se koristi za eliminaciju neželjenih efekata koji nastaju usled razlika u količini uzorka, osetljivosti instrumenta, vremena merenja ili drugih eksperimentalnih faktora. Normiranjem se podaci dovode na zajedničku skalu. Najčešće korišćena tehnika normiranja je standardna normalna promenljiva (*eng. Standard Normal Variate*, SNV), kojom se omogućava bolja uporedivost spektralnih podataka. Centriranje podataka, koje podrazumeva njihovo svođenje na istu jedinicu, može se vršiti u odnosu na srednji intenzitet signala (*eng. Mean centering*) ili u odnosu na medijanu (*eng. Median centering*). Opcija centriranja u odnosu na srednju vrednost se preporučuje kada su sve varijable izražene u istim jedinicama. Opcija autoskaliranja, koja podrazumeva svođenje podataka na jediničnu standardnu devijaciju i nultu aritmetičku sredinu, se koristi u slučaju kvantitativnih podataka ¹³².

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Uzorci meda

U periodu od 2022. do 2024. godine prikupljeno je ukupno 138 uzoraka meda, direktno od pčelara, putem Pogona za prikupljanje i plasman meda pčelara SPOS-a ili posredstvom InovaLab – Laboratorije za ispitivanje autentičnosti hrane Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu. Analizirani skup (Tabela 6) činili su uzorci bagremovog, lipovog, suncokretovog, meda od uljane repice i medljikovca.

Tabela 6. Biljna vrsta i broj analiziranih uzoraka meda

Biljna vrsta meda	Broj analiziranih uzoraka
Bagremov med (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	74
Lipov med (<i>Tilia cordata</i>)	18
Suncokretov med (<i>Helianthus annuus</i>)	10
Med od uljane repice (<i>Brassica napus</i>)	10
Medljikovac (<i>Honeydew</i>)	26
Ukupno	138

Biljno poreklo meda, preliminarno deklarirano od strane proizvođača, verifikovano je primenom integrisanog analitičkog pristupa koji je obuhvatao melizopalinološku analizu, određivanje standardnih fizičko-hemijskih parametara i analizu odnosa stabilnih izotopa ugljenika. U klasifikaciju autentičnih uzoraka uvršćeni su isključivo oni medovi koji su bili u potpunosti usaglašeni sa kriterijumima definisanim u Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela ², i čija su senzorna svojstva bila karakteristična za deklarisanu biljnu vrstu.

Za potrebe optimizacije i validacije hromatografskih metoda za određivanje profila šećera i organskih kiselina pripremljen je zbirni uzorak (*eng. collective sample*, CS) homogenizacijom alikvota autentičnih uzoraka bagremovog meda. Eksterna verifikacija autentičnosti ovog zbirnog uzorka sprovedena je u referentnoj laboratoriji Intertek (Bremen, Nemačka), nakon čega je uzorak korišćen u daljim postupcima optimizacije.

U cilju unapređenja detekcije prisustva šećernih sirupa primenom HPTLC i HPAEC–PAD tehnika, formiran je nezavisan set od 30 komercijalnih uzoraka meda, koji nije pripadao primarnom eksperimentalnom skupu. Kao referentni materijali za simulaciju prisustva egzogenih šećera korišćeni su sirupi različitog sastava: visokomaltozni, bombonski, skrobno-glukozni i fruktozni sirup (Industrija skroba „Jabuka”, Pančevo, Srbija), dok je invertni sirup obezbeđen od strane laboratorije InovaLab.

Uzorci su po prijemu u laboratoriju označeni i skladišteni na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svetlosti. Pre svakog analitičkog postupka izvršena je homogenizacija uzoraka mehaničkim mešanjem u originalnoj ambalaži.

3.2. Reagensi i materijali

Za pripremu svih ekstrakata, rastvora i standarda korišćena je ultračista voda provodljivosti 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (*ThermoFisher TKA MicroPure*, Niderelbert, Nemačka). Filtriranje ekstrakata vršeno je primenom najlonskih filtera za špriceve poroznosti 0,22 μm (*Supelco, Sigma–Aldrich*, Sent Luis, Misuri, SAD).

Svi standardi ugljenih hidrata primenjeni za identifikovanje i kvantifikovanje (glukoza, fruktoza, saharoza, trehaloza, turanoza, melibioza, maltoza, izomaltoza, erloza, melequitoza, rafinoza i gentiobioza), kao i standardi organskih kiselina (limunska, izolimunska, fumarna, maleinska, malonska, jabučna, kininska, šikiminska, glukuronska, galakturonska i ćilibarna kiselina u obliku komercijalnog kita) nabavljeni su od proizvođača *Supelco/Sigma-Aldrich* (Sent Luis, Misuri, SAD). Pored navedenih, standard 5-hidroksimetil-2-furaldehida (HMF) nabavljen je od istog proizvođača (*Sigma-Aldrich*).

Kalijum-jodid, natrijum-hlorid, elementarni jod, natrijum-acetat, fuksin, sirćetna kiselina, difenilamin, anilin i aceton nabavljeni su od kompanije *Merck* (Darmštadt, Nemačka). Skrob je nabavljen od proizvođača *Fisher Chemical* (Pensilvanija, SAD), dok je natrijum-volframat obezbeđen od strane *Carlo Erba Reagents* (Milano, Italija). Za pripremu eluenta u jonskoj hromatografiji korišćeni su rastvor natrijum-hidroksida (50%) i natrijum-acetata trihidrata (*Sigma-Aldrich*), dok je kalijum-hidroksid generisan *in situ* primenom eluent-generatora (Dionex EGC III KOH, kat. broj 074532, *Thermo Fisher Scientific*). Standardna ampula natrijum-hidroksida (0,1 mol/L Titrisol) nabavljena je od kompanije *Merck*.

Kalibracija i praćenje rada instrumenata sprovedeni su primenom sertifikovanih referentnih materijala: konduktometrijski standard kalijum-hlorida ($1413 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 1\%$ (25°C)) proizveden od strane *LLG-Labware* (Vilmington, Delaver, SAD), sertifikovani standard glukoze (BCR-657) obezbeđen od strane *Instituta za referentne materijale i merenja* (Gil, Belgija) i standard kofeina (IAEA-600) dobijen od *Međunarodne agencije za atomsku energiju* (Beč, Austrija). HPTLC analize sprovedene su na pločama sa silika-gelom kao stacionarnom fazom ($20 \times 10 \text{ cm}$; serijski broj 105548, *Merck*, Darmštadt, Nemačka).

3.3. Melizopalinološka analiza

Izolovanje polenovih zrna iz meda izvršeno je u skladu sa standardnim melizopalinološkim postupkom. Uzorak od 10 g meda rastvoren je u 25 mL hladne ultračiste vode uz kontinuirano blago mešanje. Dobijeni rastvor je potom centrifugiran na 1000 min^{-1} (rpm) tokom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklonjen dekantovanjem, a dobijeni sediment je resuspendovan u 20 mL ultračiste vode u cilju uklanjanja zaostalih mikrokristala i drugih rastvorljivih primesa. Sekundarno centrifugiranje sprovedeno je pod identičnim uslovima, nakon čega je supernatant ponovo odbačen^{133, 134}.

Priprema mikroskopskih preparata sprovedena je korišćenjem glicerinskog gela prethodno termostatiranog na 40°C . Mikroskopska predmetna stakla su takođe prethodno zagrejana na grejnoj ploči. Celokupan izolovani sediment polena kvantitativno je prenet pomoću pipete na predmetno staklo, u okviru definisane površine dimenzija $22 \times 22 \text{ mm}$, gde je ravnomerno raspoređen mikrolopaticom. Preparat je inkubiran na grejnoj ploči tokom 1 h radi potpunog isparavanja rastvarača. Nakon toga je na prethodno zagrejano pokrovno staklo naneta kap glicerinskog gela sa dodatkom fuksina (u svrhu kontrastnog bojenja polenovih zrna). Pokrovno staklo je postavljeno na sediment uz striktno izbegavanje formiranja vazdušnih mehurića, nakon čega je preparat dodatno zagrevan tokom 5 minuta u cilju fiksiranja i učvršćivanja medijuma.

Mikroskopska identifikacija i kvantifikacija polenovih zrna sprovedene su primenom optičkog mikroskopa (Leica DM1000 – *Leica*, Vetzlar, Nemačka; Slika 13) pod uvećanjem koje omogućava jasnu vizuelizaciju specifičnih morfoloških karakteristika ekstrastrukture zrna. Nakon preliminarnog identifikovanja prisutnih taksona, prebrojavanje je vršeno do registrovanja najmanje 500 polenovih zrna po uzorku. U slučajevima uočene nehomogenosti ili izraženih varijacija u distribuciji unutar preparata, sprovedeno je dodatno prebrojavanje paralelnih vidnih polja radi povećanja statističke pouzdanosti i preciznosti dobijenih rezultata.



Slika 13. Mikroskop Leica DM1000 (Leica)

3.4. Fizičko–hemijski parametri

3.4.1. Određivanje sadržaja vode

Sadržaj vode u uzorcima meda određen je refraktometrijskom metodom u skladu sa zvaničnim preporukama Međunarodne komisije za med (*eng. International Honey Commission, IHC*)¹³⁵. Princip metode zasniva se na direktnoj zavisnosti indeksa refrakcije od masenog udela suve supstance u ispitivanom uzorku. Maseni udeo vode izračunat je konverzijom izmerenih vrednosti indeksa refrakcije primenom standardnih referentnih vrednosti (Tabela 7). Merenja su sprovedena korišćenjem automatskog digitalnog refraktometra (RX–7000α, Atago, Tokio, Japan; Slika 14). Kalibracija instrumenta vršena je dejonizovanom vodom nakon čega je površina merne prizme pažljivo sušena. Nakon kalibracije homogenizovani i bistri uzorci meda ispitani su nanošenjem male količine uzorka na površinu prizme, a indeks refrakcije je očitavan isključivo nakon termostatisiranja sistema na 20 °C. Merenja su izvedena u duplikatu dok je za proračun sadržaja vode (18) korišćena srednja vrednost očitano indeksa refrakcije.

$$W = \frac{1,73190 - \log(RI - 1)}{0,002243} \quad (18)$$



Slika 14. Digitalni refraktometar RX–7000α (Atago)

Tabela 7. Sadržaj vode (g/100 g) u medu u zavisnosti od vrednosti indeksa refrakcije (na 20 °C)

Sadržaj vode	Indeks refrakcije	Sadržaj vode	Indeks refrakcije	Sadržaj vode	Indeks refrakcije	Sadržaj vode	Indeks refrakcije
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	-	-

3.4.2. Određivanje električne provodljivosti

Električna provodljivost meda određena je konduktometrijskom metodom, u skladu sa zvaničnim preporukama IHC-a¹³⁵. Odmerena je masa uzorka koja odgovara masi od 20,0 g anhidrovanog meda, nakon čega je rastvorena u ultračistoj vodi. Dobijeni rastvor je kvantitativno prenet u odmerni sud zapremine 100 mL i dopunjen ultračistom vodom do crte. Alikvot rastvora prebačen je u čašu visoke forme, u koju je uronjena konduktometrijska ćelija (Cond 7110 TetraCon 325, WTW, Vilhem, Nemačka; Slika 15), nakon čega je očitana vrednost električne provodljivosti izražena u mS/cm. Kalibracija instrumenta sprovedena je primenom sertifikovanog konduktometrijskog standarda kalijum-hlorida deklarisanog provodljivosti od 1413 $\mu\text{S}/\text{cm} \pm 1\%$ (pri 25 °C). S obzirom na to da se referentne vrednosti električne provodljivosti meda izražavaju na 20 °C, izvršena je temperaturna konverzija dobijenih rezultata. Korekcija je sprovedena primenom propisanog faktora, tako što je izmerenoj vrednosti dodato 3,2% za svaki °C ukoliko je temperatura merenja bila niža od 20 °C, odnosno oduzeto 3,2% za svaki °C ukoliko je temperatura merenja bila viša od 20 °C.



Slika 15. Konduktometar TetraCon 325 (WTW)

3.4.3. Određivanje slobodne kiselosti

Slobodna kiselost meda određena je titrimetrijskom metodom u skladu sa zvaničnim preporukama IHC-a¹³⁵. Uzorak mase 5,0 g meda kvantitativno je prenet u čašu zapremine 100 mL i rastvoren u 40 mL ultračiste vode. Dobijeni rastvor je uz kontinualno mešanje na magnetnoj mešalici titrovan standardnim rastvorom natrijum–hidroksida (0,1 mol/L) do postizanja pH–vrednosti 8,30. Za praćenje promene pH–vrednosti korišćena je kombinovana staklena elektroda (LL Ecotrode Plus WOC, kat. broj ME0000060262100, *Metrohm*, Herisau, Švajcarska; Slika 16). Prikupljanje i obrada podataka sprovedene su primenom softvera Titrino, integrisanog uz automatski titrator (716 DMS Titrino, *Metrohm*). Izračunavanje slobodne kiselosti izvedeno je primenom jednačine (19):

$$\text{Slobodna kiselost} = \frac{V_{NaOH} \cdot C_{NaOH}}{m_{uzorka}} \quad (19)$$

pri čemu je V_{NaOH} zapremina standardnog rastvora natrijum–hidroksida utrošenog za titrovanje analita do završne tačke (pH = 8,30), dok C_{NaOH} označava tačnu koncentraciju standardnog rastvora izraženu u mol/L. Za titraciju je korišćen komercijalno dostupan standard natrijum–hidroksida (Titrisol ampula natrijum–hidroksida, 0,1 mol/L). Rezultati određivanja slobodne kiselosti izraženi su u miliekvivalentima kiseline po kilogramu meda (meq/kg).



Slika 16. Automatski titrator LL Ecotrode Plus WOC (*Metrohm*)

3.4.4. Određivanje sadržaja 5–hidroksimetilfurfurala

Sadržaj 5–hidroksimetilfurfurala (HMF) u medu određen je u skladu sa harmonizovanom metodom IHC-a¹³⁵. Uzorak mase 5,00 g meda kvantitativno je prenet u čašu i rastvoren u 15 mL ultračiste vode. Dobijeni rastvor je potom kvantitativno prenet u odmerni sud zapremine 25 mL i dopunjen ultračistom vodom do crte. Alikvot ovako pripremljenog rastvora filtriran je kroz najlonski filter poroznosti 0,45 μm neposredno pre injektovanja u sistem za visokoefikasnu tečnu hromatografiju (HPLC) opremljen UV detektorom (*Waters* 1500 Series HPLC Pump, *Waters* 2487 Dual λ Absorbance Detector, Milford, SAD; Slika 17). Za hromatografsko razdvajanje komponenti korišćena je reverzno–fazna analitička kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 $\times$ 150 mm). Kao mobilna faza korišćena je smeša ultračiste vode i metanola u zapreminskom odnosu 90:10 (v/v), pri konstantnom protoku od 1,0 mL/min (izokratski). Injekciona zapremina iznosila je 20 μL , dok je detekcija analita vršena praćenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 285 nm. Kvantifikacija HMF–a sprovedena je metodom eksterne kalibracije. Pre analize uzoraka, injektovana je kalibraciona serija standardnih rastvora HMF–a u koncentracionom opsegu od 1 do 15 mg/L. Sadržaj HMF–a u ispitivanim uzorcima izračunat je primenom jednačine (20), a finalni rezultati određivanja izraženi su u mg/kg meda.

$$\text{Sadržaj HMF} = A_{uzorka} \cdot m_{uzorka} \quad (20)$$



Slika 17. Sistem za visokoefikasnu tečnu hromatografiju Waters 1500 Series

3.4.5. Određivanje aktivnosti dijestaze

Aktivnost dijestaze u medu određena je spektrofotometrijskom metodom u skladu sa zvaničnim preporukama IHC-a¹³⁵. Princip metode zasniva se na hidrolizi standardnog rastvora skroba pod dejstvom enzima iz uzorka meda. Formiranje kompleksa između preostalog, nehidrolizovanog skroba i dodatih jodidnih jona (elementarni jod i kalijum-jodid) rezultuje plavim obojenjem, čiji se intenzitet linearno smanjuje srazmerno aktivnosti enzima. Praćenjem smanjenja apsorbancije reakcione smeše u definisanim vremenskim intervalima dobijaju se parametri linearne zavisnosti pomoću kojih se izračunava t_x – vreme neophodno za postizanje specifične vrednosti apsorbancije od 0,235. Aktivnost dijestaze izražava se u dijestatskim jedinicama (Goteove jedinice), pri čemu jedna jedinica odgovara aktivnosti enzima prisutnog u 1 g meda koja hidrolizuje 0,01 g skroba tokom intervala od 1 h pri temperaturi od 40 °C. Dijestatski broj (*eng. Diastase Number*, DN) izračunava se primenom jednačine (21):

$$DN = \frac{300}{t_x} \quad (21)$$

Priprema uzorka sprovedena je rastvaranjem 5,0 g meda u 10 mL ultračiste vode uz dodatak 2,5 mL acetatnog pufera (pH = 5,30). U odmerni sud zapremine 50 mL prvo je preneto 3 mL rastvora natrijum-hlorida ($\gamma = 29$ g/L), nakon čega je kvantitativno prenet rastvor meda sa puferom, te je odmerni sud dopunjen ultračistom vodom do crte. Pre analize je određena plava vrednost, u cilju definisanja tačne zapremine ultračiste vode koju je neophodno dodati u reakcionu smešu kako bi početna apsorbancija kompleksa bila u opsegu od 0,745 do 0,770. Sva spektrofotometrijska merenja sprovedena su primenom UV-Vis spektrofotometra (Cintra 6, *GBC Scientific Equipment*, Bresid, Australija; Slika 18). U vodeno kupatilo, prethodno termostatirano na 40 °C, postavljeni su erlenmajeri koji su sadržali po 10 mL ultračiste vode, 10 mL rastvora skroba i 10 mL rastvora uzorka meda. Nakon postizanja zadate temperature, alikvot od 5 mL rastvora skroba kvantitativno je prenet u rastvor meda uz istovremeno započinjanje merenja vremena. Smanjenje apsorbancije praćeno je sukcesivno u definisanim vremenskim intervalima sve dok izmerena vrednost nije opala ispod zadate granice od 0,155.



Slika 18. Spektrofotometar Cintra 6 (GBC)

3.5. Određivanje odnosa stabilnih izotopa ugljenika

Izolovanje proteina iz uzoraka meda izvedeno je u skladu sa zvaničnom AOAC 998.12 (1999) metodom, uz modifikacije opisane kod Vasić i saradnika^{136, 137}. Uzorak meda mase oko 10–12 g kvantitativno je prenet u kivetu za centrifugiranje i rastvoren u 4 mL ultračiste vode, uz kontinualno mešanje do potpune homogenizacije. U cilju taloženja proteina rastvoru je dodato 2 mL vodenog rastvora natrijum–volframata (masenog udela 10%) i 2 mL rastvora sumporne kiseline (koncentracije 0,335 mol/L). Nakon izdvajanja flokula, kivete su dopunjene ultračistom vodom. Suspenzija je homogenizovana primenom vorteks mešalice (RX3 Vortex Mixer, *VELP Scientifica*, Usmate Velate, Italija) u trajanju od 1 min, a zatim inkubirana u vodenom kupatilu na 80 °C do pojave vidljivih heterogenih koagulata. Nakon toga, dobijena smeša je centrifugirana pri 1500 min⁻¹ tokom 5 minuta (Centrifuge SL16, *Thermo Fisher Scientific*, Osterode am Harc, Nemačka), pri čemu je supernatant pažljivo dekantovan i odbačen. Postupak ispiranja taloga dodatkom po 50 mL ultračiste vode i naknadnog centrifugiranja ponovljen je pet puta, sve do dobijanja potpuno bistrog supernatanta. Izolovani proteinski precipitat sušen je u sušnici (ST-05, *Instrumentaria*, Zagreb, Hrvatska) na 80 °C tokom noći.

Odnos stabilnih izotopa ugljenika u uzorku meda i izolovanoj proteinskoj frakciji određen je primenom masene spektrometrije odnosa stabilnih izotopa spregnute sa elementalnim analizatorom (EA–IRMS). Merenja su sprovedena na masenom spektrometru Delta V Plus (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Nemačka) koji je preko interfejsa ConFlo IV spregnut sa elementalnim analizatorom Flash 2000 (*Thermo Fisher Scientific*; Slika 19). Analiza je urađena u skladu sa AOAC 998.12 metodom, uz modifikacije opisane kod Vasić i saradnika^{136, 137}. Odvage od oko 0,2 do 0,6 mg meda i izolovane proteinske frakcije, odmerene su direktno u kalajne kapsule (5 × 3,5 mm). Kapsule su potom hermetički zatvorene preklapanjem i presovane radi potpunog istiskivanja vazduha. Ovako pripremljeni uzorci pozicionirani su u autosampler elementalnog analizatora. U procesu sagorevanja uzoraka nastaje ugljen–dioksid (CO₂), a detektovanje i izračunavanje izotopskog odnosa vršeni su praćenjem jonskih struja pri *m/z* vrednostima 44, 45 i 46. Sve analize su sprovedene u dva nezavisna ponavljanja u okviru istog analitičkog ciklusa.



Slika 19. Sistem za određivanje odnosa stabilnih izotopa spregnut sa elemental analizatorom EA–IRMS (*Thermo Electron Corporation*)

3.6. Profil šećera

3.6.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih uslova za analizu profila šećera obuhvatila je definisanje optimalnog sastava i gradijentnog programa mobilne faze. Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode (eluent A) i degaziranog rastvora natrijum–hidroksida koncentracije 300 mmol/L (eluent B). Protok mobilne faze održavan je konstantno na 0,7 mL/min tokom celokupne analize. Pre svakog injektovanja hromatografski sistem je kondicioniran početnim sastavom mobilne faze primenjenog programa u trajanju od 20 minuta. Ispitivani su sledeći gradijentni programi:

Program 1: 0,0–5,0 min (85% A, 15% B); 5,0–5,5 min (85 → 83% A, 15 → 17% B); 5,5–12,0 min (83% A, 17% B); 12,0–12,5 min (83 → 80% A, 17 → 20% B); 12,5–18,0 min (80% A, 20% B); 18,0–18,5 min (80 → 70% A, 20 → 30% B); 18,5–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 → 60% A, 30 → 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B).

Program 2: 0,0–4,0 min (82% A, 18% B); 4,0–4,1 min (82 → 78% A, 18 → 22% B); 4,1–18,0 min (78% A, 22% B); 18,0–18,5 min (78 → 70% A, 22 → 30% B); 18,5–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 → 60% A, 30 → 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B); 35,0–35,1 min (60 → 82% A, 40 → 18% B).

Program 3: 0,0–3,0 min (85% A, 15% B); 3,0–18,0 min (75% A, 25% B); 18,0–18,5 min (75 → 70% A, 25 → 30% B); 18,5–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 → 60% A, 30 → 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B); 35,0–35,1 min (60 → 85% A, 40 → 15% B).

Program 4: 0,0–2,5 min (82% A, 18% B); 2,5–3,0 min (82 → 75% A, 18 → 25% B); 3,0–18,0 min (75% A, 25% B); 18,0–18,5 min (75 → 70% A, 25 → 30% B); 18,5–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 → 60% A, 30 → 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B); 35,0–35,1 min (60 → 82% A, 40 → 18% B).

Program 5: 0,0–18,0 min (75% A, 25% B); 18,0–18,5 min (75 → 70% A, 25 → 30% B); 18,5–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 → 60% A, 30 → 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B); 35,0–35,1 min (60 → 75% A, 40 → 25% B).

Program 6: 0,0–3,0 min (75% A, 25% B); 3,0–3,1 min (75 → 70% A, 25 → 30% B); 3,1–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 → 60% A, 30 → 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B); 35,0–35,1 min (60 → 75% A, 40 → 25% B).

Program 7: 0,0–1,0 min (75 → 65% A, 25 → 35% B); 1,0–24,9 min (65% A, 35% B); 24,9–25,0 min (65 → 60% A, 35 → 40% B); 25,0–35,0 min (60% A, 40% B); 35,0–35,1 min (60 → 75% A, 40 → 25% B).

Na osnovu komparativne analize dobijenih hromatograma utvrđeno je da gradijentni Program 4 obezbeđuje optimalnu rezoluciju pojedinačnih šećera. Shodno tome, navedeni gradijent usvojen je za sva dalja hromatografska određivanja, dok je detaljna diskusija o optimizacionim parametrima prikazana u poglavlju „Rezultati i diskusija“.

3.6.2. Validacija metode

Validacija razvijene HPAEC–PAD metode za određivanje profila šećera obuhvatila je ispitivanje sledećih parametara: linearnosti, granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ), tačnosti (procena analitičkog prinosa) i preciznosti (ponovljivost i reproduktivnost), u skladu sa *Eurachem* vodičem (eng. *Eurachem guides*, <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>) i protokolima Nordijsko–Baltičkog komiteta za analizu hrane (NMKL protokol br. 6) (eng. *Nordic–Baltic Committee on Food Analysis*, vodič za razvoj metoda, <https://www.nmkl.org/resources/method-development/>)^{138–141}.

Linearnost metode evaluirana je primenom metode linearne regresije, analizom zavisnosti integraljene površine hromatografskih pikova od koncentracije za pet tačaka kalibracione krive. Tačnost metode utvrđena je određivanjem analitičkog prinosa, spajkovanjem. Uzorci meda mase 2,0 g razblaženi su u 20 mL ultračiste vode, nakon čega su obogaćeni standardnim rastvorima pojedinačnih šećera na tri nivoa koncentracije (75%, 100% i 125% u odnosu na ciljnu koncentraciju). Za svaki nivo dodatka sprovedeno je šest nezavisnih merenja ($n = 6$), ukupno 18 merenja po nivou. Na osnovu odnosa površina pikova neobogaćenih i obogaćenih uzoraka, izračunati su analitički prinosi, standardna devijacija i relativna standardna devijacija^{122, 138–141}.

Preciznost metode (ponovljivost i reproduktivnost) procenjena je kroz seriju ponovljenih merenja istog uzorka meda. Ponovljivost (RSD_r) i reproduktivnost (RSD_R) određene su analizom tri nezavisna merenja istog uzorka tokom tri uzastopna dana (šest ponavljanja dnevno, ukupno 18 merenja). Preciznost je iskazana kroz vrednosti RSD_r , RSD_{R-H} i Horvicov (Horwitz) odnos (HorRat) za svaki identifikovani šećer^{122, 138–141}.

Kalibracioni rastvori pripremljeni su iz osnovnih (*štok*) standardnih rastvora (1000 mg/L) glukoze, fruktoze, saharoze, trehaloze, turanoze, melibioze, maltoze, izomaltoze, erloze, melezitoe, rafinoze i gentiobioze. Za glukozu i fruktozu kalibracioni opseg iznosio je 20–100 mg/L, dok je za ostale šećere primenjen opseg od 1–20 mg/L. Pripremljene kalibracione serije injektovane su u sistem za jonsku hromatografiju radi definisanja analitičkih karakteristika metode.

3.6.3. Analiza profila šećera

Priprema uzoraka za određivanje profila šećera obuhvatila je odmeravanje oko 2,0 g meda i rastvaranje u 20 mL ultračiste vode. Dobijeni rastvor kvantitativno je prenet u odmerni sud zapremine 100 mL i dopunjen ultračistom vodom do crte. Alikvot rastvora proceden je kroz najlonski filter poroznosti 0,22 μm i korišćen kao osnovni rastvor za dalja razblaživanja. Za određivanje sadržaja glukoze i fruktoze osnovni rastvor je razblažen 100 puta (1 mL rastvora dopunjen do 100 mL ultračistom vodom), dok je za određivanje profila oligosaharida primenjeno razblaženje 25 puta (2 mL rastvora dopunjeno do 50 mL). Pripremljeni uzorci preneti su u kivete (vijale) i autosamplerom injektovani u sistem za jonsku hromatografiju.

Identifikacija i kvantifikacija šećera sprovedena je primenom sistema za visokoefikasnu anjonsko–izmenjivačku hromatografiju sa pulsno–amperometrijskom detekcijom (HPAEC–PAD) Dionex ICS 3000 (Dionex, Sanivejl, Kalifornija, SAD; Slika 20). Hromatografski sistem činili su: kvaternarna gradijentna pumpa, zaštitna kolona (pretkolona) CarboPac PA100 (4 $\times$ 50 mm, *guard*), analitička kolona CarboPac PA100 (4 $\times$ 250 mm) termostatorirana na 30 °C, autosampler sa injekcionom petljom zapremine 25 μL i elektrohemijski pulsno–amperometrijski detektor. Detektorski sistem obuhvatao je Ag/AgCl referentnu elektrodu i radnu zlatnu elektrodu, uz primenu standardizovanog pulsno–amperometrijskog programa za detekciju ugljenih hidrata (*carbohydrates standard quad*). Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode (eluent A) i degaziranog rastvora natrijum–hidroksida koncentracije 300 mmol/L (eluent B), uz protok od 0,7 mL/min. Primenjen je sledeći gradijentni program: 0,0–2,5 min (82% A, 18% B); 2,5–3,0 min (82 $\rightarrow$ 75% A, 18 $\rightarrow$ 25% B); 3,0–18,0 min (75% A, 25% B); 18,0–18,5 min (75 $\rightarrow$ 70% A, 25 $\rightarrow$ 30% B); 18,5–25,0 min (70% A, 30% B); 25,0–25,5 min (70 $\rightarrow$ 60% A, 30 $\rightarrow$ 40% B); 25,5–35,0 min (60% A, 40% B). Pre svakog injektovanja, hromatografski sistem je kondicioniran s početnim sastavom mobilne faze (82% A, 18% B) tokom 20 minuta. Softverski paket Hromeleon (*eng. Chromeleon*, verzija 6.7) korišćen je za prikupljanje i obradu podataka. Sadržaj šećera izražen je u jedinicama g/100 g meda. Sva merenja sprovedena su u dva nezavisna ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost sa pridruženom mernom nesigurnošću.



Slika 20. Sistem za jonsku hromatografiju Dionex ICS 3000 (*Dionex*)

3.6.4. Kvalitativna analiza profila šećera primenom visokoefikasne tankoslojne hromatografije

Priprema uzoraka za kvalitativnu analizu šećera podrazumevala je rastvaranje 1,0 g meda, odnosno sirupa, u 10 mL ultračiste vode. Uzorci sirupa su nakon rastvaranja dodatno razblaženi 10 puta (finalna koncentracija 1% w/v). Svi ekstrakti filtrirani su kroz najlonske membranske filtere poroznosti 0,45 μm pre nanošenja na staklene ploče silika–gela.

Kao derivatizaciono sredstvo za vizuelizaciju ugljenih hidrata korišćen je anilin–difenilamin–fosforna kiselina reagens (DPA reagens). Reagens je pripremljen rastvaranjem 2 g difenilamina i 2 mL anilina u 100 mL acetona uz pažljivo dodavanje 10 mL fosforne kiseline uz konstantno mešanje do postizanja potpune homogenosti. Pripremljeni reagens skladišten je u tamnoj staklenoj ambalaži na temperaturi od $-20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ¹⁸.

Hromatografsko razdvajanje izvedeno je na aluminijumskim HPTLC pločama prevučenim silika–gelom 60 (Art. 105548, $20 \times 10\text{ cm}$, *Merck*, Darmštat, Nemačka). Nanošenje uzoraka (0,5 μL za ekstrakte meda; 0,7 μL za ekstrakte sirupa) vršeno je primenom uređaja za automatsko nanošenje Linomat 5 (*CAMAG*, Mutenc, Švajcarska, Slika 21). Uzorci su naneti u obliku traka širine 6 mm, na udaljenosti od 8 mm od donje ivice ploče i 10 mm od bočnih ivica. Razvijanje hromatograma sprovedeno je u staklenoj kadi za razdvajanje ($20 \times 10\text{ cm}$) prethodno zasićenoj parama mobilne faze (sistem acetonitril/voda/sirćetna kiselina u odnosu 7:2,5:0,5, v/v/v) tokom 15 minuta. Nakon završetka razvijanja i sušenja ploča u struji vazduha, izvršena je derivatizacija uranjanjem u DPA reagens primenom uređaja za uranjanje (Chromatogram immersion device, *CAMAG*). Ploče su termostatisane na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 5 minuta radi vizuelizacije razdvojenih zona. Snimanje slike hromatograma je izvršeno pod vidljivim svetlom pomoću mobilnog telefona (Samsung S21, Samsung Electronics), opremljenog kamerom od 64 megapiksela, i sačuvano u JPEG formatu za dalju obradu.



Slika 21. Sistem za visokoefikasnu tankoslojnu hromtografiju (*CAMAG*)

Kvalitativna analiza profila šećera u ekstraktima meda sprovedena je i visokoefikasnom anjonsko–izmenjivačkom hromatografijom, uz modifikaciju procedure opisane u odeljku 3.6.3. Mobilna faza sastojala se iz ultračiste vode (eluent A), degaziranog rastvora natrijum–hidroksida (300 mmol/L, eluent B) i degaziranog rastvora natrijum–acetata (500 mmol/L, eluent C). Protok mobilne faze održavan je konstantno na 0,7 mL/min. Primenjen je gradijentni program preuzet iz studije Lazarević K.¹⁴²: 0,0–5,0 min: 85% A, 15% B, 0% C, 5,0–12,0 min: 83% A, 15% B, 2% C, 12,0–20,0 min: 81% A, 15% B, 4% C i 20,0–30,0 min: 60% A, 20% B, 20% C. Pre svakog injektovanja, hromatografski sistem je kondicioniran sa početnim sastavom mobilne faze (85% A, 15% B, 0% C) tokom 20 minuta.

3.7. Profil organskih kiselina

3.7.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih uslova za određivanje profila organskih kiselina obuhvatila je definisanje optimalnog gradijentnog programa mobilne faze. Mobilna faza se sastojala od ultračiste vode i kalijum–hidroksida generisanog *in situ* primenom eluent–generatora. Protok kroz hromatografski sistem održavan je konstantno na 1,0 mL/min. Ispitivani su sledeći gradijentni programi menjanja koncentracije KOH:

Program 1: 0,0–13,75 min (25 mmol/L KOH); 13,75–15,0 min (25 → 30 mmol/L KOH); 15,0–25,0 min (30 mmol/L KOH); 25,0–30,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 30,0–46,0 min (50 mmol/L KOH); 46,0–51,0 min (50 → 25 mmol/L KOH); 51,0–60,0 min (25 mmol/L KOH).

Program 2: 0,0–12,9 min (10 mmol/L KOH); 12,9–13,0 min (10 → 25 mmol/L KOH); 13,0–17,9 min (25 mmol/L KOH); 17,9–18,0 min (25 → 30 mmol/L KOH); 18,0–25,0 min (30 mmol/L KOH); 25,0–30,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 30,0–65,0 min (50 mmol/L KOH); 65,0–70,0 min (50 → 10 mmol/L KOH).

Program 3: 0,0–15,0 min (10 mmol/L KOH); 15,0–17,9 min (10 → 30 mmol/L KOH); 17,9–25,0 min (30 mmol/L KOH); 25,0–30,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 30,0–55,0 min (50 mmol/L KOH); 55,0–60,0 min (50 → 10 mmol/L KOH); 60,0–70,0 min (10 mmol/L KOH).

Program 4: 0,0–0,1 min (25 mmol/L KOH); 0,1–1,0 min (25 → 5 mmol/L KOH); 1,0–16,0 min (5 mmol/L KOH); 16,0–19,0 min (5 → 30 mmol/L KOH); 19,0–27,0 min (30 mmol/L KOH); 27,0–30,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 30,0–55,0 min (50 mmol/L KOH); 55,0–60,0 min (50 → 25 mmol/L KOH).

Program 5: 0,0–0,5 min (25 → 10 mmol/L KOH); 0,5–15,0 min (10 mmol/L KOH); 15,0–18,0 min (10 → 30 mmol/L KOH); 18,0–26,0 min (30 mmol/L KOH); 26,0–30,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 30,0–55,0 min (50 mmol/L KOH); 55,0–60,0 min (50 → 25 mmol/L KOH); 60,0–70,0 min (25 mmol/L KOH).

Program 6: 0,0–0,5 min (25 → 10 mmol/L KOH); 0,5–16,0 min (10 mmol/L KOH); 16,0–18,0 min (10 → 30 mmol/L KOH); 18,0–29,0 min (30 mmol/L KOH); 29,0–32,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 32,0–58,0 min (50 mmol/L KOH); 58,0–60,0 min (50 → 25 mmol/L KOH); 60,0–70,0 min (25 mmol/L KOH).

Program 7: 0,0–0,5 min (25 → 10 mmol/L KOH); 0,5–12,5 min (10 mmol/L KOH); 12,5–17,0 min (10 → 25 mmol/L KOH); 17,0–30,0 min (25 mmol/L KOH); 30,0–35,0 min (25 → 50 mmol/L KOH); 35,0–55,0 min (50 mmol/L KOH); 55,0–60,0 min (50 → 25 mmol/L KOH); 60,0–70,0 min (25 mmol/L KOH).

Na osnovu komparativne analize hromatograma utvrđeno je da gradijentni Program 6 obezbeđuje optimalno razdvajanje pojedinačnih organskih kiselina. Sva dalja određivanja sprovedena su primenom ovog gradijenta, dok je detaljna diskusija o parametrima optimizacije prikazana u poglavlju „Rezultati i diskusija“.

3.7.2. Validacija metode

Validacija metode određivanja profila organskih kiselina urađena je po proceduri opisanoj u odeljku 3.6.2. Za potrebe kvantifikacije korišćeni su osnovni (*štok*) standardni rastvori, pripremljeni rastvaranjem referentnih standarda organskih kiselina (limunska, izolimunska, maleinska, jabučna, kininska, šikiminska, glukuronska, galakturonska i čilibarna kiselina) u ultračistoj vodi, tako da je finalna koncentracija svakog osnovnog rastvora iznosila 1000 mg/L. U cilju pravljenja standardne serije i konstrukcije kalibracione prave osnovni rastvori su sukcesivno razblaživani. Za kininsku i šikiminsku kiselinu primenjen je kalibracioni opseg od 4 do 40 mg/L, za limunsku kiselinu opseg od 10 do 100 mg/L, dok su radni standardni rastvori preostalih ispitivanih kiselina pripremljeni u koncentracionom opsegu od 1 do 10 mg/L. Ovako pripremljene serije radnih standardnih rastvora injektovane su u sistem za jonsku hromatografiju radi definisanja validacionih parametara metode.

3.7.3. Analiza profila organskih kiselina

Priprema uzoraka za određivanje profila organskih kiselina obuhvatila je odmeravanje oko 2,5 g meda i rastvaranje u ultračistoj vodi. Dobijeni rastvor kvantitativno je prenet u odmerni sud zapremine 25 mL i dopunjen ultračistom vodom do crte. Dobijeni rastvor je zatim profiltriran kroz najlonski membranski filter poroznosti 0,22 µm, direktno u kivete i pomoću autosamplera injektovan u injekcionu petlju jonskog hromatografa.

Identifikacija i kvantifikacija organskih kiselina u ekstraktima meda sprovedene su primenom sistema za visokoeфикаsnu jonoizmenjivačku hromatografiju (jonsku hromatografiju) – Dionex ICS 3000 (Dionex, Sanivejl, Kalifornija, SAD; Slika 20). Hromatografski sistem činili su: izokratska pumpa, eluent-generator za *in situ* generisanje kalijum-hidroksida (EGC III KOH RFIC), zaštitna pretkolona IonPac AG15 (4 × 50 mm) za dodatno uklanjanje interferencija, analitička kolona IonPac AS15 (4 × 250 mm) termostatorana na 30 °C, autosampler sa injekcionom petljom zapremine 10 µL, samoregenerišući supresor (ASRS 600, Dionex) i konduktometrijski detektor. Radna struja supresora bila je automatski prilagođena trenutnoj koncentraciji kalijum-hidroksida u eluentu. Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode i *in situ* generisanog KOH, čija je koncentracija varirala od 10 do 50 mmol/L. Protok kroz hromatografski sistem održavan je konstantno na 1,0 mL/min, uz primenu sledećeg optimizovanog gradijentnog programa: 0,0–0,5 min (25 → 10 mmol/L KOH); 0,5–16,0 min (10 mmol/L KOH); 16,0–18,0 min (10 → 30 mmol/L KOH); 18,0–29,0 min (30 mmol/L KOH); 29,0–32,0 min (30 → 50 mmol/L KOH); 32,0–58,0 min (50 mmol/L KOH); 58,0–60,0 min (50 → 25 mmol/L KOH); 60,0–70,0 min (25 mmol/L KOH). Softverski paket Hromeleon (verzija 6.7) korišćen je za prikupljanje i obradu podataka. Sadržaj svih razdvojenih i kvantifikovanih organskih kiselina izražen je u jedinicama mg/kg meda. Sva određivanja sprovedena su u dva nezavisna ponavljanja, a finalni rezultati su prikazani kao srednja vrednost sa pridruženom mernom nesigurnošću.

3.8. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza dobijenih rezultata obuhvatila je izračunavanje parametara deskriptivne statistike, primenu analize varijansi i Šefeovog *post hoc* testa, digitalnu obradu slika hromatograma uz prevođenje u matrice podataka, multivarijantnu analizu na osnovu fizičko-hemijskih parametara, izotopskog odnosa ugljenika, profila šećera i organskih kiselina, kao i matrice dobijene obradom slike hromatograma.

Izračunavanje parametara deskriptivne statistike i njihovo grafičko predstavljanje izvedeno je u programu *Microsoft Office Excel* (programski dodatak Analysis toolpack, *Microsoft Corporation*, Redmond, SAD). Za analizu varijanse i Šefeov *post hoc* test korišćen je softverski paket IBM SPSS Statistics 20 (*IBM Corp.*, Armonk, Njujork, SAD). U cilju sagledavanja detaljnije strukture podataka, identifikovanja obrazaca grupisanja i utvrđivanja specifičnosti objekata urađena je multivarijantna analiza korišćenjem softvera MATLAB 7.12.0 (R2011a) (*MathWorks INC*, Masačusets, SAD). Analiza glavnih komponentata (PCA) i parcijalna regresija najmanjih kvadrata sa diskriminantnom

analizom (PLS–DA) sprovedene su primenom programskog dodatka PLS ToolBox, v.6.2.1 statističkog paketa MATLAB (*Eigenvector Research, Inc.*). Prisustvo spoljašnjih vrednosti (odstupajućih opservacija, *eng. outliers*) tokom PCA analize evaluirano je na osnovu Hotellingove (Hotelling) T^2 i Q –statistike, uz nivo značajnosti od 95%. Klasifikacioni PLS–DA modeli razvijeni su korišćenjem SIMPLS algoritma. Optimalna složenost i pouzdanost PLS–DA modela osigurana je primenom četvorostruke unakrsne validacije (*eng. Cross–Validation, CV*) zasnovane na metodi „venecijanera” (*eng. Venetian blinds*). Pre izvođenja multivarijantne analize svi podaci su autoskalirani. Procena kvaliteta dobijenih modela vršena je na osnovu koeficijenata determinacije za kalibraciju (R^2_{cal}), unakrsnu validaciju (R^2_{cv}) i predikciju (R^2_{pred}), kao i na osnovu odgovarajućih grešaka modela: kvadratnog korena srednje greške kalibracije (RMSEC), unakrsne validacije (RMSECV) i predikcije (RMSEP).

Digitalna obrada slika HPTLC hromatograma urađena je u programu ImageJ. Dobijene varijable su predstavljene kao intenziteti signala (izražene u pikselima) u funkciji rastojanja (R_F vrednosti) za svaki uzorak ponaosob. Predtretman hromatografskih signala, sproveden primenom algoritama implementiranih u softverskom paketu PLS ToolBox, v.6.2.1 statističkog paketa MATLAB, obuhvatao je poravnanje, normiranje i centriranje podataka. Poravnanje signala, izvedeno je primenom metode korelacije optimizacije savijanja, normiranje korišćenjem standardne normalne promenljive, dok je za centriranje odabrano srednje centriranje.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija obuhvata razvoj, optimizaciju i unapređenje metoda visokoefikasne tečne hromatografije sa ciljem preciznije i pouzdanije procene autentičnosti meda različitog biljnog porekla. U okviru istraživanja analizirani su uzorci pet biljnih vrsta meda: bagremov, lipov i suncokretov med, med od uljane repice i medljikovac.

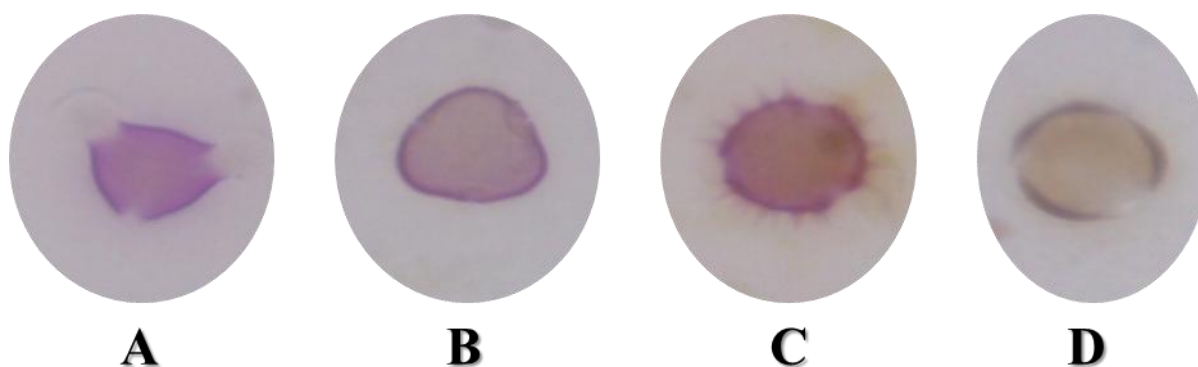
U cilju utvrđivanja biljnog porekla i potvrde autentičnosti prikupljenih uzoraka meda istraživanje je započeto sprovođenjem melizopalinološke analize kojom je preliminarno definisano biljno poreklo. Ova analiza je omogućila klasifikaciju uzoraka na osnovu prisustva karakterističnih polenovih zrna i bila je osnov za dalju ocenu autentičnosti. Nakon toga je pristupljeno određivanju fizičko–hemijskih parametara u skladu sa Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela ², čime je izvršena dodatna karakterizacija uzoraka. Konačna potvrda autentičnosti sprovedena je određivanjem odnosa stabilnih izotopa ugljenika meda i izolovanog proteina, standardnom AOAC 998.12 metodom, koja omogućava detekciju potencijalnog krivotvorenja dodatkom egzogenih šećera i šećernih sirupa poreklom od C4 biljaka ¹⁴³.

Druga faza istraživanja uključila je analizu profila šećera i organskih kiselina autentičnog seta podataka metodom visokoefikasne tečne hromatografije – jonske hromatografije, a u cilju identifikovanja karakterističnih hemijskih markera specifičnih za svaku ispitivanu biljnu vrstu meda.

U okviru istraživanja primenjena je i visokoefikasna tankoslojna hromatografija za razdvajanje i profilisanje šećera u uzorcima meda, sa ciljem brze procene mogućeg prisustva egzogenih šećera, posebno onih poreklom od C4 biljaka. Dobijeni hromatografski profili upoređeni su sa rezultatima dobijenim visokoefikasnom anjonsko–izmenjivačkom tečnom hromatografijom i analizom odnosa stabilnih izotopa ugljenika u medu i izolovanom proteinu. Ovaj pristup omogućava efikasno skrining (eng. *screening*) testiranje koje može poslužiti kao brza preliminarna metoda za detekciju dodataka različitih egzogenih šećera, šećernih sirupa i potencijalnog krivotvorenja. Kombinovanjem analitičkih tehnika sa hemometrijskim metodama unapređena je procena autentičnosti meda.

4.1. Melizopalinološka analiza

Biljno poreklo dostavljenih uzoraka monoflornih medova verifikovano je primenom melizopalinološke analize. Na osnovu identifikovanja i kvantifikovanja karakterističnih polenovih zrna specifičnih za određene biljne vrste, uzorci su klasifikovani prema dominantnom biljnom izvoru nektara. U okviru analize 138 uzoraka meda (Tabela 6), identifikovano je prisustvo polena 38 biljnih vrsta koje pripadaju različitim taksonomskim familijama, uključujući: Fabaceae, Rosaceae, Fagaceae, Asteraceae, Salicaceae, Poaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Tiliaceae, Apiaceae, Geraniaceae, Compositae, Fumariaceae, Ericaceae, Chenopodiaceae, Polygonaceae, Cannabaceae, Betulaceae, Hydrophyllaceae, Simaroubaceae, Balsaminaceae i Lamiaceae ¹⁴⁴. Određivanje biljnog porekla svakog uzorka zasnovano je na morfološkim karakteristikama i prisustvu specifičnih formi polena (Slika 22) ^{133, 134, 144–149}. Na osnovu dobijenih rezultata, potvrđena su sledeća dominantna biljna porekla meda: bagremov (*Robinia pseudoacacia*, 74 uzorka), lipov (*Tilia cordata*, 18 uzoraka), suncokretov (*Helianthus annuus*, 10 uzoraka), uljana repica (*Brassica napus*, 10 uzoraka).

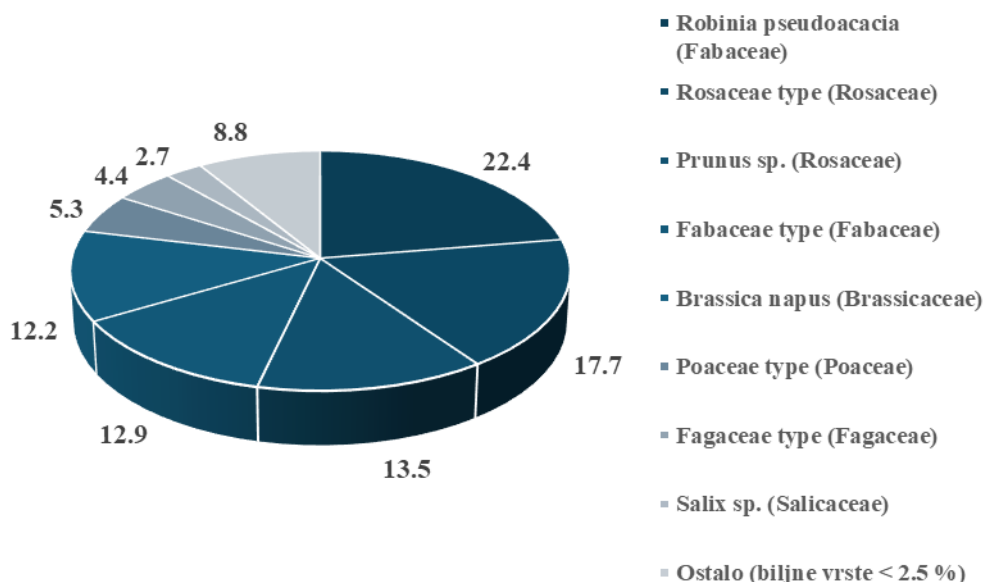


Slika 22. Izgled polenovog zrna karakterističnog za biljnu vrstu: A) Bagrem B) Lipa C) Suncokret D) Uljana repica

4.1.1. Bagremov med

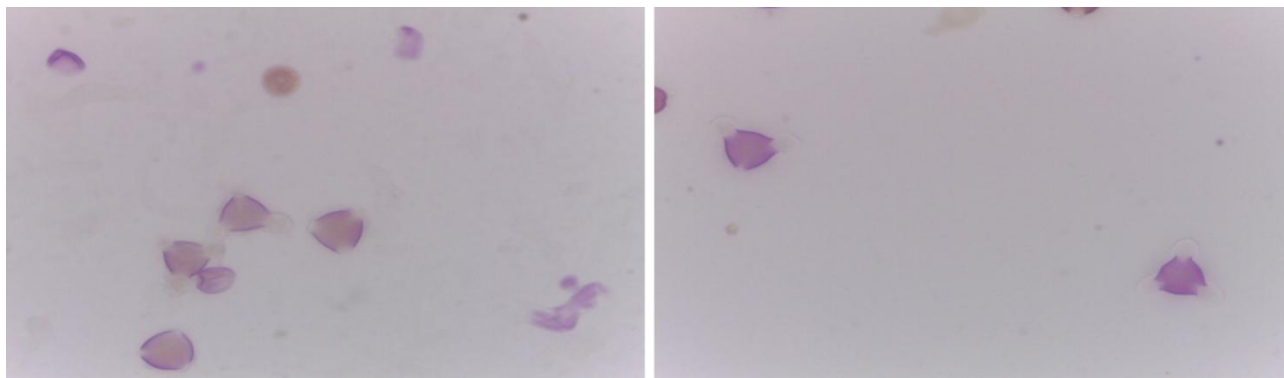
Prema odredbama Pravilnika o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela Republike Srbije ², minimalni udeo polenovih zrna vrste *Robinia pseudoacacia* u nerastvornom delu meda mora iznositi najmanje 20% kako bi se mogao klasifikovati kao monoflorni bagremov med.

Svi analizirani uzorci bagremovog meda (Prilog 1, uzorci B1 – B74) imali su sadržaj polenovih zrna bagrema iznad 20%, što ukazuje na validnost oznake njihovog biljnog porekla kao monoflornog bagremovog meda. Osim prisustva karakterističnih polenovih zrna bagrema, u nerastvornom delu ovih uzoraka bila su prisutna i polenova zrna vrsta Rosaceae, *Prunus sp.*, Fabaceae, *Brassica napus*, Poaceae, Fagaceae i *Salix sp.*, dok je ukupan udeo polenovih zrna vrsta koje su pojedinačno bile zastupljene sa manje od 2,5% u odnosu na ukupni broj identifikovanih polenovih zrna iznosio zbirno oko 8,8% (Slika 23).



Slika 23. Relativna zastupljenost dominantnih polenovih zrna uzoraka bagremovog meda

Prosečan sadržaj polenovih zrna vrste *Robinia pseudoacacia* u analiziranim uzorcima iznosio je 22,4%, što odgovara podacima iz literature ^{144, 146–149, 151}. Morfološke karakteristike polenovih zrna posmatrane mikroskopom (Slika 24) takođe su bile u saglasnosti sa opisima koje navode prethodni autori, potvrđujući tipična morfološka svojstva ove biljne vrste ^{149, 151}.

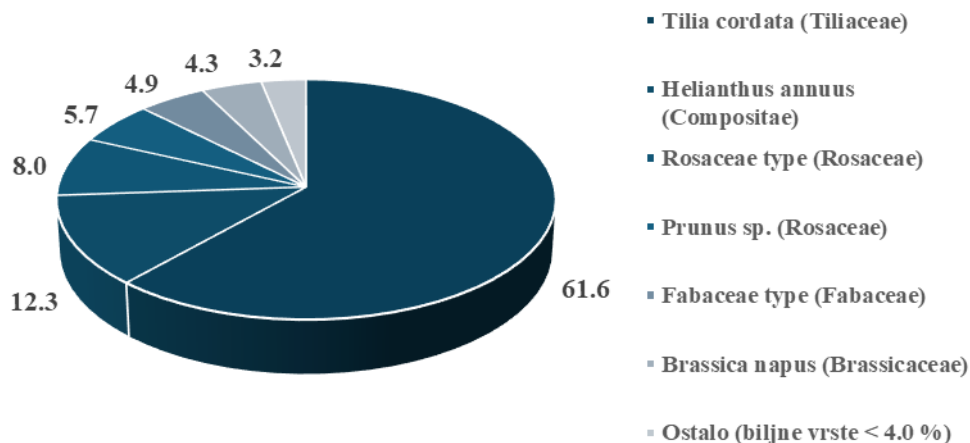


Slika 24. Mikroskopski prikaz polenovih zrna iz dva različita polja uzorka bagremovog meda

4.1.2. Lipov med

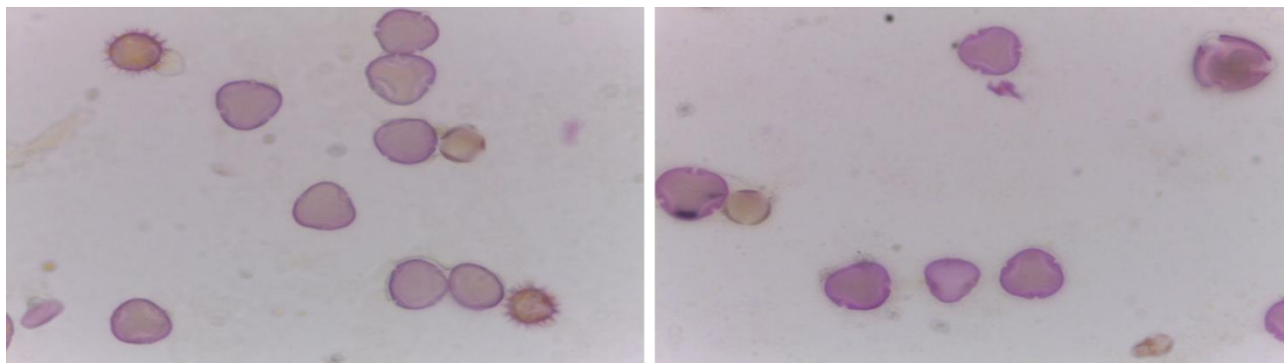
Na osnovu odredbi Pravilnika o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela Republike Srbije ², med se može klasifikovati kao monoflorni lipov med ukoliko u njegovom nerastvornom delu sadržaj polenovih zrna vrste *Tilia cordata* (lipa) iznosi najmanje 25%, odnosno najmanje 15% u slučajevima kada su jasno izražena karakteristična senzorna svojstva tipična za ovu vrstu meda (miris, ukus i boja).

Svi analizirani uzorci lipovog meda (Prilog 1, L1 – L18) imali su sadržaj polenovih zrna lipe iznad 25%, što ukazuje na validnost oznake njihovog biljnog porekla kao monoflornog lipovog meda. Osim prisustva karakterističnih polenovih zrna lipe, u nerastvornom delu ovih uzoraka bila su prisutna i polenova zrna vrsta *Helianthus annuus*, Rosaceae, *Prunus sp.*, Fabaceae, *Brassica napus*, dok je ukupan udeo polenovih zrna vrsta koje su pojedinačno bile zastupljene sa manje od 4,0% u odnosu na ukupni broj identifikovanih polenovih zrna, iznosio zbirno oko 3,2% (Slika 25).



Slika 25. Relativna zastupljenost dominantnih polenovih zrna uzoraka lipovog meda

Prosečan sadržaj polenovih zrna vrste *Tilia cordata* u analiziranim uzorcima iznosio je 61,6%, što odgovara podacima iz literature ¹⁵². Morfološke karakteristike polenovih zrna (Slika 26), takođe su bile u skladu sa opisima navedenim od strane drugih autora ^{151, 152}, odnosno tipičnim morfološkim svojstvima ove biljne vrste.



Slika 26. Mikroskopski prikaz polenovih zrna iz dva različita polja uzorka lipovog meda

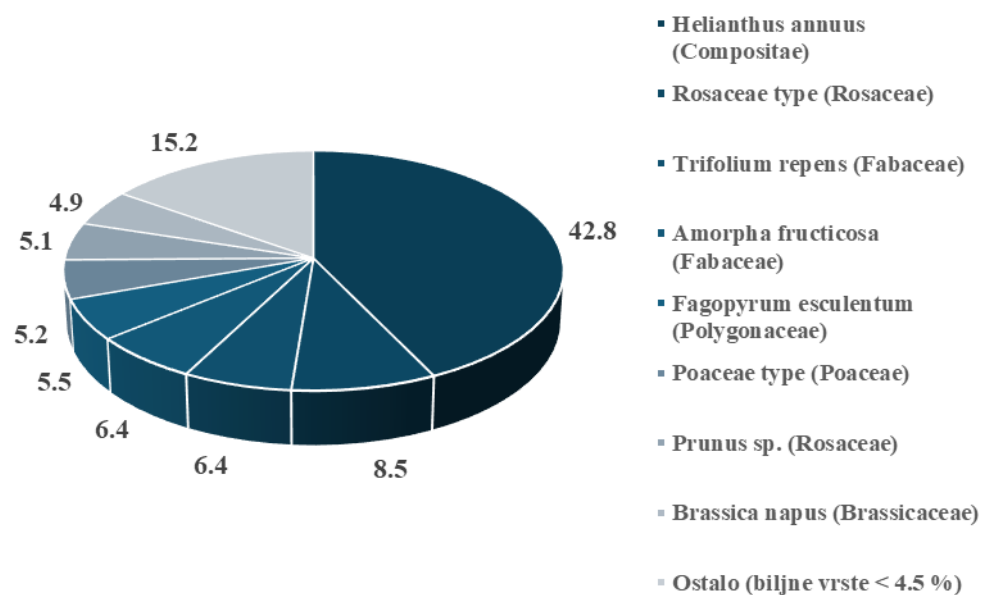
Uzorci L1 i L2, dobijeni od pčelara koji su koristili pčelinju pašu na području Fruške gore, sadržali su u proseku 90% polenovih zrna vrste *Tilia cordata*. Ovakav rezultat potvrđuje biljnu čistoću i autentičnost ovih uzoraka i u potpunosti je u saglasnosti sa zahtevima za dobijanje oznake zaštićenog geografskog porekla „Fruškogorski lipov med“. Naime, Fruškogorski lipov med karakterišu specifična svojstva koja proizilaze iz obimne i homogenizovane medonosne paše lipove šume na Fruškoj gori. Lipa, kao najzastupljenija i najznačajnija medonosna vrsta u ovom regionu, zauzima površinu od približno 12000 hektara. Proizvodnja ovog meda odvija se u okviru zaštićenog područja Nacionalnog parka Fruška gora, pri čemu se vrcanje meda vrši isključivo na lokaciji same paše, što dodatno doprinosi očuvanju njegovog karakterističnog sastava. Uslov za deklarisanje meda kao Fruškogorskog lipovog meda jeste sadržaj polenovih zrna lipe od najmanje 60%, pri čemu pojedini uzorci imaju i udeo veći od 90%, što ovaj proizvod čini jedinstvenim u pogledu biljne čistoće. Zahvaljujući specifičnim ekološkim, geografskim i tradicionalnim uslovima proizvodnje, fruškogorski lipov med nosilac je oznake zaštićenog geografskog porekla i predstavlja jedan od najvrednijih medova proizvedenih u Srbiji.

4.1.3. Suncokretov med

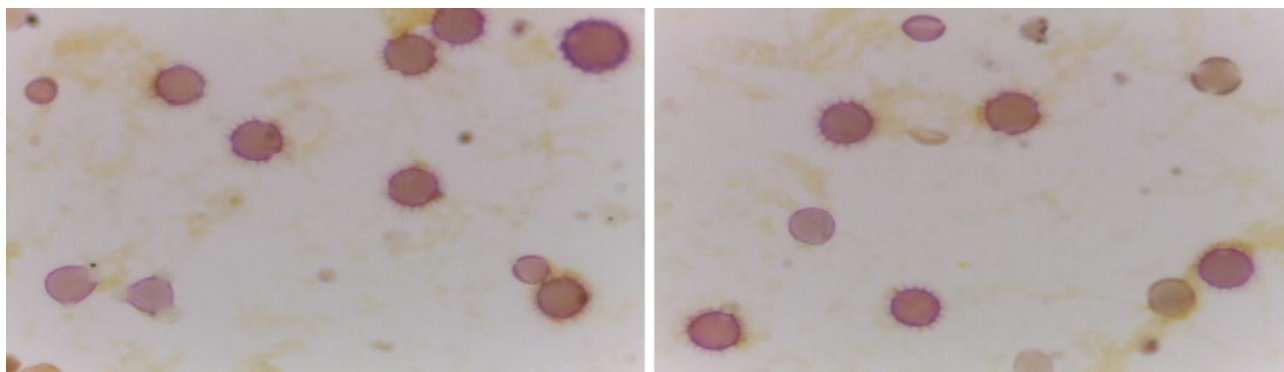
Prema važećim propisima ^{1, 2}, med se može klasifikovati kao monoflorni suncokretov med ukoliko sadržaj polenovih zrna vrste *Helianthus annuus* u njegovom nerastvornom delu iznosi najmanje 40%.

Svi analizirani uzorci suncokretovog meda (Prilog 1, S1 – S10) sadržali su više od 40% polenovih zrna vrste *Helianthus annuus*, što potvrđuje validnost njihovog biljnog porekla i klasifikaciju kao monoflorni suncokretov med. Pored karakterističnih polenovih zrna suncokreta, u nerastvorljivom delu ovih uzoraka identifikovana su i polenova zrna drugih biljnih vrsta, uključujući Rosaceae, *Trifolium repens*, *Amorpha fruticosa*, *Fagopyrum esculentum*, Poaceae i *Prunus sp.* Ukupan udeo polenovih zrna biljaka koje su pojedinačno bile zastupljene sa manje od 4,5% u odnosu na ukupni broj identifikovanih polenovih zrna iznosio je zbirno oko 15,2% (Slika 27).

Prosečan sadržaj polenovih zrna vrste *Helianthus annuus* u analiziranim uzorcima iznosio je 42,8%, što, zajedno sa njihovim morfološkim karakteristikama (Slika 28), odgovara navodima iz literature ^{151, 153}.



Slika 27. Relativna zastupljenost dominantnih polenovih zrna uzoraka suncokretovog meda



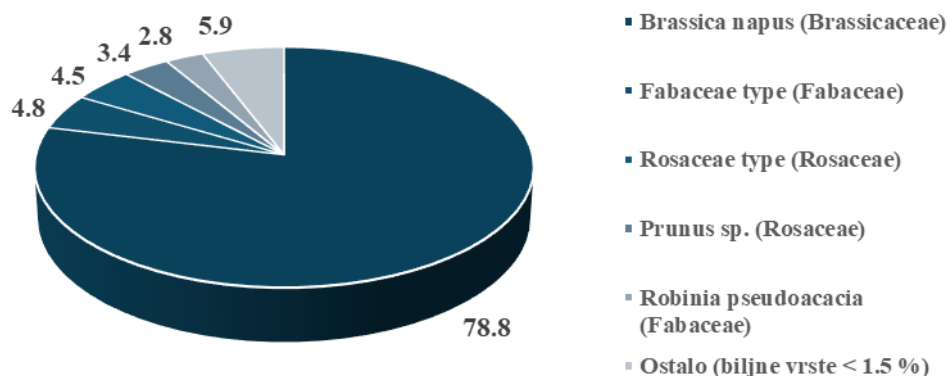
Slika 28. Mikroskopski prikaz polenovih zrna iz dva različita polja uzorka suncokretovog meda

4.1.4. Med od uljane repice

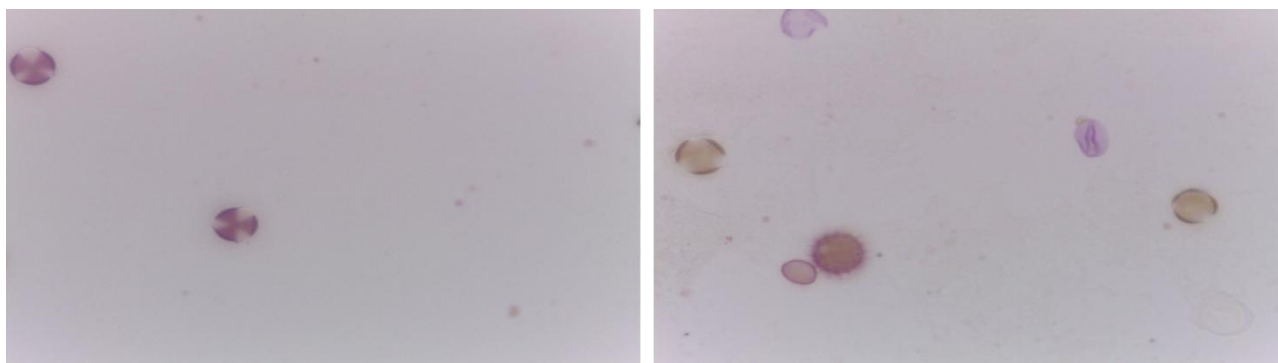
Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela Republike Srbije ², uslov za klasifikaciju meda od uljane repice kao monoflornog je sadržaj polenovih zrna vrste *Brassica napus* u njegovom nerastvornom delu od najmanje 60%.

Svi analizirani uzorci meda od uljane repice (Prilog 1, R1 – R10) sadržali su više od 60% polenovih zrna vrste *Brassica napus*, čime je potvrđena validnost njihove klasifikacije kao monoflornog meda od uljane repice. Pored karakterističnih polenovih zrna uljane repice, u nerastvorljivom delu ovih uzoraka identifikovana su i polenova zrna drugih biljnih vrsta, uključujući Fabaceae, Rosaceae, *Prunus* sp., *Robinia pseudoacacia*. Ukupan udeo polenovih zrna biljaka koje su pojedinačno bile zastupljene sa manje od 1,5% u odnosu na ukupni broj identifikovanih polenovih zrna iznosio je zbirno 5,9% (Slika 29).

Prosečan sadržaj polenovih zrna vrste *Brassica napus* u analiziranim uzorcima koji je iznosio 78,8% i njihove morfološke karakteristike (Slika 30) odgovaraju literaturnim navodima za monoflori med od uljane repice ^{151, 154, 155}.



Slika 29. Relativna zastupljenost dominantnih polenovih zrna uzoraka meda od uljane repice



Slika 30. Mikroskopski prikaz polenovih zrna iz dva različita polja uzorka meda od uljane repice

4.1.5. Medljikovac

Usled odsustva polenskih elemenata medonosnih biljaka, utvrđivanje biljnog porekla medljikovaca nije bilo moguće. Analizom 26 uzoraka medljikovca (Prilog 1, M1 – M26) detektovana su brojna karakteristična svojstva medljike, uključujući prisustvo spora plesni, hifa gljiva i algi, dok je identifikovani polen poticao od biljaka koje ne predstavljaju značajne izvore nektara^{156, 157}. Ovakav polenski profil je u skladu sa poznatim karakteristikama medljikovaca 2, 150, s obzirom na to da oni ne potiču iz nektara medonosnih biljaka već iz izlučevina insekata (*Hemiptera*) koji se hrane biljnim sokovima ili samih biljnih sokova. Autentičnost medljikovaca stoga je utvrđena na osnovu fizičko–hemijskih parametara propisanih Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela², kao i rezultata analize stabilnih izotopa ugljenika u medu, sprovedene prema smernicama zvanične AOAC 998.12 metode¹⁴³.

4.2. Kontrola kvaliteta uzoraka

Nakon melizopalinološke analize, kontrola kvaliteta ispitivanih uzoraka obuhvatala je određivanje parametara propisanih Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela², kao i određivanje odnosa stabilnih izotopa ugljenika u medu saglasno zvaničnoj AOAC 998.12 metodi¹⁴³. Uzorci meda koji nisu ispunjavali kriterijume definisane navedenim propisima i metodološkim preporukama smatrani su neautentičnim te su isključeni iz deskriptivno–statističke analize fizičko–hemijskih parametara, odnosa izotopa ugljenika kao i određivanja granica prihvatljivosti sadržaja pojedinačnih šećera i organskih kiselina, te i iz multivarijantne analize podataka.

4.3. Fizičko–hemijski parametri

Fizičko–hemijski parametri relevantni za ocenu kvaliteta i bezbednosti meda obuhvataju sadržaj vode, električnu provodljivost, slobodnu kiselost, aktivnost diastaze, sadržaj 5–hidroksimetilfurfurala, kao i sadržaj pojedinačnih šećera (glukoze, fruktoze i saharoze), njihov zbir

(glukoza + fruktoza) i međusobni odnos (fruktoza/glukoza). Opseg prihvatljivih vrednosti ovih parametara regulisani su Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela², kao i preporukama Codex Alimentarius-a¹ i relevantne Evropske direktive¹⁵⁸. Rezultati analize fizičko-hemijskih parametara uzoraka, izraženi kao srednja vrednost $\pm$ proširena merna nesigurnost, prikazani su u Prilogu 1, dok su u Tabeli 8 predstavljeni parametri deskriptivne statistike (za autentične uzorke) za svaku analiziranu biljnu vrstu meda, uključujući minimalne i maksimalne vrednosti, aritmetičke sredine, medijane i standardne devijacije ispitivanih parametara.

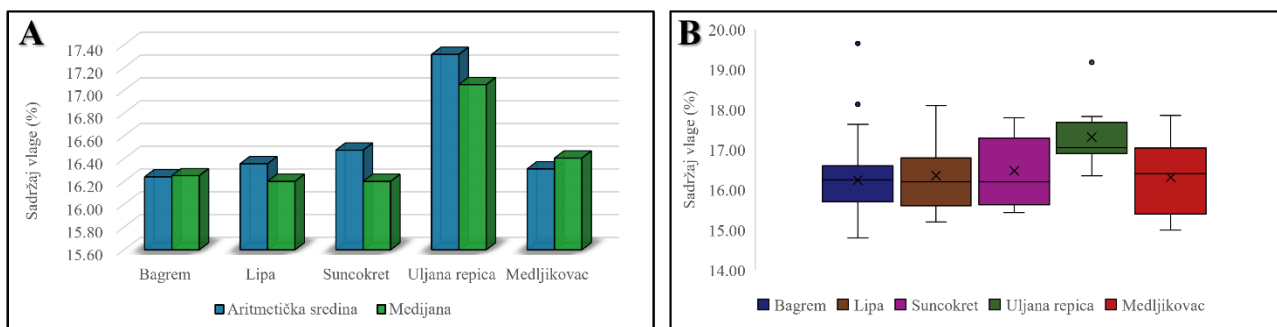
Svi uzorci meda kod kojih je utvrđena neusklađenost sa Pravilnikom² u pogledu fizičko-hemijskih parametara i rezultata analize odnosa stabilnih izotopa ugljenika (Poglavlje 4.4), isključeni su iz seta podataka za deskriptivno-statističku analizu, grafičko prikazivanje i multivarijantnu analizu.

4.3.1. Sadržaj vode

Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela Republike Srbije², kao i odgovarajućim međunarodnim regulativama^{1, 158}, maksimalno dozvoljeni sadržaj vode u medu koji se stavlja u promet iznosi 20%.

Sadržaj vode u monofloornim vrstama meda značajno varira u zavisnosti od sezone sakupljanja, klimatskih uslova i primenjene pčelarske prakse. Kao jedan od ključnih parametara kvaliteta sadržaj vode utiče na fizičko-hemijska svojstva meda, uključujući njegovu viskoznost i sklonost ka kristalizaciji. Povećan sadržaj vode može dovesti do nepoželjnih procesa poput fermentacije i granulacije čime se umanjuje stabilnost meda i njegova otpornost na kvarenje tokom skladištenja^{55, 142, 151}.

Uzorci meda, analizirani u okviru ove studije, pokazali su sadržaj vode ispod maksimalno dozvoljene granice što ukazuje na njihovu autentičnost u pogledu ovog parametra kvaliteta. Najviši sadržaj vode zabeležen je kod uzorka bagremovog (19,6%) i meda od uljane repice (19,2%). Sadržaj vode u analiziranim uzorcima varirao je u granicama karakterističnim za ispitivane biljne vrste meda i pokazao je pretežno simetričnu raspodelu podataka (Slika 31). Najširi opseg zabeležen je kod bagremovog meda (14,8 – 19,6%), dok su nešto uže vrednosti detektovane u uzorcima lipovog (15,2 – 18,1%) i suncokretovog meda (15,4 – 17,8%) kao i medljikovca (15,0 – 17,8%). Uzorci meda od uljane repice izdvojili su se blago povišenim rasponom, koji se nalazio u intervalu od 16,4% do 19,2%. Dobijen sadržaj vode za sve posmatrane klase u potpunosti je usklađen sa literaturnim vrednostima medova poreklom iz Srbije^{142, 159, 160}, Hrvatske^{146, 155, 161}, Rumunije^{29, 162, 163}, Severne Makedonije¹⁶⁴, Grčke¹⁶⁵, Mađarske¹⁶⁶, Francuske¹⁶⁷ i Španije^{157, 168}.



Slika 31. Sadržaj vode u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane b) medijane sa opsezima

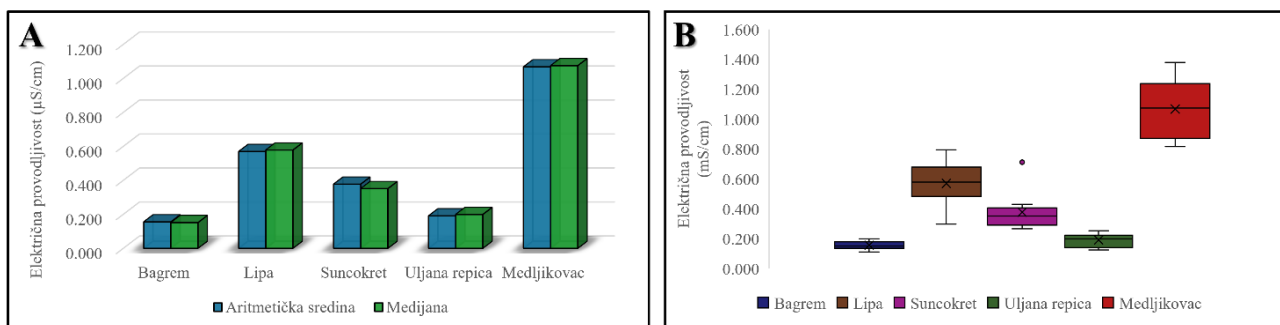
4.3.2. Električna provodljivost

U skladu sa važećim propisima^{1, 2, 158}, nektarni med koji se stavlja u promet, osim određenih izuzetaka, mora imati električnu provodljivost manju od 0,800 mS/cm, dok je za medljikovac propisana donja granica električne provodljivosti od 0,800 mS/cm.

Električna provodljivost je jedan od standardnih parametara u rutinskoj kontroli kvaliteta meda i jedan od indikatora njegovog biljnog porekla. Ovo fizičko–hemijsko svojstvo zavisi od prisustva jonogenih, odnosno jonizabilnih sastojaka kao što su minerali, organske kiseline, amino–kiseline i proteini, koji u vodenim rastvorima omogućavaju provođenje električne struje. Medovi tamnije boje generalno pokazuju veću električnu provodljivost u poređenju sa svetlijim vrstama meda, što se uglavnom pripisuje njihovom većem sadržaju mineralnih supstanci. Različita istraživanja potvrđuju važnost ovog parametra u diferencijaciji medova različitog biljnog porekla, pri čemu na vrednosti električne provodljivosti dodatno mogu uticati specifičan cvetni izvor meda, sadržaj organskih kiselina i proteina, kao i uslovi i dužina skladištenja ^{151, 169}.

Svi analizirani uzorci nektarnih medova u okviru ovog istraživanja imali su električnu provodljivost manju od 0,800 mS/cm (Slika 32), čime su zadovoljili kriterijum definisan važećim propisima. Najniže vrednosti električne provodljivosti utvrđene su kod uzoraka bagremovog meda (0,111 mS/cm) i meda od uljane repice (0,125 mS/cm), dok je najviša vrednost među monofloornim vrstama zabeležena kod lipovog meda (0,795 mS/cm). U poređenju sa lipovim i suncokretovim medom, bagremov i med od uljane repice pokazuju niže vrednosti ovog parametra, što je u skladu sa njihovim hemijskim profilom i ranijim navodima iz literature (Tabela 8) ¹⁵¹.

Najniže vrednosti električne provodljivosti zabeležene su kod bagremovog meda (0,111 – 0,198 mS/cm) i meda od uljane repice (0,125 – 0,254 mS/cm), dok su nešto širi opsezi i veće vrednosti ovog parametra detektovane u uzorcima suncokretovog (0,265 – 0,712 mS/cm) i lipovog meda (0,297 – 0,795 mS/cm). Nasuprot nektarnim vrstama, medljikovac karakteriše značajno veća vrednost električne provodljivosti, koja prema važećim zakonskim propisima mora biti iznad 0,800 mS/cm. S obzirom na to da pet uzoraka iz ove grupe (Prilog 1, uzorci M6, M10, M19, M20 i M23) nije ispunjavalo navedeni kriterijum, oni su isključeni iz dalje statističke obrade. Kod preostalih uzoraka medljikovca, zabeležena je električna provodljivost u opsegu od 0,815 do 1,380 mS/cm. Dobijeni opsezi za sve ispitivane vrste meda u potpunosti su usklađeni sa literaturnim podacima poreklom iz Srbije ^{142, 159, 160}, Hrvatske ^{155, 161, 170}, Severne Makedonije ¹⁶⁴, Rumunije ²⁹, Mađarske ¹⁶⁶, Grčke ¹⁶⁵, Francuske ¹⁶⁷, Španije ¹⁵⁷ i drugih evropskih zemalja ¹⁵¹.



Slika 32. Električna provodljivost u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

4.3.3. Slobodna kiselost

U skladu sa važećim propisima ^{1, 2, 158}, med koji se stavlja u promet ne sme imati vrednost slobodne kiselosti veću od 50 meq/kg.

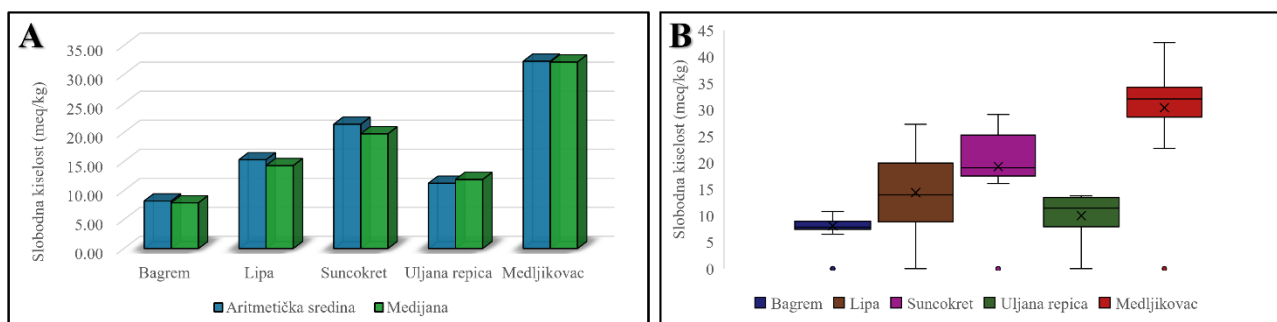
Slobodna kiselost predstavlja važan parametar u oceni svežine i kvaliteta meda, jer tokom skladištenja dolazi do porasta njene vrednosti usled fermentacije šećera u organske kiseline. Nivoi slobodne kiselosti meda su uslovljeni prisustvom različitih organskih kiselina (vinska, limunska, oksalna, sirćetna i druge) koje potiču iz biljnog nektara, izlučevina pčela ili nastaju usled biohemijskih procesa tokom sazrevanja i skladištenja meda. Osim toga, na ovaj parametar značajno utiču sezona

sakupljanja kao i geografsko poreklo meda ^{160, 162} na osnovu čega slobodna kiselost može poslužiti kao dodatni pokazatelj autentičnosti.

Rezultati analize pokazali su da su svi ispitivani uzorci meda ispunjavali zahteve važećih propisa u pogledu maksimalne dozvoljene slobodne kiselosti, izuzev uzorka L11 i M12, kod kojih su zabeležene vrednosti veće od 50 meq/kg. Zbog toga navedeni uzorci nisu uključeni u statističku obradu.

Bagremov med je pokazao najniže vrednosti slobodne kiselosti koje su bile u opsegu 6,5 – 10,8 meq/kg saglasno vrednostima koje su prijavili autori u analizama medova iz Srbije (7,8 – 29,6; 10,1 – 24,6) ^{142, 159}, Hrvatske (9,4 – 12,8; 8,2 – 12,9; 10,4 – 11,0) ^{146, 147, 161}, Rumunije (7,1 – 13,3) ²⁹, Francuske (6,3 – 11,4) ¹⁶⁷, Malezije (9,8 – 10,1) ¹⁴⁹ kao i u studiji evropskih monoflornih medova (7,8 – 14,6) ¹⁵¹. Slične karakteristike ispoljili su i uzorci meda od uljane repice, kod kojih su vrednosti slobodne kiselosti varirale u opsegu od 7,6 do 13,7 meq/kg (Slika 33).

U poređenju sa prethodno navedenim tipovima, lipov med, suncokretov med i medljikovac pokazali su više vrednosti slobodne kiselosti. Uzorci lipovog meda imali su vrednosti u opsegu 5,5 – 27,2 meq/kg, slično literaturnim podacima za uzorke iz Srbije (8,2 – 26,2; 17,0 – 21,8) ^{142, 159}, Rumunije (15,2 – 16,4) ²⁹ i u studiji evropskih monoflornih medova (13,1 – 28,5) ¹⁵¹. Suncokretov med je pokazao nešto veći raspon vrednosti slobodne kiselosti (16,1 – 29,1 meq/kg), a medljikovci su imali najveću kiselost (22,7 do 42,7 meq/kg) saglasno rezultatima ispitivanja uzoraka iz Srbije (23,4 – 32,5) ¹⁵⁹, Hrvatske (14,3 – 56,8; 14,2 – 45,7) ^{137, 164}, Makedonije (38,1 – 53,5) ¹⁶⁴, Rumunije (8,8 – 42,4) ²⁹, Grčke (23,7 – 33,7) ¹⁶⁵, Francuske (14,6 – 30,5) ¹⁶⁷ i drugih evropskih zemalja (20,4 – 31,6) ¹⁵¹.



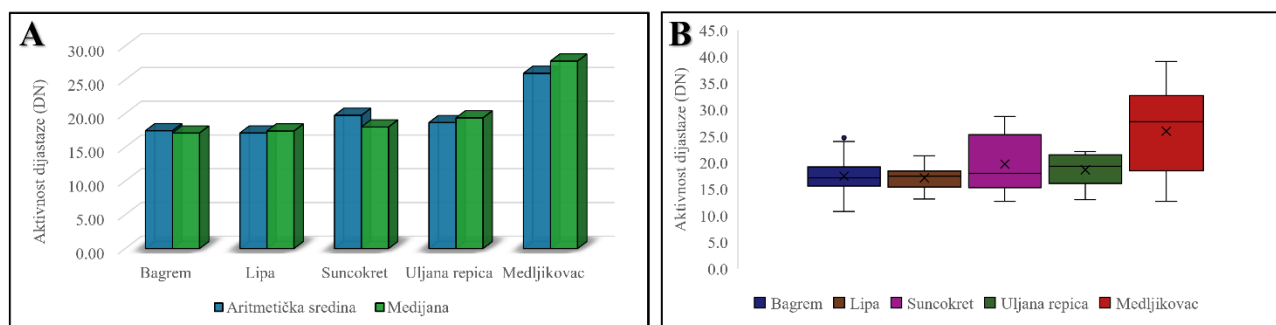
Slika 33. Slobodna kiselost u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

4.3.4. Aktivnost dijastaze

Sadržaj HMF-a i aktivnost dijastaze su ključni pokazatelji svežine meda, kao i uslova obrade i skladištenja ¹⁷¹ te se široko koriste u oceni kvaliteta i autentičnosti meda.

Rezultati analize pokazuju da su svi ispitivani uzorci imali aktivnost dijastaze veću od 8 DN, pri čemu su kod uzoraka medljikovaca uočene znatno više vrednosti u poređenju sa nektarnim medovima.

Aktivnost dijastaze u analiziranim uzorcima pokazala je pretežno simetričnu raspodelu (Slika 34) i varirala je u zavisnosti od biljnog porekla meda. Kod nektarnih vrsta zabeležene su vrednosti u uporedivim opsezima: u bagremovom medu zabeležen je raspon od 10,8 do 24,9 DN, lipovom od 13,1 do 21,3 DN, medu od uljane repice od 13,0 do 22,1 DN, dok su u uzorcima suncokretovog meda izmerene vrednosti od 12,7 do 28,7 DN. Očekivano, najveće vrednosti dobijene su kod medljikovaca, u rasponu od 12,7 do 39,1 DN, čime se dodatno potvrđuje visok enzimski potencijal karakterističan za ovu vrstu. Dobijeni rezultati aktivnosti dijastaze u potpunosti su usklađeni sa raspoloživim literaturnim navodima za ispitivane vrste meda ^{29, 142, 146, 155, 159–168}.

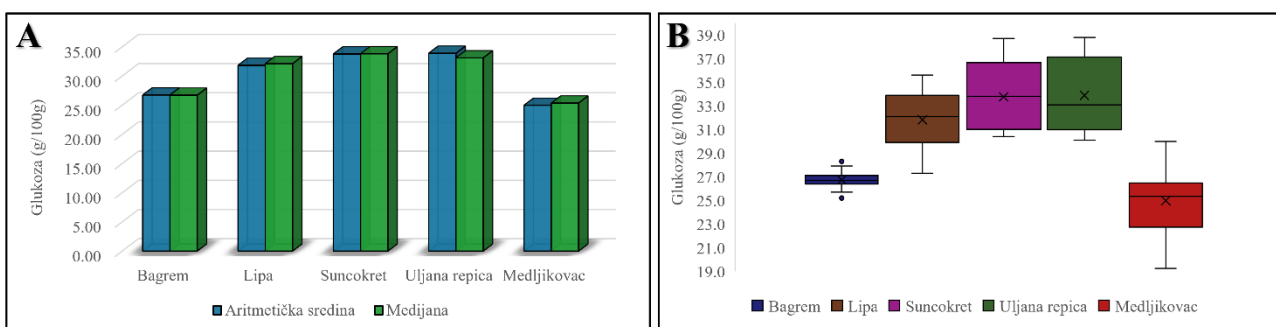


Slika 34. Aktivnost dijastaze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

4.3.5. Sadržaj šećera

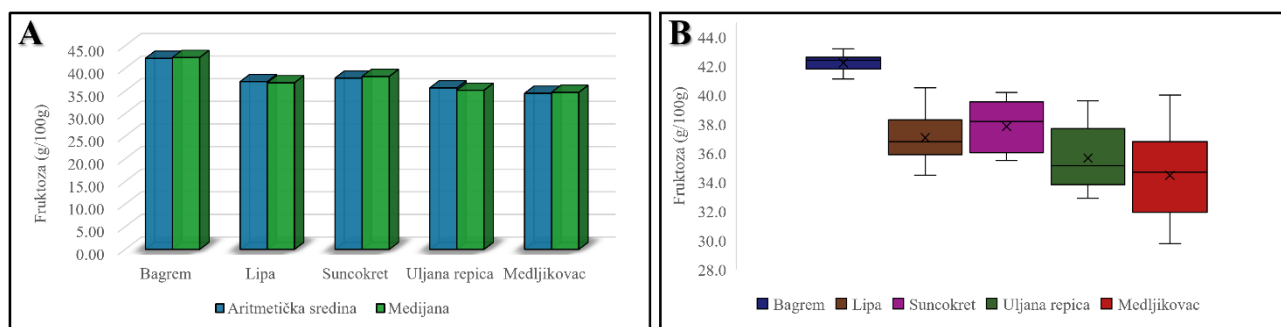
Prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela Republike Srbije ², kao i međunarodnim standardima ¹⁵⁸, minimalna dozvoljena vrednost zbira glukoze i fruktoze u nektarnim medovima iznosi 60 g/100 g, dok je za medljikovce propisana niža granica od najmanje 45 g na 100 g meda. Istim pravilnikom je definisana i maksimalna dozvoljena koncentracija saharoze, koja za većinu nektarnih medova ne sme prelaziti 5 g/100 g, dok se za bagremov med dozvoljava do 10 g/100 g saharoze ¹. Rezultati analize svih ispitivanih uzoraka pokazali su usklađenost sa važećim propisima.

Sadržaj glukoze (Slika 35) pokazao je sličan trend varijabilnosti, sa najnižim uočenim vrednostima u medljikovcu (21,5 – 33,5 g/100 g) i bagremovom medu (25,2 – 28,3 g/100 g), dok su nektarne vrste poput lipovog (27,3 – 35,6 g/100 g), suncokretovog (30,4 – 38,7 g/100 g) i meda od uljane repice (30,1 – 38,8 g/100 g) pokazale veće opsege ovog parametra. Sadržaj fruktoze u ispitivanim vrstama meda varirao je u specifičnim opsezima karakterističnim za njihovo biljno poreklo (Slika 36). Najviše vrednosti zabeležene su kod bagremovog meda (41,1 – 43,2 g/100 g), dok su nešto niže koncentracije zabeležene kod suncokretovog (35,5 – 40,2 g/100 g), lipovog (34,5 – 40,5 g/100 g) i meda od uljane repice (32,9 – 39,6 g/100 g). U uzorcima medljikovca sadržaj fruktoze varirao je u rasponu od 29,8 do 40,0 g/100 g. Ukupan zbir glukoze i fruktoze (Slika 38) iznosio je između 63,0 i 79,0 g/100 g za nektarne vrste meda, dok je kod medljikovaca taj raspon bio od 49,0 do 70,0 g/100 g. Svi izmereni sadržaji fruktoze i glukoze, kao i njihov zbir, u potpunosti su usklađeni sa raspoloživom literaturom i važećim standardima za evropske monoflorne medove ^{29, 142, 146, 155, 159–168, 170, 171}.



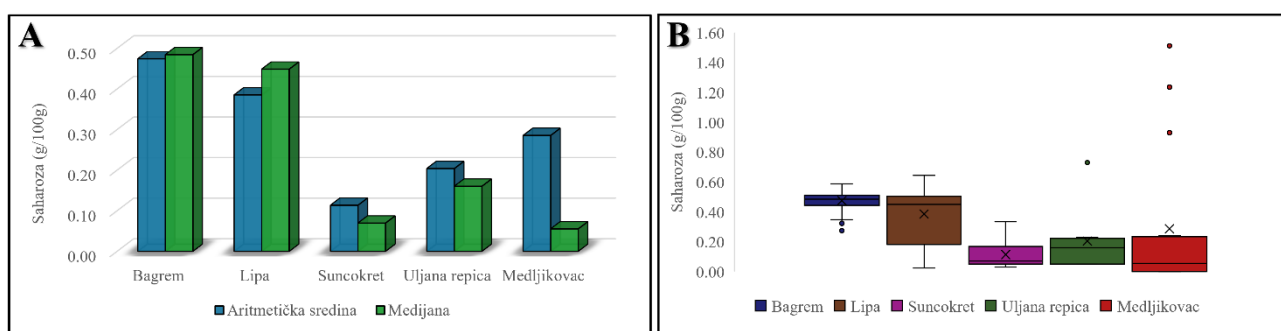
Slika 35. Sadržaj glukoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Međutim, neki uzorci bagremovog meda (B61 – B74) pokazali su nizak odnos F/G, manji od 1,4 što dovodi u pitanje njihovu autentičnost s obzirom na hemijski profil šećera evropskih monoflornih medova ¹⁵¹. Zbog toga su ti uzorci isključeni iz seta autentičnih uzoraka i dalje statističke i multivarijantne analize.



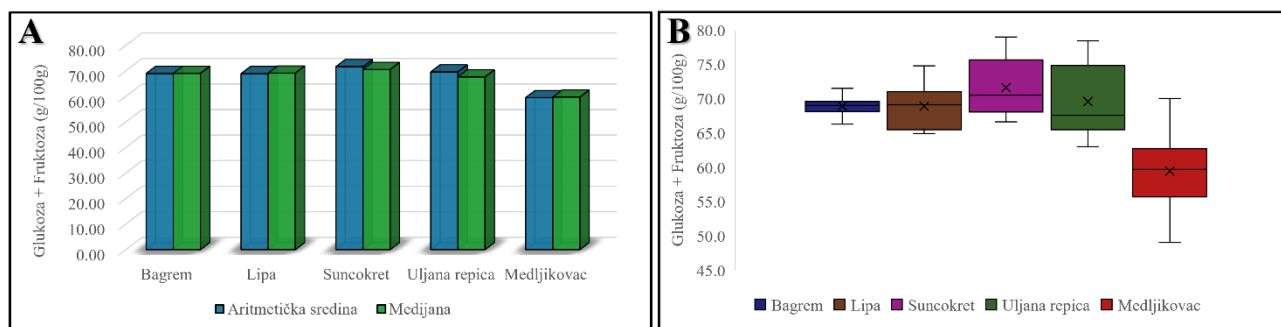
Slika 36. Sadržaj fruktoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Nizak sadržaj saharoze (Slika 37) utvrđen je kod većine ispitivanih biljnih vrsta meda, pri čemu je najviša kvantifikovana vrednost od 1,5 g/100 g detektovana kod medljikovaca, što je saglasno raspoloživim literaturnim navodima za ispitivane vrste meda^{29, 142, 146, 155, 159–168}. Detaljnija razmatranja o distribuciji di- i oligosaharida prikazana su u poglavlju 4.5.



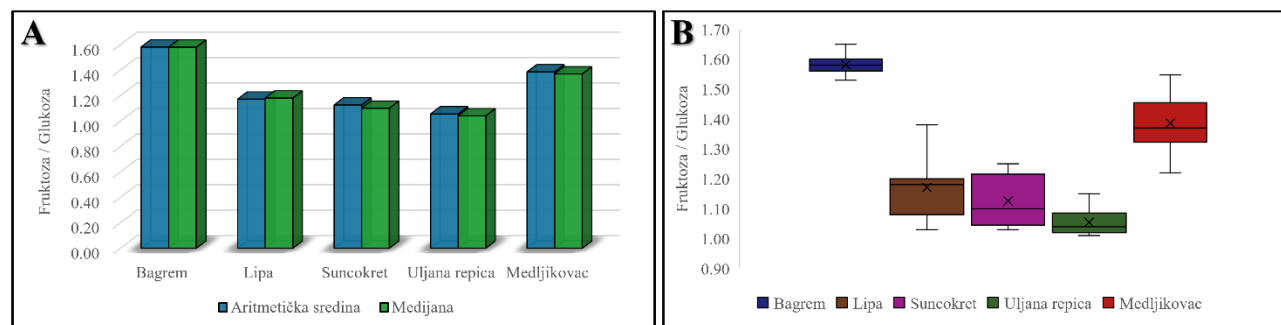
Slika 37. Sadržaj saharoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Ponašanje meda u procesu kristalizacije u najvećoj meri zavisi od njegovog sastava, pre svega od sadržaja pojedinačnih šećera i vode. Odnosi F/G i G/V predstavljaju ključne pokazatelje u predikciji sklonosti meda ka kristalizaciji^{25, 29, 149, 160, 168}. Zbog manje rastvorljivosti u toku kristalizacije najpre se iz rastvora izdvaja glukoza dok fruktoza, kao rastvorljiviji šećer, ostaje u rastvoru. Medovi sa F/G odnosom manjim od 1,11 karakterišu se brzom kristalizacijom, dok oni sa vrednostima većim od 1,33 ostaju stabilni u tečnom obliku tokom dužeg vremenskog perioda. Odnos G/V takođe ima izražen uticaj na kinetiku kristalizacije; vrednosti manje od 1,7 povezane su sa usporenom kristalizacijom ili odsustvom kristalizacije, dok odnos veći od 2,0 ukazuje na intenzivan i potpun proces kristalizacije. Veće vrednosti F/G odnosa su povezane sa smanjenom sklonošću meda ka kristalizaciji. Sadržaj vode, koji zavisi od sezonskih i klimatskih faktora, dodatno utiče na fizička svojstva meda, uključujući viskozitet, teksturu i brzinu kristalizacije. Osim monosaharida, i prisustvo manje zastupljenih šećera poput saharoze i maltoze, kao i nerastvorljivih čestica, može dodatno uticati na dinamiku kristalizacije. Sagledavanjem odnosa F/G i G/V, zajedno sa sadržajem vode i prisustvom sekundarnih komponenata, moguće je dobiti sveobuhvatan uvid u kristalizaciono ponašanje meda, što ima značajne implikacije na njegovu tehnološku obradu, senzorna svojstva i tržišnu vrednost^{25, 29, 149, 160, 168}.



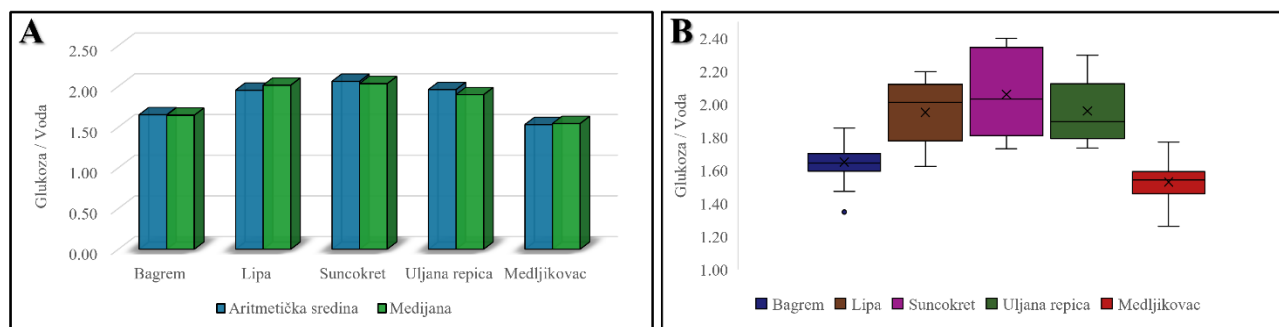
Slika 38. Suma glukoze i fruktoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Odnos fruktoze i glukoze u analiziranim uzorcima (Slika 39) bagremovog meda varirao je u opsegu od 1,53 do 1,65. Aritmetička sredina i medijana iznosile su 1,58. Kod uzoraka lipovog meda, odnos F/G bio je u intervalu od 1,03 do 1,38, sa aritmetičkom sredinom od 1,17 i medijanom od 1,18. Ove vrednosti potvrđuju i podaci iz literature autora iz Hrvatske^{164, 170}, Rumunije^{29, 169} i drugih evropskih zemalja^{151, 172}. Neki uzorci lipovog meda pokazali su izraženu kristalizaciju, što se može povezati sa nižim vrednostima F/G odnosa. Suncokretov med karakterisao je nizak odnos F/G koji je bio u rasponu od 1,03 do 1,25 sa aritmetičkom sredinom 1,13, odnosno medijanom 1,10. Uzorci meda od uljane repice pokazali su sličan trend, sa F/G odnosom u intervalu od 1,01 do 1,15, aritmetičkom sredinom 1,06 i medijanom 1,04. Zbog niskih vrednosti F/G odnosa, ovi uzorci su se u najvećoj meri nalazili u čvrstom (kristalnom) agregatnom stanju. U skladu sa dobijenim rezultatima, slične vrednosti za lipov, suncokretov i med od uljane repice navode i autori iz Srbije¹⁶⁰, Hrvatske^{164, 170}, Rumunije^{29, 169} i ostalih evropskih zemalja^{151, 172}. Kod medljikovca je utvrđen odnos F/G u opsegu od 1,22 do 1,55. Aritmetička sredina iznosila je 1,39, dok je medijana bila 1,37. Ovi uzorci su u najvećem broju slučajeva bili u tečnom stanju, sa minimalnim prisustvom kristala. Slične vrednosti za ovaj tip meda navode i autori iz Hrvatske^{137, 164, 170}, Rumunije^{29, 169}, Španije^{34, 157, 168} i drugih evropskih zemalja^{151, 172}.



Slika 39. Odnos fruktoze i glukoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Odnosi F/G i G/V su u korelaciji, jer medovi koji prema F/G odnosu pokazuju tendenciju ka kristalizaciji, obično imaju i povišene vrednosti G/V odnosa (Slika 40). Ova zakonitost jasno je potvrđena u našem istraživanju, gde su najviše vrednosti G/V odnosa zabeležene upravo kod suncokretovog i meda od uljane repice, objašnjavajući njihov brz prelazak u kristalno stanje.



Slika 40. Odnos glukoze i vode u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

4.3.6. Sadržaj HMF-a

Sadržaj HMF-a predstavlja jedan od ključnih parametara za procenu svežine meda, s obzirom na to da ga u svežem medu nema ili je prisutan u jako maloj količini, dok se njegova koncentracija povećava usled zagrevanja ili dugotrajnog skladištenja. Prekoračenje propisanih granica najčešće je rezultat neenzimskih transformacija koje uključuju dehidrataciju fruktoze i glukoze u kiselim uslovima, kao i Majlardovu reakciju. Dinamika formiranja ovog jedinjenja, koje nastaje u namirnicama sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, direktno je uslovljena specifičnim hemijskim sastavom meda, pri čemu je od presudnog značaja ukupan sadržaj šećera i njihovi međusobni odnosi, budući da je fruktoza nekoliko puta reaktivnija od glukoze. Pored profila šećera, brzina ovih reakcija izrazito zavisi od pH-vrednosti. Shodno tome, medovi sa nižim pH-vrednostima pokazuju prirodno veću tendenciju ka ubrzanom formiranju HMF-a, čak i pri nižim temperaturama.

U svim analiziranim uzorcima meda sadržaj HMF-a (Prilog 1) je bio značajno ispod propisane maksimalne granice od 40 mg/kg^{1, 2, 158}, čime je potvrđena njihova svežina i autentičnost u pogledu ovog parametra kvaliteta. Najviša izmerena vrednost HMF-a zabeležena je u jednom uzorku suncokretovog meda i iznosila je 11,4 mg/kg, što je znatno niže od zakonske granične vrednosti. Dobijeni rezultati ukazuju na to da su svi analizirani uzorci meda proizvedeni i skladišteni u skladu sa tehnološkim i higijenskim standardima koji omogućavaju očuvanje kvaliteta i svežine proizvoda.

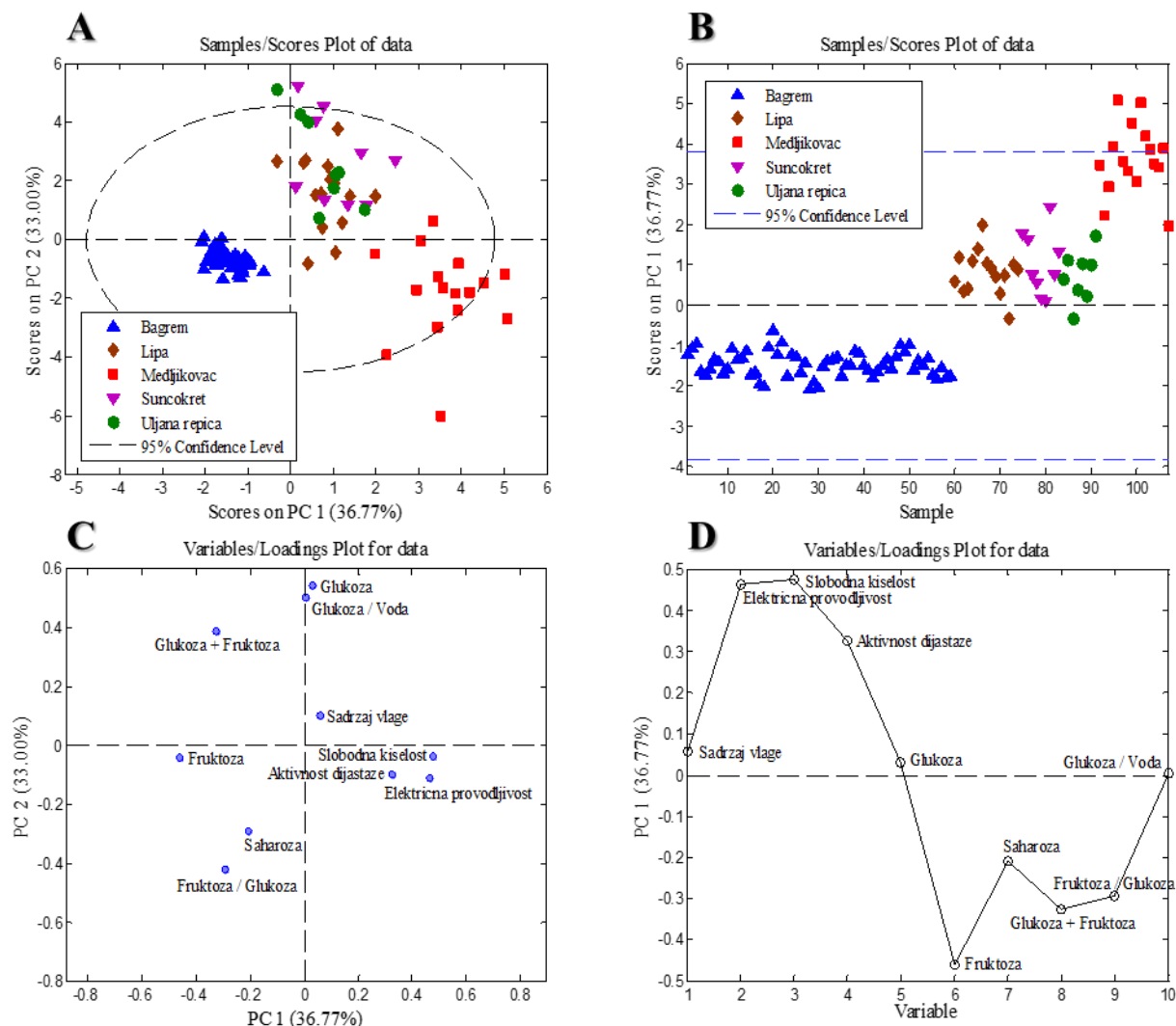
4.3.7. Analiza fizičko-hemijskih parametara

U cilju sagledavanja potencijala fizičko-hemijskih parametara za diferencijaciju meda prema biljnom poreklu urađena je analiza glavnih komponenata (PCA) na eksperimentalnim podacima. Dobijeni model se sastojao od tri glavne komponente (PC1 – PC3), koje zajedno objašnjavaju 82,72% ukupne varijabilnosti među uzorcima. Prva glavna komponenta (PC1) obuhvata 36,77% ukupnog varijabiliteta, dok druga (PC2) i treća (PC3) objašnjavaju dodatnih 33,00% i 12,94%, redom. Preostali deo varijabilnosti, sadržan u komponentama višeg reda, nije pokazao značajan doprinos modelovanju strukture podataka.

Na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 41A) uočavaju se tri jasno izdvojena klastera. Uzorci bagremovog meda grupisani su u okviru negativnih vrednosti duž prve dve komponente (PC1 i PC2), što ukazuje na njihovu hemijsku specifičnost u odnosu na ostale vrste. Uzorci medljikovca formiraju zaseban klaster sa pozitivnim skorovima duž PC1 i negativnim duž PC2. Treći klaster, koji obuhvata uzorke lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice, karakterišu pozitivne vrednosti duž obe komponente, sugerišući njihovu međusobnu sličnost u analiziranim parametrima.

Analizom grafika skorova latentnih varijabli (Slika 41C), uočen je značajan doprinos pojedinih parametara u diferencijaciji uzoraka. Sadržaj fruktoze, saharoze i odnos fruktoze prema glukozi, pozicionirani u negativnim kvadrantima duž PC1 i PC2, imaju ključnu ulogu u razdvajanju bagremovog meda od ostalih. S druge strane, parametri poput slobodne kiselosti, aktivnosti diastaze i električne provodljivosti, locirani u pozitivnom delu PC1 i negativnom delu PC2, doprinose

razlikovanju medljikovca od drugih ispitivanih vrsta meda. Parametri kao što su sadržaj vode, koncentracija glukoze i odnos glukoze i vode usmereni su ka pozitivnim vrednostima PC2, čime doprinose grupisanju uzoraka lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice.



Slika 41. Analiza glavnih komponenata za fizičko–hemijske parametre: A) grafik skorova latentnih varijabli B) skorovi latentnih varijabli duž PC1 C) grafik vektora latentnih varijabli D) grafik vektora latentnih varijabli za PC1

Iako fizičko–hemijski parametri predstavljaju osnovu za ocenu kvaliteta i bezbednosti meda, rezultati PCA analize ukazuju da oni, sami po sebi, nisu dovoljni za pouzdanu klasifikaciju prema biljnom poreklu. Stoga se za unapređenje diferencijacije preporučuje uključivanje dodatnih analitičkih pokazatelja, kao što su odnosi izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, profil šećera i organskih kiselina, o čemu će detaljnije biti reči u narednim poglavljima.

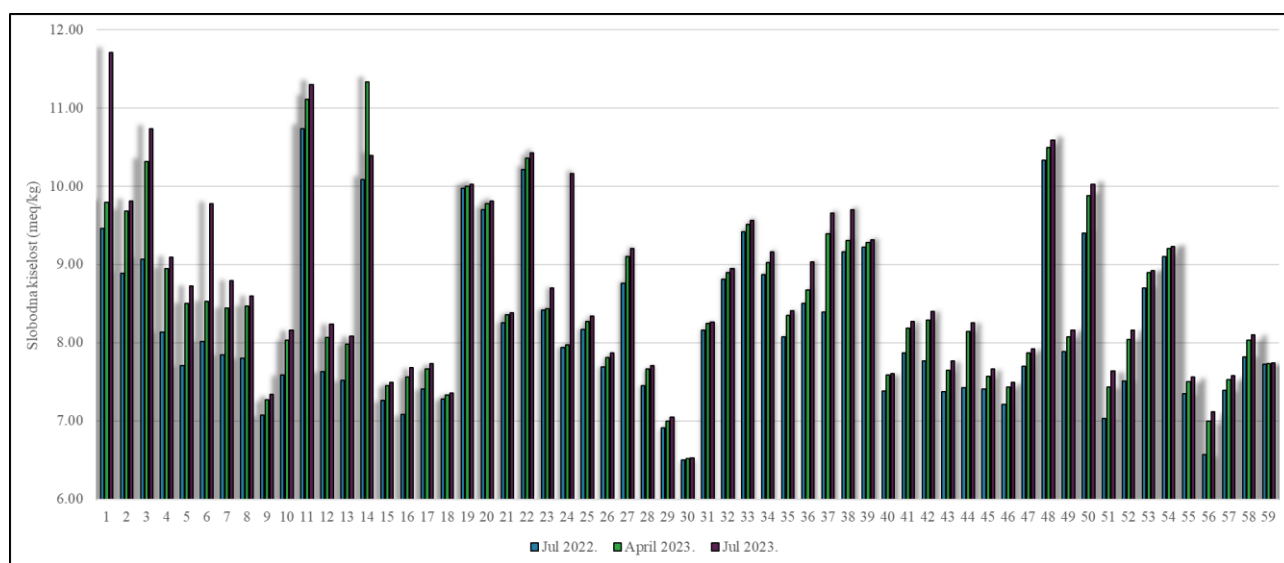
Tabela 8. Parametri deskriptivne statistike fizičko–hemijskih parametara uzoraka meda

Biljna vrsta meda	Parametar deskriptivne statistike	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
Bagrem	$X_{\min}$	14,8	0,111	6,5	10,8	0,3	25,2	41,1	0,27	66,3	1,53	1,35
	$X_{\max}$	19,6	0,198	10,8	24,9	4,9	28,3	43,2	0,59	71,5	1,65	1,86
	$\bar{x}$	16,2	0,155	8,2	17,4	2,8	26,7	42,2	0,47	68,9	1,58	1,65
	$\tilde{x}$	16,2	0,151	7,9	17,1	2,9	26,7	42,4	0,48	69,0	1,58	1,64
	s	0,9	0,024	1,0	3,5	1,5	0,6	0,5	0,06	1,0	0,02	0,09
Lipa	$X_{\min}$	15,2	0,297	5,5	13,1	0,5	27,3	34,5	0,02	64,9	1,03	1,63
	$X_{\max}$	18,1	0,795	27,2	21,3	7,4	35,6	40,5	0,64	74,8	1,38	2,20
	$\bar{x}$	16,4	0,569	15,3	17,1	4,2	31,8	37,1	0,39	68,9	1,17	1,95
	$\tilde{x}$	16,2	0,578	14,3	17,4	4,5	32,1	36,8	0,45	69,1	1,18	2,01
	s	0,9	0,150	6,2	2,2	2,5	2,4	1,7	0,20	3,0	0,11	0,19
Suncokret	$X_{\min}$	15,4	0,265	16,1	12,7	0,3	30,4	35,5	0,03	66,6	1,03	1,73
	$X_{\max}$	17,8	0,712	29,1	28,7	11,4	38,7	40,2	0,33	79,0	1,25	2,40
	$\bar{x}$	16,5	0,377	21,4	19,7	5,3	33,8	37,8	0,11	71,6	1,13	2,06
	$\tilde{x}$	16,2	0,351	19,8	18,0	5,2	33,8	38,2	0,07	70,5	1,10	2,03
	s	0,9	0,136	4,5	5,6	3,5	3,1	1,8	0,10	4,3	0,09	0,27
Uljana repica	$X_{\min}$	16,4	0,125	7,6	13,0	0,3	30,1	32,9	0,05	63,0	1,01	1,74
	$X_{\max}$	19,2	0,254	13,7	22,1	7,6	38,8	39,6	0,73	78,4	1,15	2,30
	$\bar{x}$	17,3	0,191	11,2	18,6	3,6	33,9	35,7	0,20	69,6	1,06	1,96
	$\tilde{x}$	17,0	0,199	11,9	19,4	3,0	33,1	35,2	0,16	67,6	1,04	1,90
	s	0,9	0,046	2,5	3,2	2,5	3,2	2,3	0,22	5,4	0,05	0,20
Medljikovac	$X_{\min}$	15,0	0,815	22,7	12,7	0,6	19,3	29,8	0,00	49,0	1,22	1,26
	$X_{\max}$	17,8	1,380	42,7	39,1	7,1	30,0	40,0	1,51	70,0	1,55	1,77
	$\bar{x}$	16,3	1,068	32,3	25,9	2,6	25,0	34,5	0,29	59,5	1,39	1,53
	$\tilde{x}$	16,4	1,075	32,1	27,8	1,8	25,4	34,7	0,06	59,7	1,37	1,54
	s	1,0	0,186	5,1	7,9	2,1	2,6	2,9	0,49	5,2	0,09	0,12

4.3.8. Studija stabilnosti odabranih fizičko–hemijskih parametara na primeru uzoraka bagremovog meda

Zbog obezbeđivanja autentičnosti i očuvanja kvaliteta meda, neophodno je izvršiti sveobuhvatnu procenu njegovih fizičko–hemijskih i senzorskih karakteristika. Navedeni parametri značajno utiču na zrelost i čistoću svežeg meda, te je od ključnog značaja pratiti promene koje mogu nastupiti tokom procesa skladištenja. Faktori kao što su temperatura, relativna vlažnost vazduha, prisustvo kiseonika i izloženost svetlosti mogu značajno uticati na stabilnost meda i dovesti do promena u njegovom sastavu i svojstvima. Tokom skladištenja dolazi do razgradnje (hidrolize) šećera, formiranja HMF–a, smanjenja aktivnosti enzima poput diastaze i invertaze, porasta ukupne kiselosti, sniženja pH–vrednosti, hidrolize fenolnih jedinjenja, kao i promena u boji, što sve zajedno može uticati na nutritivni i senzorski kvalitet proizvoda ^{3, 160}.

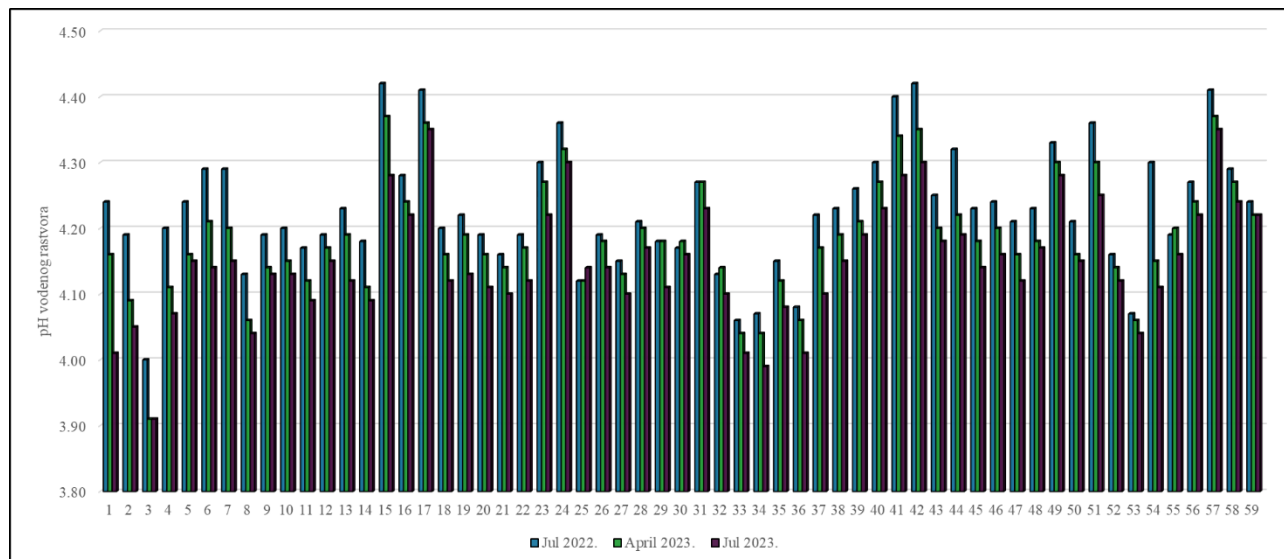
Tokom perioda skladištenja u trajanju od dvanaest meseci praćena je promena fizičko–hemijskih parametara kod uzoraka autentičnog bagremovog meda (Prilog 2). Merenja su realizovana u početnom (nultom) mesecu, a zatim nakon devet i dvanaest meseci skladištenja (Slika 42). Rezultati ukazuju na trend povećanja slobodne kiselosti kod većine analiziranih uzoraka, pri čemu je izuzetak zabeležen kod uzorka B14, kod kojeg je vrednost slobodne kiselosti u dvanaestom mesecu bila niža u odnosu na onu iz devetog meseca. Postojanje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima provereno je pomoću Studentovog t –testa, pri čemu je dobijena vrednost $t = 2,54$ premašila kritičnu vrednost $t_{cr} = 1,98$, uz nivo značajnosti $p = 0,01 < 0,05$. Ovo ukazuje na postojanje statistički značajne razlike između srednjih vrednosti slobodne kiselosti u početnoj i završnoj fazi ispitivanja. Na osnovu ukupnog povećanja tokom analiziranog perioda izračunata je prosečna mesečna stopa povećanja slobodne kiselosti, koja iznosi 0,42%. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih istraživanja koje su objavili i drugi autori ^{3, 160, 173, 174}.



Slika 42. Slobodna kiselost u nultom momentu, nakon 9 meseci i nakon 12 meseci

U okviru ovog istraživanja praćena je i promena pH–vrednosti vodenih rastvora i slobodne kiselosti uzoraka bagremovog meda u istim vremenskim intervalima (Prilog 3). Poznato je da između slobodne kiselosti i pH–vrednosti postoji obrnuta korelacija, s obzirom na to da porast slobodne kiselosti, usled povećanog prisustva organskih kiselina i drugih jedinjenja koja doprinose ukupnoj kiselosti meda, rezultuje blagim padom pH–vrednosti. Ova međuzavisnost je potvrđena i u okviru dobijenih rezultata. Na Slici 43 prikazane su vrednosti pH parametra za tri vremenska trenutka merenja, za svaki uzorak pojedinačno. Uočen je opšti trend smanjenja pH–vrednosti tokom perioda skladištenja kod većine analiziranih uzoraka, izuzev uzorka broj 25, kod kojeg je u dvanaestom mesecu zabeleženo blago povećanje pH–vrednosti (za 0,02 jedinice) u odnosu na prethodna merenja. Primena t –testa ukazala

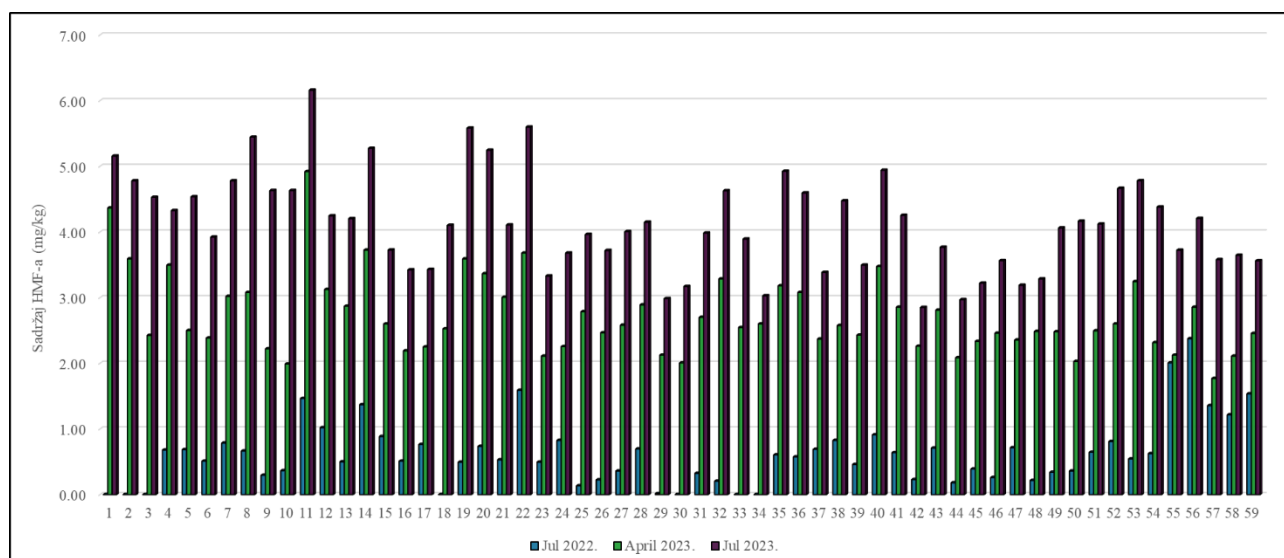
je na postojanje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima pH parametra između nultog i dvanaestog meseca ($t = 4,74 > t_{cr} = 1,98$), uz visok nivo značajnosti ($p = 6,2 \cdot 10^{-6} < 0,05$). Na osnovu svih dobijenih podataka, izračunata je prosečna mesečna stopa smanjenja pH-vrednosti, koja iznosi 0,15%. To ukazuje da se, pod konstantnim uslovima skladištenja, pH-vrednost bagremovog meda prosečno smanjuje za navedeni procenat svakog meseca. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nalazima prethodnih istraživanja koje su objavili i ostali autori ^{3, 160, 173}.



Slika 43. pH-vrednost vodenog rastvora meda u nultom momentu, nakon 9 meseci i nakon 12 meseci

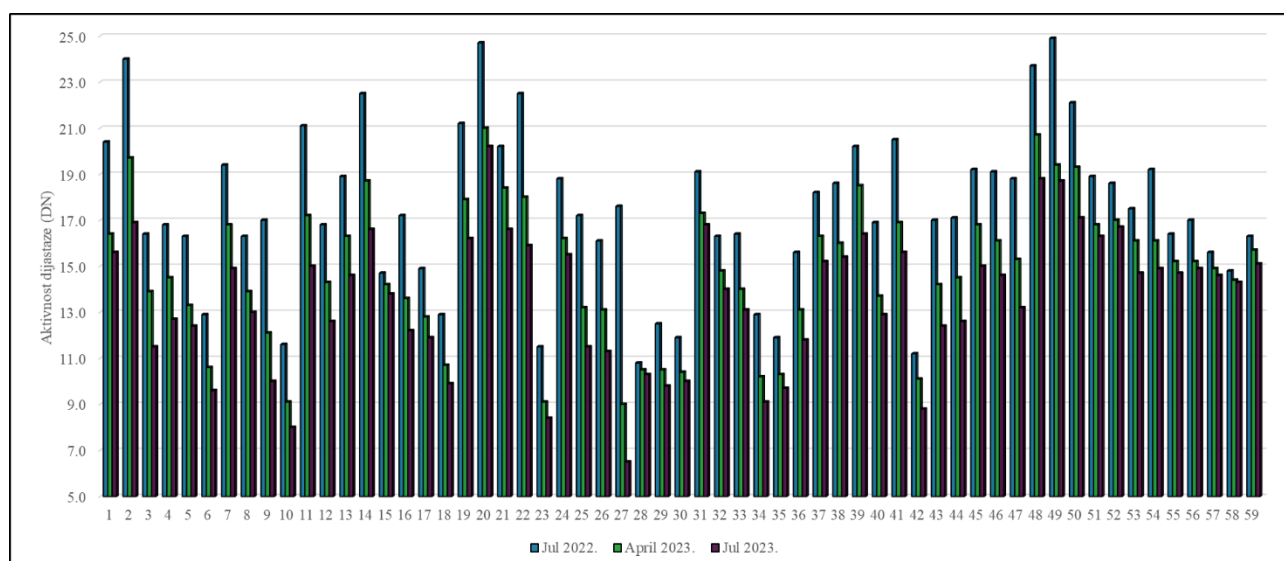
Za razliku od brojnih prethodnih istraživanja u kojima je stabilnost HMF-a ispitivana pod uslovima kontrolisanog zagrevanja, primarni cilj ove studije bio je da se proceni dinamika promene sadržaja HMF-a tokom vremena, bez primene termičkog tretmana, pod konstantnim uslovima skladištenja. Dosadašnja istraživanja nedvosmisleno ukazuju na to da visoke temperature u kratkom vremenskom intervalu dovode do većeg stepena degradacije kvaliteta meda u poređenju sa dugotrajnim izlaganjem nižim temperaturama. Tokom dvanaestomesečnog perioda skladištenja, zabeležen je porast sadržaja HMF-a u svim uzorcima (Prilog 4) autentičnog bagremovog meda (Slika 44). Dobijeni rezultati jasno pokazuju kontinuiran porast koncentracije HMF-a kod svih analiziranih uzoraka. S druge strane, primenom t -testa utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima između nultog i dvanaestog meseca ($t = 30,35 > t_{cr} = 1,98$), uz izuzetno visok nivo značajnosti ($p = 5,2 \cdot 10^{-57} < 0,05$). Na osnovu celokupnog povećanja tokom analiziranog perioda, izračunata je prosečna mesečna stopa porasta sadržaja HMF-a, koja iznosi više od 100%, što ukazuje na značajnu akumulaciju ovog jedinjenja čak i u uslovima bez zagrevanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim navodima prethodnih studija koje su publikovali drugi autori ^{3, 160, 166, 173, 175}.

Pored temperature, na formiranje HMF-a u medu mogu značajno uticati i drugi faktori, uključujući trajanje izlaganja toploti, uslove skladištenja, upotrebu metalnih posuda, kao i specifične fizičko-hemijska svojstva samog meda. Niske temperature imaju višestruke pozitivne efekte, jer usporavaju procese kristalizacije, inhibiraju fermentaciju i druge neželjene hemijske reakcije, te istovremeno doprinose smanjenju viskoznosti meda. S druge strane, nekontrolisano zagrevanje može rezultirati gubitkom termolabilnih i aromatičnih jedinjenja, što dovodi do narušavanja kvaliteta proizvoda, pre svega kroz povećanje sadržaja HMF-a i smanjenje enzimske aktivnosti. Upravo se HMF često koristi kao marker za procenu intenziteta promena koje nastaju tokom termičke obrade prehrambenih proizvoda, uključujući i med ^{3, 160}.



Slika 44. Sadržaj HMF-a u nultom momentu, nakon 9 meseci i nakon 12 meseci

Enzim diastaza ispoljava optimalnu aktivnost unutar određenog temperaturnog opsega, te stabilnost temperature i uslova skladištenja tokom trajanja eksperimenta predstavlja značajan činilac u očuvanju njegove aktivnosti. U okviru ove studije, sprovedeno je praćenje promene aktivnosti diastaze u autentičnim uzorcima bagremovog meda (Prilog 5) u jednakim vremenskim intervalima kao i za parametre slobodne kiselosti i sadržaja HMF-a. Na Slici 45 prikazana su merenja aktivnosti diastaze za svaki uzorak ponaosob tokom perioda skladištenja. Dobijeni rezultati pokazuju opadajući trend aktivnosti diastaze kod svih uzoraka tokom perioda praćenja. Nasuprot tome, t -test ukazao je na statistički značajnu razliku u srednjim vrednostima aktivnosti diastaze između nultog i dvanaestog meseca ($t = 6,57 > t_{cr} = 1,98$), uz visok nivo značajnosti ($p = 1,5 \cdot 10^{-9} < 0,05$). Na osnovu ukupnog pada aktivnosti diastaze tokom ispitivanog perioda, izračunata je prosečna mesečna stopa smanjenja, koja iznosi 1,62%. Ovaj nalaz ukazuje da se pri konstantnim uslovima čuvanja i skladištenja aktivnost diastaze u bagremovom medu postepeno smanjuje, pri čemu su faktori skladištenja od suštinskog značaja za očuvanje enzimске stabilnosti. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima ranijih studija koje su publikovali drugi autori ^{3, 160, 166, 173}.



Slika 45. Aktivnost diastaze u nultom momentu, nakon 9 meseci i nakon 12 meseci

4.4. Odnos stabilnih izotopa ugljenika

Analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika (*eng. Stable Carbon Isotope Ratio Analysis, SCIRA*), izraženog kao $\delta^{13}\text{C}$ (‰) vrednost, predstavlja jednu od najpouzdanijih metoda za detekciju krivotvorenja meda dodatkom šećernih sirupa poreklom iz biljaka koje koriste C4 fotosintetski put (kukuruz i šećerna trska). Osnov SCIRA metode ogleda se u razlikama u izotopskom sastavu ugljenika između šećera biljaka C4 ($\delta^{13}\text{C}$ u opsegu od -10‰ do -20‰) i biljaka C3 ($\delta^{13}\text{C}$ u opsegu od -22‰ do -33‰) metaboličkog puta, koje predstavljaju dominantne izvore nektara za pčele. Autentičan med, proizveden isključivo iz nektara C3 biljaka, tipično pokazuje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti između -22,5‰ i -27,4‰^{35, 36, 83–85, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 176, 177}. Prema standardnoj AOAC 998.12 metodi¹⁴³, med sa $\delta^{13}\text{C}$ vrednostima većim od -23,5‰ smatra se potencijalno krivotvorenim dodatkom šećera poreklom od C4 biljaka. Kako bi se povećala pouzdanost detekcije, koristi se metoda upoređivanja $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti ukupnog meda i njegove proteinske frakcije, pri čemu protein služi kao interni standard jer ne podleže promenama izazvanim krivotvorenjem. Razlika između izotopskih vrednosti meda i njegovog proteina ($\delta^{13}\text{C}_{(p-m)}$, (‰)) koja prelazi 1‰ ukazuje na prisustvo egzogenih C4 šećera, a ovaj prag korelira sa 7% šećera C4 biljaka. S druge strane, ova metoda ima ograničenja u identifikaciji dodatka šećera poreklom od C3 biljaka (šećerna repa, pirinač, pšenica, ječam, ovas itd.), budući da su izotopske karakteristike takvih šećera vrlo slične onima u autentičnom medu. Uprkos tome što SCIRA ostaje referentna metoda za otkrivanje dodataka C4 šećera, detekcija dodatka C3 šećera i dalje predstavlja značajan analitički izazov koji zahteva dodatna istraživanja i razvoj novih metoda^{35, 36, 83–85, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 176, 177}.

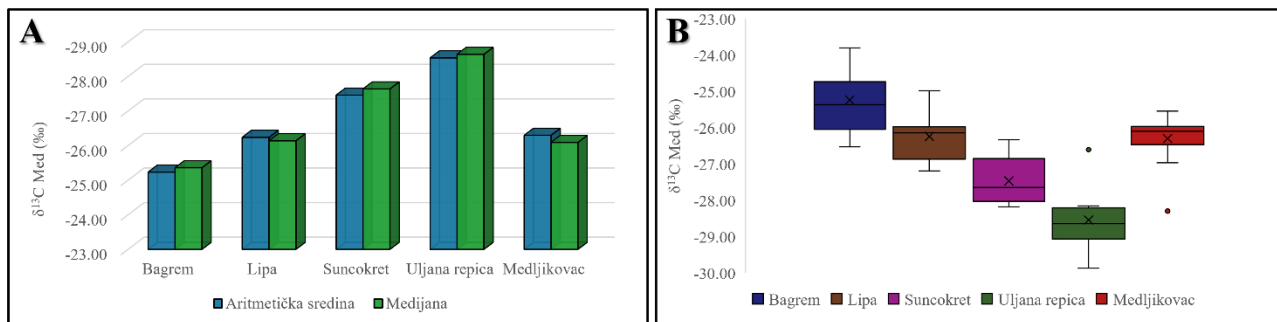
U okviru ovog rada određivanje odnosa stabilnih izotopa ugljenika je primenjeno kao provera autentičnosti ispitivanih uzoraka meda pored melizopalnolške i fizičko–hemijske analize. Uzorci meda kod kojih je razlika između izotopskih vrednosti meda i njegove proteinske frakcije ($\delta^{13}\text{C}_{(p-m)}$, (‰)) premašivala 1‰ smatrani su potencijalno neautentičnim, a takođe i uzorci iz kojih nije bilo moguće izdvojiti proteinsku frakciju bili su izuzeti iz daljih statističkih analiza zbog nemogućnosti pouzdane procene njihove autentičnosti (Prilog 6). Konkretno, uzorci B70 i L3 pokazali su vrednosti sadržaja C4 šećera negativnije od -7%, što prema nekim autorima ukazuje na potencijalno krivotvorenje C3 šećerima⁸⁵. Pored toga, uzorci S8, R3 i R5, kao i uzorci od M2 do M5, imali su vrednosti sadržaja C4 šećera veće od 7%, odnosno nisu bili autentični. Uzorci B72, L15 i M6, kod kojih izolovanje proteinske frakcije nije bilo moguće, tretirani su kao neautentični zbog nemogućnosti sprovođenja potpune izotopske analize.

Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ meda i izolovanog proteina date su u Prilogu 6 dok su parametri deskriptivne statistike (raspon, aritmetička sredina, medijana i standardna devijacija) prikazane u Tabeli 9.

Analizirane biljne vrste meda poreklom su od C3 metaboličkog puta i imale su raspon vrednosti za $\delta^{13}\text{C}$ meda od -23,8‰ do -29,9‰, dok je raspon za vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ izolovanog proteina bio u opsegu od -23,7‰ do -29,6‰, što je u saglasnosti sa rezultatima koji su navedeni u relevantnoj literaturi^{35, 83, 86–89, 91, 93, 177}. Uvidom u dobijene rezultate može se potvrditi autentičnost ispitivanih uzoraka u smislu načina proizvodnje, odnosno da u medove nisu dodavani šećeri i šećerni sirupi poreklom od C4 biljaka čije su $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti pozitivnije od -23,5‰.

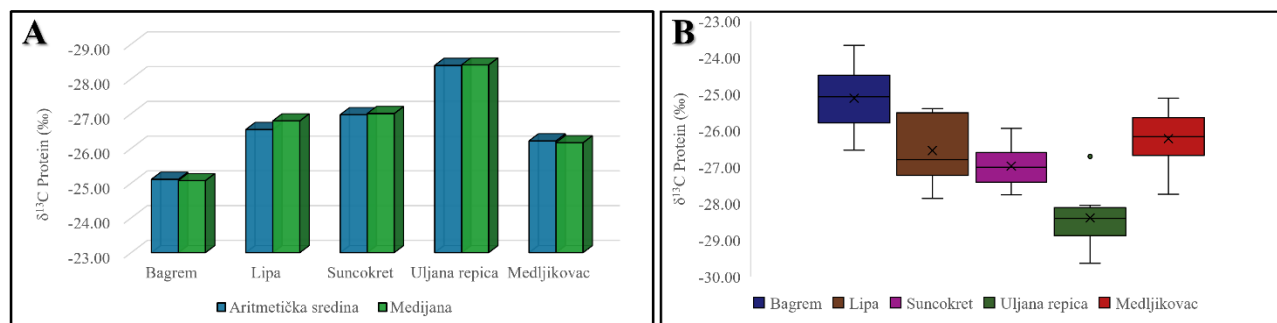
Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ meda kod analiziranih biljnih vrsta meda bile su relativno uskim opsezima, uz malu razliku između aritmetičke sredine i medijane, što ukazuje na ujednačenost izotopskog sastava unutar svake grupe uzoraka. Bagremov med pokazao je vrednosti od -23,8‰ do -26,5‰^{84, 86, 89, 95, 170}, dok su lipov, suncokretov med i medljikovac imali nešto negativnije vrednosti, od -25,0‰ do -27,2‰, -26,3‰ do -28,2‰ i -25,5‰ do -28,3‰, redom^{84, 86, 89, 95, 170}. Najnegativnije vrednosti registrovane su kod meda od uljane repice, u opsegu od -26,6‰ do -29,9‰. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature^{86, 89, 93, 95, 136, 137}. Na Slici 46B prikazane su medijane i opsezi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda za svaku ispitivanu biljnu vrstu, pri čemu je uočljivo da se bagremov med može gotovo bez

preklapanja razlikovati od suncokretovog i meda od uljane repice, dok se medljikovci takođe izdvajaju u odnosu na med od uljane repice.



Slika 46. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Proteini izolovani iz meda predstavljaju nosioce informacija o njegovom biljnom poreklu, jer odražavaju karakterističan izotopski signal biljke od koje potiče nektar, a zbog njihove stabilnosti i nemogućnosti krivotvorenja, $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti ovih proteina mogu poslužiti kao pouzdan pokazatelj autentičnosti. U okviru analiziranih uzoraka, $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti izolovanih proteina kretale su se u uskim opsezima sa malom razlikom između aritmetičke sredine i medijane, što ukazuje na konzistentnost izotopskog sastava unutar svake grupe datog biljnog porekla. Kod bagremovog meda registrovan je opseg $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina od -23,7‰ do -26,5‰^{84, 86, 89, 95, 170}, dok su lipov i suncokretov med imali slične, nešto negativnije vrednosti, od -25,4‰ do -27,9‰ i -25,9‰ do -27,8‰, redom^{84, 86, 89, 95, 170}. Na Slici 47B prikazane su medijane i opsezi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina za svaku ispitivanu biljnu vrstu meda, pri čemu se jasno uočava mogućnost razlikovanja bagremovog i meda od uljane repice, kao i izdvajanje medljikovaca u odnosu na med od uljane repice.



Slika 47. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ izolovanog proteina u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Tabela 9. Parametri deskriptivne statistike odnosa stabilnih izotopa ugljenika uzoraka meda ($\bar{x}$ – aritmetička sredina, $\tilde{x}$ – medijana, s – standardna devijacija)

Biljna vrsta meda	Parametar deskriptivne statistike	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)
Bagrem	$X_{\min}$	-26,5	-26,5
	$X_{\max}$	-23,8	-23,7
	$\bar{x}$	-25,2	-25,1
	$\tilde{x}$	-25,4	-25,1
	s	0,9	0,8
Lipa	$X_{\min}$	-27,2	-27,9
	$X_{\max}$	-25,0	-25,4
	$\bar{x}$	-26,2	-26,5
	$\tilde{x}$	-26,1	-26,8
	s	0,7	0,9
Suncokret	$X_{\min}$	-28,2	-27,8
	$X_{\max}$	-26,3	-25,9
	$\bar{x}$	-27,5	-27,0
	$\tilde{x}$	-27,6	-27,0
	s	0,7	0,6
Uljana repica	$X_{\min}$	-29,9	-29,6
	$X_{\max}$	-26,6	-26,7
	$\bar{x}$	-28,5	-28,4
	$\tilde{x}$	-28,6	-28,4
	s	1,0	0,9
Medljikovac	$X_{\min}$	-28,3	-27,7
	$X_{\max}$	-25,5	-25,1
	$\bar{x}$	-26,3	-26,2
	$\tilde{x}$	-26,1	-26,2
	s	0,7	0,7

4.5. Profil šećera

Šećeri predstavljaju najzastupljenije komponente u medu, čineći i do 70 – 80% njegove ukupne mase. Zbog toga su kvalitativni i kvantitativni sadržaj šećera jedan od najvažnijih parametara u oceni autentičnosti meda, kako u pogledu načina proizvodnje, tako i u kontekstu određivanja biljnog i geografskog porekla meda. Šećerni profil meda, definisan sadržajem i odnosima pojedinačnih šećera, pruža dragocene informacije koje omogućavaju diferencijaciju između različitih biljnih vrsta meda, kao i između nektarnog meda i medljikovca^{16, 168}. Na primer, bagremov med karakteriše veći sadržaj fruktoze u odnosu na glukozu, dok je kod meda od uljane repice odnos ova dva šećera približno jednak.

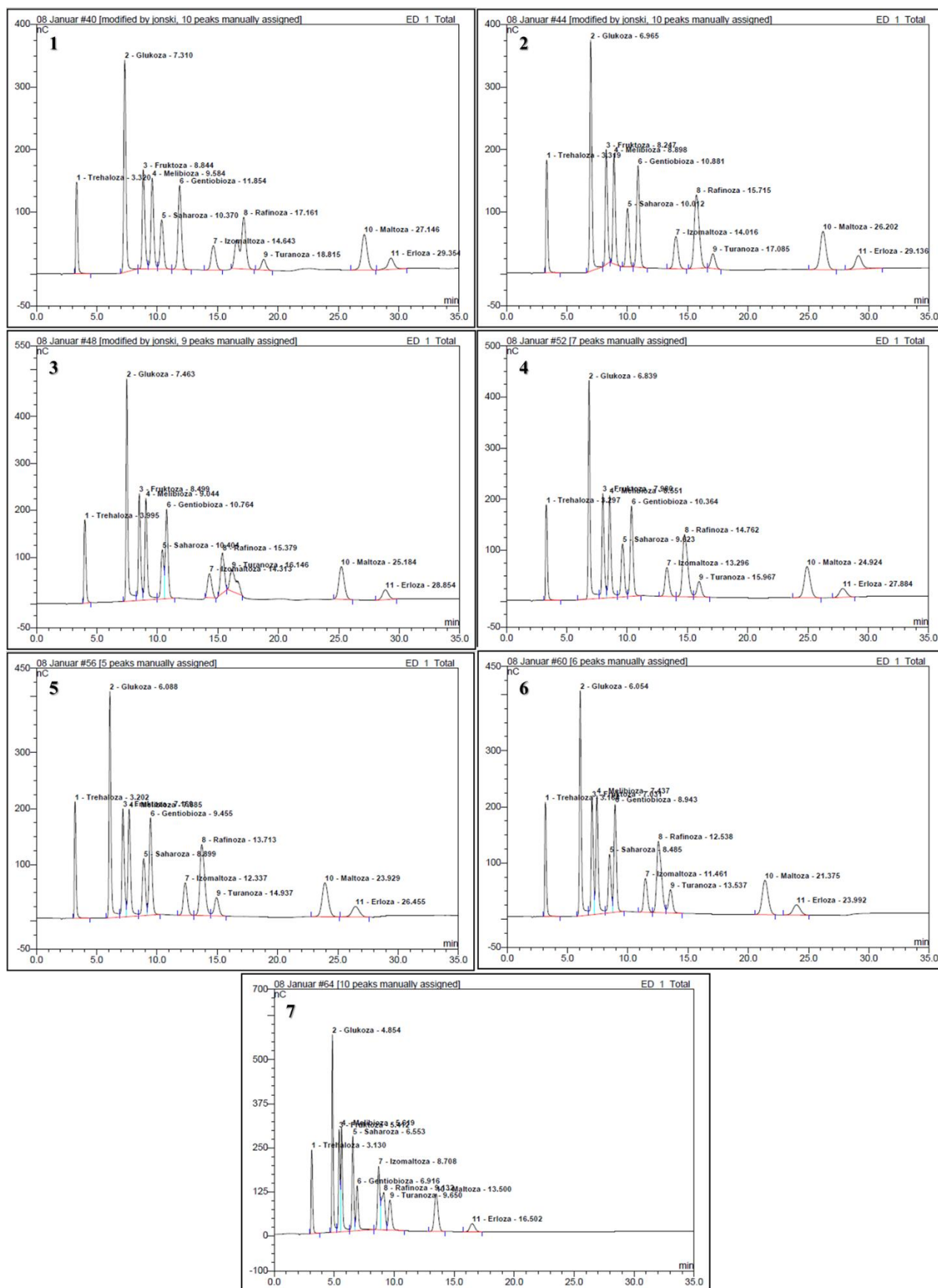
Pored specifičnosti biljnog porekla, šećerni profil meda ima ključnu ulogu u otkrivanju mogućih manipulacija tokom proizvodnje. Dodavanjem jeftinijih, industrijski proizvedenih šećernih sirupa u med dolazi do izmena u prirodnim odnosima pojedinačnih šećera u njemu. To znači da se profil šećera može koristiti kao svojevrsni „*otisak prsta*” meda, omogućavajući identifikaciju falsifikata i osiguranje kvaliteta proizvoda. Zbog toga je analiza šećera osnovna analitička alatka u kontroli kvaliteta meda i ispitivanju njegove autentičnosti.

4.5.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih uslova za određivanje profila šećera obuhvatila je optimizaciju uslova eluiranja i izvršena je variranjem gradijenta mobilne faze tokom procesa hromatografskog razdvajanja. Hromatogrami dobijeni primenom gradijenata navedenih u Eksperimentalnom delu prikazani su na Slici 48.

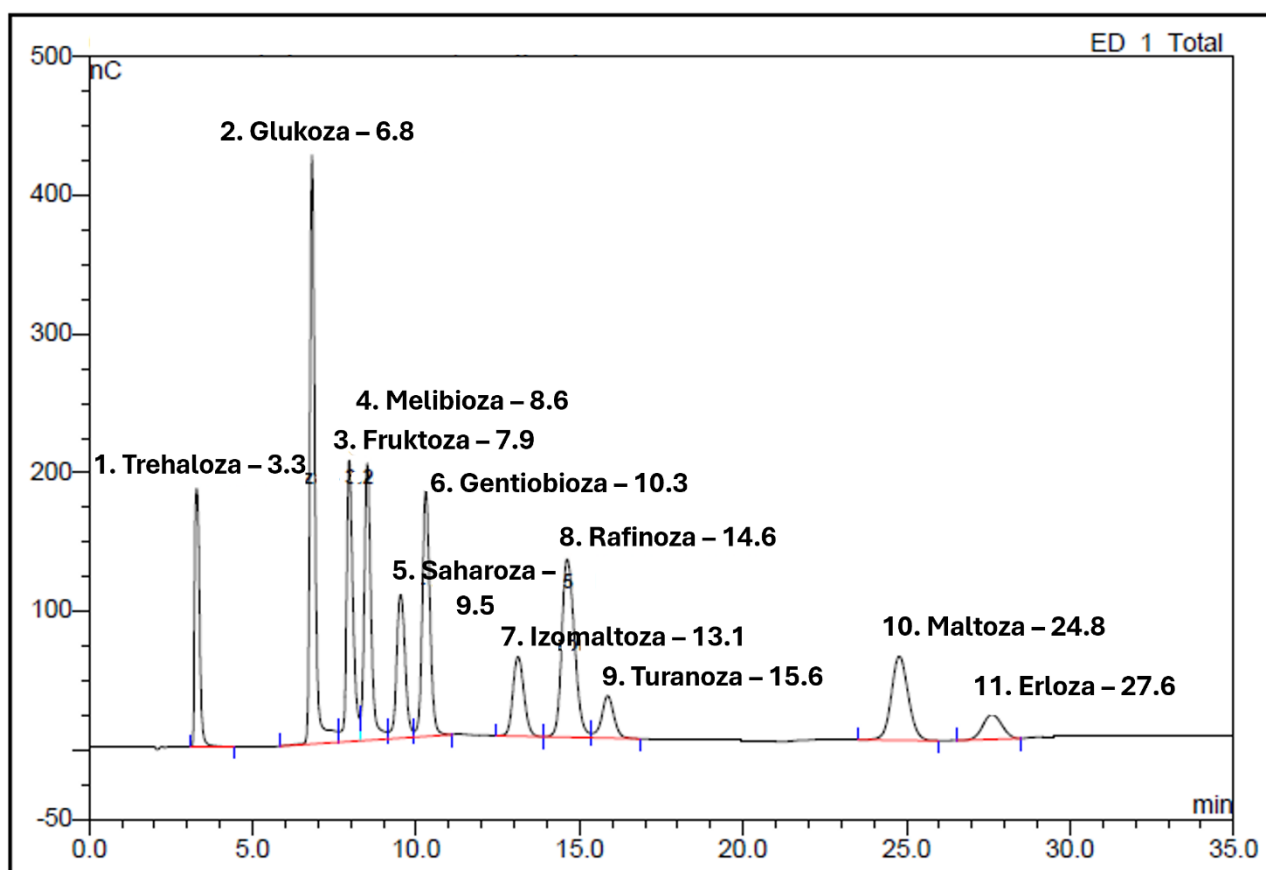
Hromatogrami označeni brojevima 5, 6 i 7 na Slici 48 nisu omogućili adekvatno razdvajanje šećera prisutnih u standardnoj smeši. Većina pikova šećera imala je smanjenu rezoluciju, što je rezultovalo preklapanjem pikova i otežanim tačnim određivanjem koncentracija kako u standardnim rastvorima tako i u analiziranim uzorcima meda. Kod primenjenih gradijenata velika preklapanja i niske rezolucije uočavaju se kod šećera fruktoze i melibioze kao i kod saharoze i gentiobioze (gradijenti 5 i 6), dok se još veća preklapanja (niže rezolucije) uočavaju kod primenjenog gradijenta 7 gde je eluiranje šećera bilo prebrzo usled veće koncentracije NaOH (povećane sa 25% na 35% udela u mobilnoj fazi). Analizom hromatograma 5, 6 i 7 (Slika 48) ustanovljeno je da povišene koncentracije NaOH u njima dovode do neadekvatnog hromatografskog razdvajanja strukturno sličnih šećera.

Suprotno tome, hromatogrami dobijeni primenom gradijenata 1, 2 i 3 pokazali su bolje performanse u razdvajanju komponenti, pri čemu je postignuta zadovoljavajuća rezolucija pikova, dovoljna za potvrdu razdvajanja pojedinačnih strukturno sličnih šećera. Na hromatogramu (Slika 48), označenom brojem 1, uočava se cepanje pika rafinoze (*eng. Peak splitting*), a slično se može videti i na hromatogramu primenjenog gradijenta 3, gde je pik turanoze pocepan i sa nešto nižom rezolucijom, skoro pripojen piku rafinoze. Gradijent 4 za razliku od gradijenta 2, imao je nešto bolju rezoluciju i razliku između retencionih vremena razdvojenih šećera. Na osnovu najvišeg nivoa rezolucije i optimalnog razdvajanja šećera, gradijent 4 odabran je kao optimalan za dalju primenu. Ovaj gradijent karakteriše upotreba niže koncentracije NaOH tokom eluiranja, čime je obezbeđeno dovoljno vremena za odvojeno eluiranje mono-, di- i oligosaharida prisutnih u standardnoj smeši uz ukupno vreme analize od 35 minuta.



Slika 48. Hromatogrami standardne serije šećera na kojima su primenjeni različiti optimizovani gradijenti (1 – 7) za razdvajanje šećera

Analizom hromatograma prikazanog na Slici 49 mogu se uočiti jasno razdvojeni pikovi multikomponentnog standardnog rastvora šećera. Za potrebe kvantifikacije primenjena je standardna smeša od ukupno 11 strukturno različitih šećera, među kojima su dva monosaharida (glukoza i fruktoza), sedam disaharida (trehaloza, melibioza, saharoza, gentiobioza, izomaltoza, maltoza i turanoza), jedan trisaharid (rafinoza) i jedan tetrasaharid (erloza). Redosled eluiranja analiziranih šećera primarno zavisi od njihove sposobnosti i afiniteta vezivanja za stacionarnu fazu upotrebene kolone CarboPac PA100, kao i od njihove strukturne složenosti, odnosno broja monomernih jedinica i prisustva redukujuće ili neredukujuće funkcionalne grupe. U skladu sa primenjenim hromatografskim sistemom, eluiranje na ovoj koloni započinje monosaharidima. Ipak, specifičnost eluiranja ogleda se i u činjenici da se trehaloza, iako disaharid, eluira pre pojedinih monosaharida, što ukazuje na izražen uticaj strukture molekula na afinitet prema stacionarnoj fazi.



Slika 49. Hromatogram standardne serije šećera razdvojenih primenom optimizovanog gradijenta

4.5.2. Validacija metode

Validacija razvijene metode sastojala se u sveobuhvatnom ispitivanju performansi optimizovane metode razdvajanja šećera primenom HPAEC–PAD tehnike. U okviru validacije, ispitivane su ključne analitičke karakteristike metode, uključujući linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, analitički prinos, preciznost i tačnost (Prilog 7).

Linearnost metode procenjena je primenom linearne regresije, poređenjem površina pikova sa odgovarajućim koncentracijama pet standardnih rastvora. Koeficijenti determinacije (Tabela 10) za sve analizirane šećere bili su veći od 0,9999, što ukazuje na izrazito visoku linearnu zavisnost između kalibracionih tačaka, sa minimalnim odstupanjima i niskim vrednostima reziduala. Modeli su dodatno ocenjeni preko standardne greške regresije ($S_{y/x}$), koja je varirala od 0,0052 za erlozu do 0,3851 za saharoza. Niske vrednosti $S_{y/x}$ ukazuju na blisko raspoređene podatke oko regresione linije, što potvrđuje dobro prilagođavanje modela eksperimentalnim podacima. Relativne standardne devijacije

određene na osnovu $S_{y/x}$ ($RSD S_{y/x}$, %) kretale su se između 0,38% i 0,58%, dodatno potvrđujući visok kvalitet linearnih modela. Visoke vrednosti F -parametra (> 60000) i Studentovog t -parametra (> 200) ukazuju na statistički značajnu linearnost i pouzdanost kalibracionih modela¹⁷⁸.

Tabela 10. Statistički parametri validacije metode za određivanje šećera u medu

Parametar	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
r^2	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
$S_{y/x}$	0,1445	0,2513	0,3851	0,0554	0,1486	0,1867	0,0052
$RSD S_{y/x}$ (%)	0,47	0,57	0,58	0,38	0,46	0,52	0,57
F	64178	63537	62381	161590	106934	84555	66082
t	253	252	250	402	327	291	257
LOD (g/100 g)	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02
LOQ (g/100 g)	0,08	0,08	0,08	0,05	0,06	0,07	0,07
$\bar{x}$ (g/100 g)	0,0065	0,024	0,47	1,13	0,021	0,64	0,101
s (g/100 g)	0,0003	0,003	0,03	0,07	0,004	0,03	0,005
RSD_r (%)	5,14	9,09	4,60	5,90	18,53	4,19	4,09
R (g/100 g)	0,0009	0,007	0,07	0,2	0,01	0,08	0,02
RSD_{R-H} %	34,16	27,96	17,93	15,71	28,70	17,10	22,59
HorRat	0,15	0,33	0,26	0,38	0,65	0,25	0,18
Spike 75%	100	100	100	100	100	100	67
Spike 100%	100	101	100	100	101	100	72
Spike 125%	108	107	107	107	107	107	82

Ukoliko koncentracija analita u uzorku bude ispod vrednosti LOD, prisustvo analita se ne može pouzdano potvrditi, ali ni u potpunosti isključiti. Dobijene vrednosti LOD za analizirane šećere kretale su se u opsegu od 0,01 do 0,02 g/100 g, što ukazuje na visoku osetljivost metode i mogućnost detekcije analita čak i pri vrlo niskim koncentracijama¹⁴. Za kvantifikovane šećere LOQ je bila između 0,05 i 0,08 g/100 g, čime je potvrđena pogodnost metode za precizno određivanje i pri niskim koncentracijama^{14, 178, 179}.

Ponovljivost i reproduktivnost (obnovljivost) metode određene su kroz ponovljena merenja na zbirnom uzorku bagremovog meda. Analiza je sprovedena na 3 različite odvage istog uzorka, tokom 3 uzastopna dana, pri čemu je svakog dana izvršeno 6 ponovljenih merenja, što je rezultiralo sa ukupno 18 merenja. Preciznost metode izražena je vrednostima relativne standardne devijacije pri ponovljenim merenjima (RSD_r), relativne standardne devijacije reproduktivnosti (RSD_{R-H}), kao i HorRat koeficijentom, za svaki pojedinačno kvantifikovani šećer^{178, 179}.

Standardne devijacije određivanja (S_r) bile su niske za sve analizirane šećere, ukazujući na visoku ponovljivost metode. Poređenjem pojedinačnih sadržaja i pripadajućih RSD_r vrednosti (%), utvrđeno je da je najmanju preciznost imalo određivanje rafinoze ($RSD_r = 18,53\%$), dok su najpreciznije određeni šećeri maltoza, erloza, saharoza i trehaloza, sa RSD_r vrednostima u rasponu od 4,09% do 5,14%. Za dodatnu procenu kvaliteta metode korišćen je HorRat koeficijent. HorRat vrednosti u intervalu od 0,5 do 2 smatraju se prihvatljivim, dok vrednosti niže od 0,5 ukazuju na izuzetno visoku preciznost metode. Svi analizirani šećeri imali su HorRat vrednosti ispod 0,5, izuzev rafinoze koja je imala HorRat od 0,65, što takođe spada u prihvatljiv raspon. Ovi rezultati potvrđuju da optimizovana

metoda ispunjava zahtevane kriterijume za preciznost i može se smatrati pouzdanom za kvantifikaciju šećera u uzorcima meda^{122, 178, 179}.

Tačnost razvijene metode ispitana je određivanjem analitičkog prinosa (*recovery test*). Analitički prinos je određivan dodatkom poznatih koncentracija pojedinačnih standarda šećera (spajkovanjem) u uzorke meda, pri čemu su analizirani nivoi dodatka od 75%, 100% i 125% u odnosu na početnu koncentraciju analita. Ova procedura omogućava procenu eventualnog uticaja matriksa uzorka na tačnost kvantifikacije.

Dobijene vrednosti analitičkog prinosa za šećere trehalozu, melibiozu, saharozu, izomaltozu, rafinozu i maltozu kretale su se u opsegu od 100% do 108%, što ukazuje na visoku tačnost i pouzdanost validovane metode za ove analite. Nasuprot tome, vrednosti analitičkog prinosa za erlozu bile su niže, u rasponu od 67% do 82%, što ukazuje na nešto smanjenu tačnost određivanja ovog šećera u analiziranim uslovima. Ipak, i u ovom slučaju rezultati ostaju u prihvatljivim granicama za analitičke metode koje uključuju složene matrikse poput meda^{178, 179}.

4.5.3. Analiza profila šećera

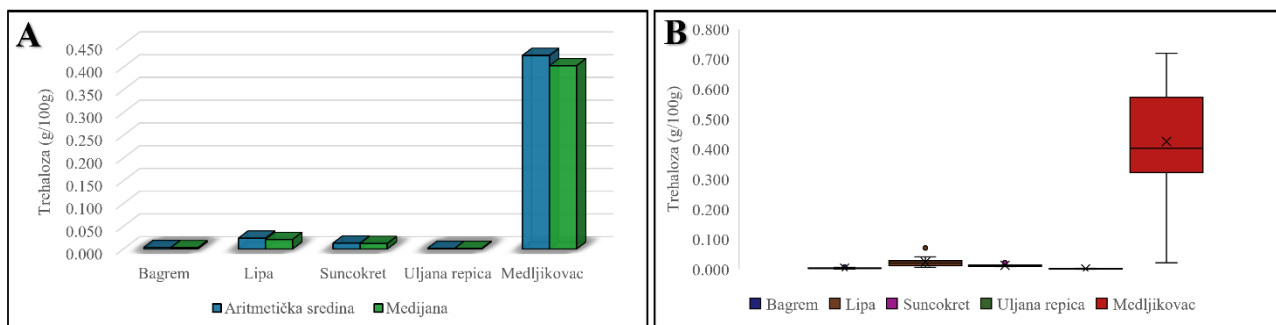
Rezultati određivanja profila šećera uzoraka, izraženi kao srednja vrednost $\pm$ relativna standardna devijacija, prikazani su u Prilogu 8, dok su u Tabeli 11 predstavljeni parametri deskriptivne statistike (za autentične uzorke) za svaku analiziranu biljnu vrstu meda, uključujući minimalne i maksimalne vrednosti, aritmetičke sredine, medijane i standardne devijacije ispitivanih parametara.

Sadržaj fruktoze (Slika 35), glukoze (Slika 36) i zbir ovih šećera kod analiziranih uzoraka meda detaljno je razmatran i u okviru diskusije fizičko–hemijskih parametara.

Sadržaj saharoze u medu predstavlja značajan parametar u analizi šećernog sastava i proceni autentičnosti proizvoda. Saharoza prirodno dospeva u med putem nektara određenih biljnih vrsta koje sadrže veće koncentracije ovog disaharida. Međutim, njen povišen sadržaj može ukazivati na tehnološke nepravilnosti ili namerno dodavanje u postupku krivotvorenja meda. Naime, prihranjivanje pčela saharoznim sirupima tokom perioda sakupljanja nektara može rezultovati povećanom koncentracijom saharoze u medu, što je potvrđeno u više studija. Ipak, pojedina istraživanja su pokazala da ovaj parametar ne poseduje dovoljnu specifičnost, budući da se u nekim slučajevima sadržaj saharoze u autentičnom medu može preklapati sa onim u falsifikovanim uzorcima, čime se smanjuje njegova pouzdanost kao jedinstvenog indikatora autentičnosti¹⁸⁰. Sadržaj saharoze (Slika 37) u analiziranim uzorcima bagremovog meda kretao se od 0,27 do 0,59 g/100 g, uz aritmetičku sredinu od 0,47 g/100 g i medijanu od 0,48 g/100 g. Standardna devijacija od 0,06 ukazuje na vrlo ujednačenu i simetričnu raspodelu rezultata, a dobijene vrednosti su bile u saglasnosti sa relevantnim literaturnim podacima^{29, 146, 147, 166, 167, 170, 174}. Kod lipovog meda, sadržaj saharoze varirao je od 0,02 do 0,64 g/100 g, sa srednjom vrednošću od 0,39 g/100 g i medijanom od 0,45 g/100 g, uz nešto veću standardnu devijaciju (0,20), što ukazuje na širu rasprostranjenost rezultata, ali i dalje u okviru očekivanih granica saglasnih podacima iz literature^{20, 21, 170, 174, 181}. Slični rezultati su dobijeni i za suncokretov i med od uljane repice (Prilog 8). Medljikovci su imali najširi raspon sadržaja saharoze, od 0,00 do 1,51 g/100 g, pri čemu je aritmetička sredina iznosila 0,29 g/100 g, a medijana 0,06 g/100 g.

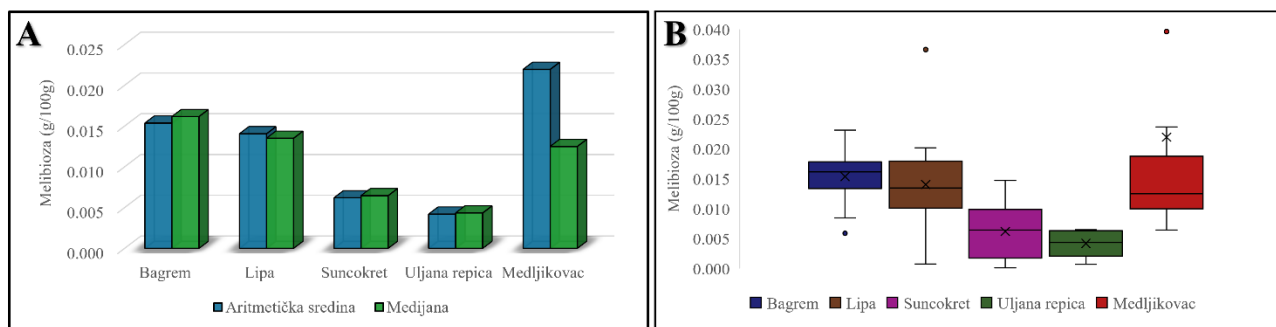
Trehaloza je disaharid koji se u medu javlja u veoma niskim koncentracijama i smatra se jednim od retko prisutnih šećera. Njeno prisustvo se najčešće povezuje sa mikrobiološkom aktivnošću, kao i sa procesima razgradnje složenijih šećera tokom skladištenja meda. Ovaj šećer može poticati iz različitih izvora, uključujući mikroorganizme, gljivice i metaboličke procese koji se odvijaju tokom prerade nektara. Trehaloza je poznata po svojoj zaštitnoj ulozi u stresnim uslovima kod različitih organizama, uključujući bakterije, kvasce, gljivice, insekte i beskičmenjake. Kod pčela, trehaloza predstavlja važan izvor energije i nalazi se u hemolimfi, pri čemu se može preneti u med tokom njegovog nastanka. Njena koncentracija u medu može varirati u zavisnosti od biljnog porekla nektara i

fiziološkog stanja pčelinje zajednice^{182, 183}. Analiza ispitivanih uzoraka pokazala je razliku u sadržaju trehaloze između nektarnih medova i medljikovca. U svim nektarnim vrstama sadržaj trehaloze bio je očekivano nizak. Unutar grupe nektarnih medova, najviše vrednosti i najveća varijabilnost zabeleženi su kod lipovog meda, dok je kod bagremovog i meda od uljane repice trehaloza detektovana gotovo u tragovima. Nasuprot tome, medljikovci su se jasno izdvojili višestruko većim koncentracijama. Ovi rezultati potvrđuju dominantno prisustvo trehaloze u medljici. Distribucija vrednosti unutar biljnih vrsta meda bila je pretežno simetrična (Slika 50), a utvrđeni trendovi u potpunosti su usklađeni sa raspoloživim literaturnim podacima^{27, 30, 34, 58, 137, 168}. Za uzorke u kojima je sadržaj trehaloze bio ispod granice kvantifikacije, izvršena je ekstrapolacija rezultata korišćenjem odgovarajućeg softverskog alata, čime je omogućeno njihovo uključivanje u dalju statističku analizu.



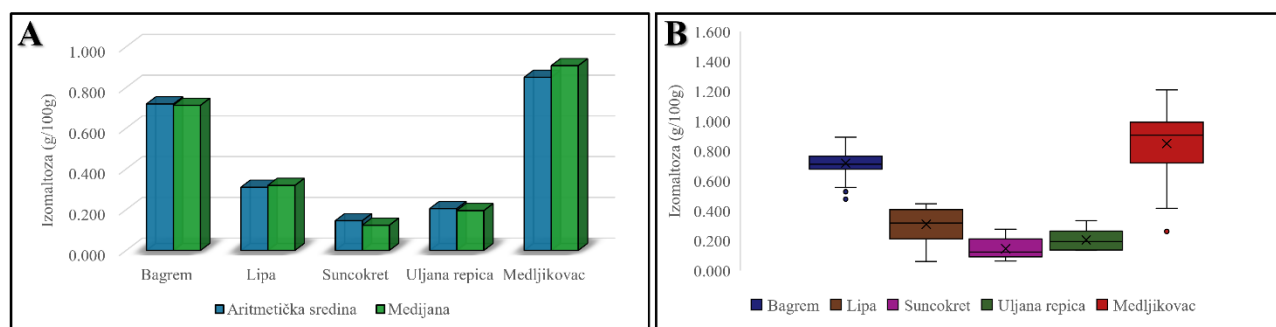
Slika 50. Sadržaj trehaloze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Melibioza je disaharid sastavljen od galaktoze i glukoze, povezanih $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidnom vezom. Ovaj šećer se u medu retko detektuje, a kada je prisutan, njegova koncentracija je veoma niska. Poreklo melibioze u medu može se povezati sa razgradnjom rafinoze – trisaharida koji se sastoji od galaktoze, glukoze i fruktoze – putem enzima sa β -fruktozidaznom aktivnošću. Alternativno, melibioza može poticati i iz biljnih izvora, posebno onih koji pripadaju porodici Fabaceae, poznatih po prisustvu oligosaharida iz galaktozne serije. Takođe je moguća i sinteza melibioze metaboličkom aktivnošću pčela ili mikroorganizama prisutnih u nektaru ili saću. Iako se ne koristi rutinski kao marker porekla, njeno prisustvo može biti od interesa u širim profilima oligosaharida u medu u smislu falsifikovanja meda dodatkom strane invertaze¹⁸⁴. Sadržaj melibioze u bagremovom medu kretao se u rasponu od 0,006 do 0,023 g/100 g, dok je kod lipovog meda detektovan u intervalu od 0,001 do 0,037 g/100 g. U suncokretovom medu i medu od uljane repice zabeležene su još niže vrednosti, sa opsezima od 0,000 do 0,015 g/100 g, odnosno od 0,001 do 0,007 g/100 g. Nasuprot nektarnim vrstama, medljikovci su se jasno izdvojili znatno višim sadržajem ovog disaharida, koji je varirao od 0,01 do 0,13 g/100 g (Slika 51). Utvrđeni rasponi za sve ispitivane vrste meda u potpunosti su usklađeni sa dostupnim literaturnim podacima^{20, 181}. Za sve druge ispitivane biljne vrste meda sadržaj melibioze bio je ispod granice kvantifikacije ali je, kao i u slučaju trehaloze, radi dalje statističke obrade podataka i izvlačenja relevantnih zaključaka, izvršena ekstrapolacija rezultata.



Slika 51. Sadržaj melibioze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

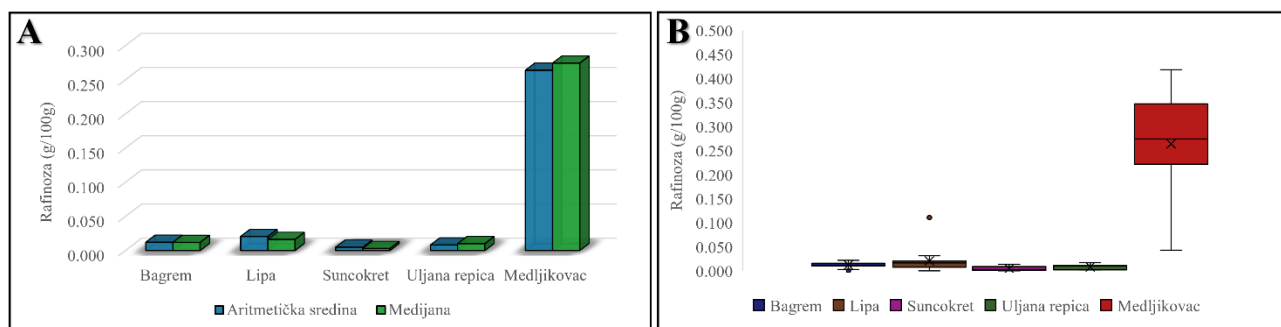
Izomaltoza (α -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)-D-glukopiranozid) je disaharid koji se sastoji od dve jedinice glukoze povezane α (1 $\rightarrow$ 6) glikozidnom vezom. U medu se javlja u niskim koncentracijama, a njeno prisustvo se uglavnom pripisuje enzimskoj aktivnosti pčela ili enzimskoj preradi polisaharida prisutnih u nektaru. Smatra se da izomaltoza može nastati tokom delimične hidrolize dekstrina i skroba, putem delovanja α -glukozidaza koje katalizuju transglukozilaciju. Dodatno, određeni izvori sugerisu da ovaj šećer može poticati iz biljaka koje prirodno sadrže glukane sa α (1 $\rightarrow$ 6) vezama ili iz sirupa na bazi skroba koji se koriste za prihranu pčela. Zbog svoje strukture, izomaltoza može ukazivati na prisustvo produkata delimične razgradnje skroba i može poslužiti kao indikator tehnološke obrade^{20, 168}. Sadržaj izomaltoze u bagremovom medu kretao se u rasponu od 0,48 do 0,89 g/100 g. U ostalim nektarnim vrstama zabeležene su niže vrednosti: kod lipovog meda od 0,06 do 0,45 g/100 g, kod meda od uljane repice od 0,13 do 0,33 g/100 g, a kod suncokretovog od 0,06 do 0,28 g/100 g. Kao što je i očekivano, medljikovci su se jasno izdvojili najvišim koncentracijama ovog disaharida, koje su varirale od 0,26 do 1,21 g/100 g (Slika 52). Raspodela podataka unutar svih ispitivanih klasa bila je pretežno simetrična, a utvrđeni rasponi su u potpunosti usklađeni sa raspoloživim literaturnim podacima^{20, 21, 26–28, 30, 34, 58, 137, 168, 181, 185}.



Slika 52. Sadržaj izomaltoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

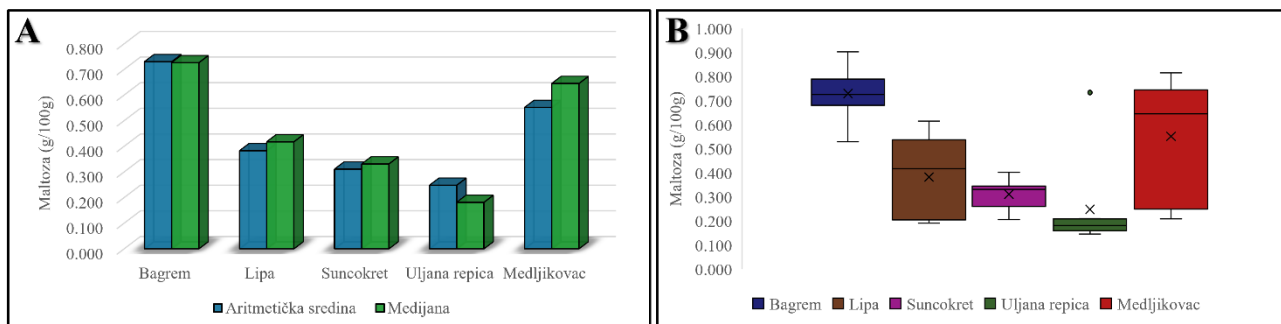
Rafinoza je trisaharid koji se sastoji od galaktoze, glukoze i fruktoze, pri čemu glukoza funkcioniše kao monosaharidni most između galaktozne i fruktozne jedinice. Hemijski, ovaj šećer sadrži i α - i β -glikozidne veze, što omogućava njenu hidrolizu putem enzima sa α -glikozidnom aktivnošću do D-galaktoze i saharoze, odnosno pod dejstvom enzima sa β -glikozidnom aktivnošću do melibioze i D-fruktoze. Iako njeno tačno poreklo u medu nije u potpunosti razjašnjeno, pretpostavlja se da rafinoza može poticati iz nektara određenih biljnih vrsta, naročito iz porodice Fabaceae, ili da može biti rezultat kontaminacije meda medljikovcem. Zbog svog potencijalnog biljnog porekla, rafinoza se razmatra kao mogući marker za identifikaciju specifičnih biljnih vrsta meda¹⁸³. Sadržaj rafinoze u nektarnim vrstama meda detektovan je u veoma niskim granicama: kod bagremovog meda od 0,000 do 0,022 g/100 g, lipovog od 0,000 do 0,111 g/100 g, suncokretovog od 0,000 do 0,014 g/100 g, a kod meda od uljane repice od 0,002 do 0,017 g/100 g. Nasuprot tome, medljikovci su se jasno izdvojili

značajno većim koncentracijama ovog šećera, u rasponu od 0,04 do 0,42 g/100 g (Slika 53). Distribucija vrednosti unutar klasa bila je pretežno simetrična, a utvrđeni opsezi u potpunosti su usklađeni sa raspoloživim literaturnim podacima. Kod nektarnih vrsta meda koncentracije rafinoze nalazile su se ispod granice kvantifikacije, te je izvršena ekstrapolacija rezultata^{20, 21, 27, 137, 168, 181}.



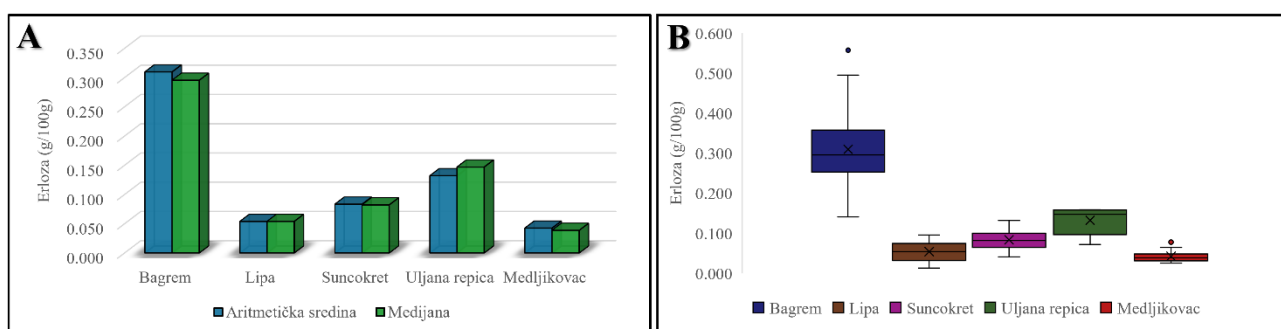
Slika 53. Sadržaj rafinoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Maltoza je redukujući disaharid koji se sastoji od dve glukozne jedinice povezane $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnom vezom. Nastaje razgradnjom skroba delimičnom hidrolizom (enzimski), a prirodno je prisutna u proklijalom zrnu kukuruza, te i u malim količinama u kukuruznom sirupu. U medu se maltoza javlja u relativno niskim koncentracijama, a njeno poreklo može biti višestruko. Jedan od mogućih izvora jeste delimična enzimska razgradnja skroba prisutnog u nektaru biljaka, pri čemu pčele, putem amilolitičkih enzima, mogu doprineti formiranju maltoze tokom prerade nektara. Takođe, određene biljne vrste prirodno sadrže tragove maltoze u svom nektaru. Dodatno, prisustvo maltoze u medu može poticati i iz veštačke ishrane pčela industrijskim sirupima na bazi skroba (npr. glukozni ili kukuruzni sirup), što može dovesti do njenog povećanog sadržaja. U literaturi je navedeno da normalna koncentracija maltoze u prirodnom medu iznosi manje od 0,5%, dok veće vrednosti mogu ukazivati na moguće falsifikovanje meda ili dodatak skrobnih derivata. Stoga, iako je maltoza prirodni sastojak meda, njena količina može poslužiti kao jedan od parametara u oceni autentičnosti proizvoda⁸⁷. Sadržaj maltoze u bagremovom medu zabeležen je u opsegu od 0,53 do 0,90 g/100 g. Kod ostalih nektarnih vrsta detektovane su niže vrednosti: u lipovom medu od 0,19 do 0,61 g/100 g, suncokretovom od 0,21 do 0,40 g/100 g, a u medu od uljane repice od 0,15 do 0,73 g/100 g. U uzorcima medljikovca koncentracija ovog disaharida varirala je između 0,21 i 0,82 g/100 g. Raspodela rezultata unutar svih ispitivanih klasa bila je simetrična, a utvrđeni opsezi u potpunosti su usklađeni sa raspoloživim literaturnim podacima^{26, 27, 30, 34, 137, 181, 185}. Shodno dobijenim rezultatima, najveći sadržaj maltoze registrovan je u bagremovom medu, dok je med od uljane repice bio najsiromašniji po ovom parametru (Slika 54).



Slika 54. Sadržaj maltoze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Erloza nastaje iz saharoze putem metaboličkih aktivnosti pčela, pri čemu enzim invertaza (β -fruktofuranozidaza) i dodatna aktivnost α -glukozidaze učestvuju u nastanku ovog šećera. Konkretno, radi se o reakciji transglukozilacije u kojoj glukozna jedinica iz glukoze ili drugih donorskih šećera biva prenet na saharozu, formirajući erlozu (α -D-glukopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-fruktofuranozid). Tokom skladištenja meda, koncentracija erloze može varirati zbog daljih enzimskih razgradnji, prvenstveno delovanjem α -glukozidaze, što je naročito izraženo u svežim ili termički neobrađenim uzorcima. Pored metaboličkog porekla, prisustvo erloze u medu takođe može odražavati fiziološke i enzimske karakteristike pčelinje zajednice, kao i uslove prerade i skladištenja meda. Sadržaj erloze u bagremovom medu zabeležen je u opsegu od 0,14 do 0,56 g/100 g. Kod ostalih ispitivanih vrsta detektovane su značajno niže vrednosti: u medu od uljane repice od 0,07 do 0,16 g/100 g, suncokretovom od 0,04 do 0,13 g/100 g, lipovom od 0,01 do 0,10 g/100 g, dok je u uzorcima medljikovca koncentracija ovog šećera varirala između 0,03 i 0,08 g/100 g. Na osnovu dobijenih vrednosti, jasno se uočava da je najveći sadržaj erloze zabeležen u bagremovom medu, čime se ova vrsta izdvaja u odnosu na ostale analizirane uzorke (Slika 55)^{20, 27, 34, 168, 181}.



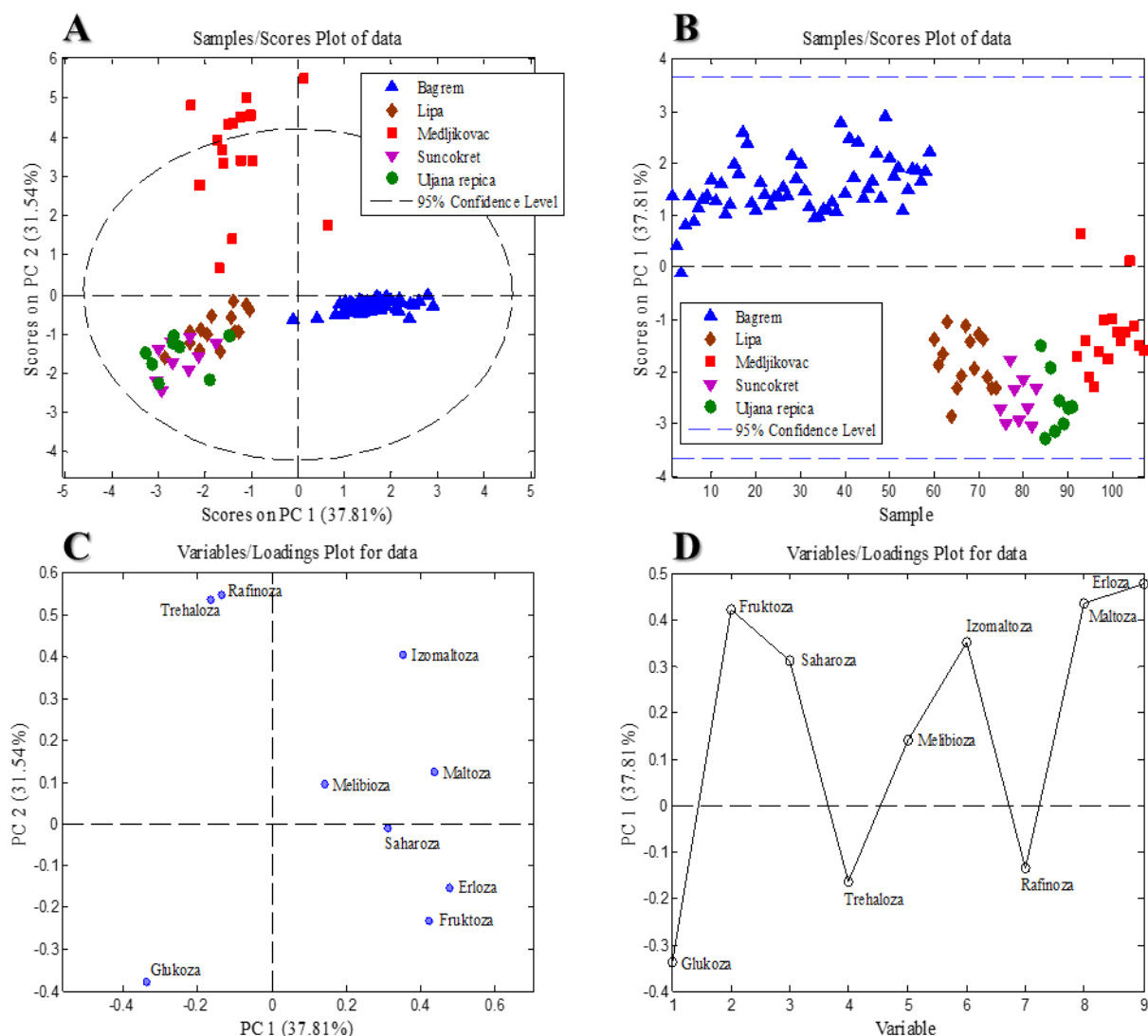
Slika 55. Sadržaj erloze u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Gentiobioza i turanoza, iako su bili validovani i određeni u zbirnom uzorku bagremovog meda, nisu detektovani niti kvantifikovani ni u jednom od analiziranih pojedinačnih uzoraka.

U cilju procene potencijala profila šećera za diferencijaciju meda prema biljnom poreklu, urađena je PCA. Dobijen je model od tri glavne komponente, koje kumulativno objašnjavaju 85,98% ukupne varijabilnosti među analiziranim uzorcima. Prva glavna komponenta obuhvata 37,81% ukupne varijanse, dok PC2 i PC3 doprinose sa dodatnih 31,54% i 16,63%, redom. Preostali deo varijabiliteta, sadržan u komponentama višeg reda, nije imao značajan doprinos u modelovanju strukture podataka.

Na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 56A), uočavaju se tri jasno definisana klastera. Uzorci bagremovog meda grupisani su pri pozitivnim vrednostima PC1 i negativnim vrednostima PC2, ukazujući na njihovu hemijsku specifičnost u odnosu na ostale analizirane vrste. Uzorci medljikovca formiraju zaseban klaster, karakterisan pozitivnim skorovima duž PC2 i negativnim vrednostima duž PC1. Treći klaster, koji obuhvata uzorke lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice, lociran je u domenu negativnih vrednosti obe komponente, sugerišući njihovu međusobnu sličnost u ispitivanim parametrima.

Detaljnijom analizom grafika koeficijenata latentnih varijabli (Slika 56C) identifikovan je značajan doprinos pojedinih šećera u procesu diferencijacije ispitivanih uzoraka meda. Fruktaza, saharaza i erloza, locirani u pozitivnom kvadrantu duž PC1 i negativnom duž PC2, pokazali su ključnu ulogu u razdvajanju bagremovog meda od ostalih vrsta. Nasuprot tome, rafinoza i trehaloza, pozicionirani u negativnom delu PC1 i pozitivnom delu PC2, doprineli su diferencijaciji uzoraka medljikovca. Glukoza, koja je orijentisana ka negativnim vrednostima PC1 i PC2, značajno je doprinela razgraničenju uzoraka lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice od ostalih tipova meda.



Slika 56. Analiza glavnih komponenata za profil šećera: A) grafik skorova latentnih varijabli B) skorovi latentnih varijabli duž PC1 C) grafik vektora latentnih varijabli D) grafik vektora latentnih varijabli za PC1

Rezultati PCA analize profila šećera ukazuju da oni, sami po sebi, nisu dovoljni za pouzdanu klasifikaciju meda prema biljnom poreklu već bi trebalo uključiti dodatne analitičke pokazatelje, kao što su fizičko–hemijski parametri i $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ odnosi.

Tabela 11. Parametri deskriptivne statistike za kvantifikovane šećere (g/100 g) uzoraka meda

Biljna vrsta meda	Parametar deskriptivne statistike	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
Bagrem	$X_{\min}$	25,2	41,1	0,000	0,006	0,27	0,48	0,000	0,53	0,14
	$X_{\max}$	28,3	43,2	0,012	0,023	0,59	0,89	0,022	0,90	0,56
	$\bar{x}$	26,7	42,2	0,003	0,015	0,47	0,72	0,012	0,73	0,31
	$\tilde{x}$	26,7	42,4	0,003	0,016	0,48	0,71	0,012	0,73	0,30
	s	0,6	0,5	0,002	0,004	0,06	0,08	0,004	0,08	0,08
Lipa	$X_{\min}$	27,3	34,5	0,007	0,001	0,02	0,06	0,000	0,19	0,01
	$X_{\max}$	35,6	40,5	0,070	0,037	0,64	0,45	0,111	0,61	0,10
	$\bar{x}$	31,8	37,1	0,024	0,014	0,39	0,31	0,021	0,38	0,05
	$\tilde{x}$	32,1	36,8	0,021	0,013	0,45	0,32	0,016	0,42	0,05
	s	2,4	1,7	0,016	0,008	0,20	0,12	0,027	0,15	0,03
Suncokret	$X_{\min}$	30,4	35,5	0,009	0,000	0,00	0,06	0,000	0,21	0,04
	$X_{\max}$	38,7	40,2	0,022	0,015	1,27	0,28	0,014	0,40	0,13
	$\bar{x}$	33,8	37,8	0,013	0,006	0,26	0,15	0,005	0,31	0,08
	$\tilde{x}$	33,8	38,2	0,012	0,006	0,11	0,12	0,003	0,33	0,08
	s	3,1	1,8	0,004	0,005	0,40	0,08	0,005	0,06	0,03
Uljana repica	$X_{\min}$	30,1	32,9	0,000	0,001	0,05	0,13	0,002	0,15	0,07
	$X_{\max}$	38,8	39,6	0,004	0,007	0,73	0,33	0,017	0,73	0,16
	$\bar{x}$	33,9	35,7	0,002	0,004	0,20	0,21	0,008	0,25	0,13
	$\tilde{x}$	33,1	35,2	0,001	0,004	0,16	0,20	0,010	0,18	0,15
	s	3,2	2,3	0,001	0,002	0,22	0,07	0,006	0,20	0,03
Medljikovac	$X_{\min}$	19,3	29,8	0,02	0,01	0,00	0,26	0,04	0,21	0,03
	$X_{\max}$	30,0	40,0	0,72	0,13	1,51	1,21	0,42	0,82	0,08
	$\bar{x}$	25,0	34,5	0,43	0,02	0,29	0,85	0,26	0,55	0,04
	$\tilde{x}$	25,4	34,7	0,40	0,01	0,06	0,91	0,27	0,64	0,04
	s	2,6	2,9	0,18	0,03	0,49	0,28	0,12	0,23	0,01

4.6. Integralni analitički pristup u detekciji prisustva egzogenih šećera

U okviru ovog istraživanja, radi dodatne provere autentičnosti i mogućeg prisustva šećernih sirupa u komercijalnim uzorcima meda, analiziran je zaseban set od 30 uzoraka koji se razlikuje od uzoraka korišćenih za ostala hemijska i fizičko–hemijska ispitivanja u okviru ove disertacije. Ovi dodatni uzorci, prikupljeni sa tržišta, poslužili su za optimizaciju HPTLC i HPAEC–PAD metoda u cilju detekcije potencijalnih falsifikata i uporedne procene sa referentnim uzorcima šećernih sirupa. U svrhu validacije metoda i interpretacije rezultata, korišćeni su sirupi različitog sastava: visoko–maltozni sirup (Tabela 12, uzorak 25), bombonski sirup (Tabela 12, uzorak 26), skrobno–glukozni sirup (Tabela 12, uzorak 27), fruktozni sirup (Tabela 12, uzorak 28) i invertni sirup (Tabela 12, uzorak 29). Analiza ovog dodatnog skupa omogućila je precizniju identifikaciju sumnjivih uzoraka i proširila diskusiju o granicama dozvoljenih vrednosti šećernih komponenata meda prema važećim standardima.

Radi potvrđivanja autentičnosti prikupljenih uzoraka meda, sadržaj šećera je analiziran primenom protokola koje je definisala Međunarodna komisija za med ¹³⁵, u skladu sa harmonizovanim metodama analize i preporukama Codex Alimentarius–a ¹. Uzorci označeni brojevima 1, 2, 4, 6, 16, 19, 21–24 (30,0% analiziranih uzoraka) pokazali su zbirni sadržaj fruktoze i glukoze manji od 60 g/100 g meda (Tabela 12), što je ispod minimalne granične vrednosti propisane pomenutim standardima. Shodno tome, navedeni uzorci klasifikovani su kao neautentični. Svi ostali analizirani uzorci ispunjavali su kriterijume autentičnosti, pri čemu je sadržaj ukupnih monosaharida (glukoze i fruktoze) bio veći od 60 g/100 g, dok je sadržaj saharoze bio manji od 5 g/100 g, što je u skladu sa zahtevima važećih propisa ^{2, 158}.

Deklarisani sastav šećera u analiziranim komercijalnim sirupima bio je sledeći: visokomaltozni sirup (uzorak 25) sadržao je 9% glukoze; bombonski sirup (uzorak 26) sastojao se isključivo od glukoze (100%); skrobno–glukozni sirup (uzorak 27) predstavljao je mešavinu glukoze, maltoze i viših saharida bez preciziranih udela pojedinačnih šećera; dok je fruktozni sirup (uzorak 28) sadržao 30 – 38% glukoze i 8,0 – 9,9% fruktoze. Izuzimajući visokomaltozni sirup, čiji je sadržaj glukoze bio uporediv s onim u prirodnom medu, svi ostali analizirani sirupi pokazali su znatno veći udeo glukoze u odnosu na med (Tabela 12). U svim glukoznim sirupima, sadržaj fruktoze bio je značajno manji u poređenju s medom, dok je u fruktoznom sirupu fruktoza bila prisutna u koncentracijama sličnim onima u medu. Invertni šećerni sirup (uzorak 29), nastao enzimskom ili kiselim hidrolizom disaharida saharoze, predstavlja mešavinu glukoze i fruktoze u približno jednakim udelima, pri čemu je njihov sadržaj bio uporediv sa vrednostima karakterističnim za med (Tabela 12).

U cilju dodatne potvrde autentičnosti uzoraka meda, urađena je analiza odnosa stabilnih izotopa ugljenika (Tabela 12). Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ u analiziranim uzorcima meda kretale su se u intervalu od -14,00‰ do -28,10‰, dok su $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti izolovanih proteina varirale između -21,00‰ i -27,00‰. Uzorci kod kojih je razlika između $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti proteina i meda ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) veća od 1‰ klasifikovani su kao sumnjivi u smislu potencijalnog prisustva dodatnih šećera poreklom od C4 biljaka. Na osnovu ovog kriterijuma, svi uzorci kod kojih je izračunata $\Delta\delta^{13}\text{C}$ vrednost veća od 1‰ (uzorci 9–24, Tabela 12) smatraju se sumnjivim prema AOAC 998.12 metodi. Dodatno, radi poređenja sa kriterijumima koji se zasnivaju na vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ meda, rezultati su interpretirani i u skladu sa podacima iz literature ⁸⁵. Prema ovom pristupu, sedam uzoraka (1, 2, 4, 7, 8, 12 i 20) imalo je $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti pozitivnije od -21,5‰, što ukazuje na moguće krivotvorenje dodatkom šećera poreklom od C4 biljaka. Osmam uzoraka (3, 5, 9, 10, 13, 14, 15 i 16) imalo je $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti u opsegu od -23,5‰ do -21,5‰ i klasifikovano je kao sumnjivo prema navodima Donga i saradnika ⁸⁵ (Tabela 12).

Tabela 12. Sadržaj šećera i odnosa stabilnih izotopa ugljenika odabranih medova i šećernih sirupa

R.b.	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (p- m), (‰)	Sadržaj šećera C4 biljaka (%)	Klasifi- kacija
1	27,2 ± 2,9	30,0 ± 3,1	0,42 ± 0,03	-17,9 ± 0,2	n.i.	-	n.k.	Nije izolovan protein
2	25,8 ± 2,7	29,2 ± 3,0	0,71 ± 0,05	-16,7 ± 0,2	n.i.	-	n.k.	
3	31,0 ± 3,3	41,0 ± 4,2	n.d.	-22,2 ± 0,3	n.i.	-	n.k.	
4	22,9 ± 2,4	25,3 ± 2,6	1,32 ± 0,10	-17,0 ± 0,2	n.i.	-	n.k.	
5	31,6 ± 3,4	42,0 ± 4,3	n.d.	-21,4 ± 0,3	n.i.	-	n.k.	
6	25,6 ± 2,7	28,5 ± 2,9	0,22 ± 0,02	-24,8 ± 0,3	n.i.	-	n.k.	
7	26,0 ± 2,8	27,9 ± 2,8	0,47 ± 0,04	-16,7 ± 0,2	n.i.	-	n.k.	
8	27,0 ± 2,9	28,3 ± 2,9	0,52 ± 0,04	-16,7 ± 0,2	n.i.	-	n.k.	
9	32,0 ± 3,4	39,3 ± 4,0	n.d.	-22,2 ± 0,3	-25,4 ± 0,3	-3,2	20,6 ± 2,8	Šećeri poreklom iz C4 biljaka > 7%
10	32,2 ± 3,4	39,5 ± 4,0	n.d.	-22,9 ± 0,3	-24,2 ± 0,3	-1,3	8,8 ± 3,0	
11	30,1 ± 3,2	33,2 ± 3,4	n.d.	-24,4 ± 0,3	-26,7 ± 0,3	-2,3	13,5 ± 2,8	
12	26,5 ± 2,8	35,1 ± 3,6	n.d.	-14,0 ± 0,2	-23,8 ± 0,3	-9,8	69,8 ± 2,7	
13	32,3 ± 3,4	37,8 ± 3,8	n.d.	-22,7 ± 0,3	-25,4 ± 0,3	-2,7	17,4 ± 2,9	
14	32,5 ± 3,5	40,5 ± 4,1	n.d.	-22,9 ± 0,4	-25,2 ± 0,4	-2,3	14,8 ± 3,6	
15	30,1 ± 3,2	40,7 ± 4,1	n.d.	-22,8 ± 0,3	-26,4 ± 0,3	-3,6	21,6 ± 2,7	
16	21,1 ± 2,3	28,5 ± 2,9	n.d.	-22,2 ± 0,3	-27,0 ± 0,3	-4,8	27,7 ± 2,6	
17	32,9 ± 3,5	46,6 ± 4,7	n.d.	-24,0 ± 0,3	-21,0 ± 0,3	3,0	-26,2 ± 3,7	Šećeri poreklom iz C4 biljaka < -7%
18	34,1 ± 3,6	32,3 ± 3,3	n.d.	-26,1 ± 0,4	-24,2 ± 0,3	1,9	-13,0 ± 3,2	
19	21,4 ± 2,3	27,1 ± 2,8	n.d.	-28,1 ± 0,4	-26,8 ± 0,3	1,3	-7,3 ± 3,0	
20	26,8 ± 2,9	34,7 ± 3,5	n.d.	-20,0 ± 0,3	-25,4 ± 0,3	-5,4	-34,6 ± 2,7	
21	23,6 ± 2,5	28,4 ± 2,9	n.d.	-27,2 ± 0,4	-25,7 ± 0,3	1,5	-9,5 ± 3,1	
22	23,3 ± 2,5	28,0 ± 2,8	n.d.	-27,2 ± 0,4	-26,0 ± 0,3	1,2	-7,3 ± 3,0	
23	24,2 ± 2,6	27,4 ± 2,8	n.d.	-26,3 ± 0,4	-24,9 ± 0,3	1,4	-9,2 ± 3,1	
24	24,2 ± 2,6	29,7 ± 3,0	0,61 ± 0,05	-25,6 ± 0,4	-22,9 ± 0,3	2,7	-20,0 ± 3,4	
25	28,8 ± 3,1	0,7 ± 0,1	n.d.	-	-	-	-	Sirupi
26	66,8 ± 7,1	1,2 ± 0,1	n.d.	-	-	-	-	
27	94,4 ± 10,1	0,8 ± 0,1	2,4 ± 0,2	-	-	-	-	
28	65,9 ± 7,0	25,5 ± 2,6	n.d.	-	-	-	-	
29	34,8 ± 3,7	38,5 ± 3,9	n.d.	-	-	-	-	
30	100 ± 10	100 ± 10	10,0 ± 0,8	-	-	-	-	Standard
31	31,4 ± 3,4	41,4 ± 4,2	n.d.	-24,9 ± 1,1	-24,6 ± 1,3	0,3	-1,4 ± 0,1	Šećeri poreklom iz C4 biljaka između - 7% i 7%
32	34,1 ± 3,6	37,7 ± 3,8	n.d.	-25,9 ± 1,1	-25,1 ± 1,3	0,8	-5,3 ± 0,4	
33	23,9 ± 2,6	46,0 ± 4,7	n.d.	-24,3 ± 1,0	-23,8 ± 1,2	0,5	-3,3 ± 0,2	
34	31,0 ± 3,3	39,8 ± 4,0	n.d.	-25,6 ± 1,1	-26,2 ± 1,3	-0,6	3,9 ± 0,3	
35	31,0 ± 3,3	33,6 ± 3,4	n.d.	-25,8 ± 1,1	-25,1 ± 1,3	0,7	-4,3 ± 0,3	
36	28,1 ± 3,0	36,7 ± 3,7	n.d.	-26,4 ± 1,1	-26,2 ± 1,3	0,2	-1,1 ± 0,1	

n.i. - nije izolovan; n.k. - nije kvantifikovan; n.d. - nije detektovan

Prema standardnoj AOAC 998.12 metodi uzorci sa sadržajem C4 šećera većim od +7% klasifikuju se kao neautentični, dok se ostali uzorci, uključujući i one sa negativnom vrednošću ovog parametra označavaju kao med bez prisustva C4 šećera. Međutim, odsustvo C4 šećera ne isključuje da su takvi

uzorci krivotvoreni sirupima porekla od C3 biljaka⁸⁵. Prema standardnoj AOAC 998.12 metodi osam uzoraka (9–16) imalo je sadržaj C4 šećera veći od 7%, što ih klasifikuje kao neautentične. Nasuprot tome, trinaest uzoraka je imalo negativne vrednosti za sadržaj C4 šećera koji se, saglasno pomenutoj metodi navodi kao 0%.

Uzorci iz kojih nije bilo moguće izolovati protein (Tabela 12, uzorci 1–8), odnosno primeniti pomenutu metodu, izostavljeni iz ovog segmenta interpretacije rezultata kao veoma sumnjivi. Naime, ranija istraživanja ukazuju na to da nemogućnost izolovanja proteina može biti posledica krivotvorenja meda, jer dodatak šećernih sirupa razblažuje prirodno nizak sadržaj proteina u medu, čineći njihovo izolovanje otežanim ili nemogućim. Međutim, nemogućnost izolovanja proteina sama po sebi ne predstavlja nedvosmislen dokaz krivotvorenja jer je moguć prirodno nizak sadržaj proteina u medu, kao i razgradnja proteina tokom prerade i skladištenja meda. Zbog toga je u ovom radu neuspešno izolovanje proteina interpretirano isključivo u kombinaciji sa drugim analitičkim podacima, kao što su fizičko–hemijski parametri i profili šećera i organskih kiselina, te uzorci nisu klasifikovani samo na osnovu pomenute AOAC metode¹⁷⁶.

Na osnovu rada Donga i saradnika⁸⁵, kao i rezultata dobijenih EA–IRMS analizom ($\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda i proteina) i izračunatog sadržaja C4 šećera, kao i ukupnog sadržaja glukoze i fruktoze, svi analizirani uzorci grupisani su u četiri kategorije: (1) uzorci kod kojih izolovanje proteina nije bilo uspešno (uzorci 1–8), (2) uzorci sa sadržajem C4 šećera većim od 7% (uzorci 9–16), (3) uzorci sa sadržajem C4 šećera manjim od -7% (uzorci 17–24) i (4) uzorci sa sadržajem C4 šećera u opsegu od -7% do +7%, koji se klasifikuju kao autentični medovi (uzorci 31–36) (Tabela 12). Ova klasifikacija omogućava sveobuhvatniju procenu autentičnosti meda, kombinujući izotopsku analizu sa hemijskim profilom šećera.

Nakon sprovedene procene autentičnosti uzoraka primenom HPAEC–PAD i EA–IRMS metoda, pristupilo se optimizaciji uslova HPTLC metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu saharida u uzorcima meda i referentnih šećernih sirupa. Proces optimizacije obuhvatao je odabir odgovarajuće mobilne faze, kao i podešavanje koncentracije i zapremine za nanošenje na tanak sloj uzoraka meda, sirupa i standardnih jedinjenja. U cilju postizanja optimalnog razdvajanja ispitano je ukupno šest različitih sastava mobilne faze (Tabela 13) u kombinaciji sa silika–gelom kao stacionarnom fazom. Kao najefikasniji sistem odabrana je mobilna faza sastava MeCN/H₂O/MeOH/CH₃COOH (70:15:5:10, v/v/v/v), koja je omogućila dobijanje najvećeg broja jasno definisanih i dobro razdvojenih hromatografskih zona.

Tabela 13. Kombinacije mobilnih faza korišćenih za optimizaciju HPTLC metode razdvajanja šećera

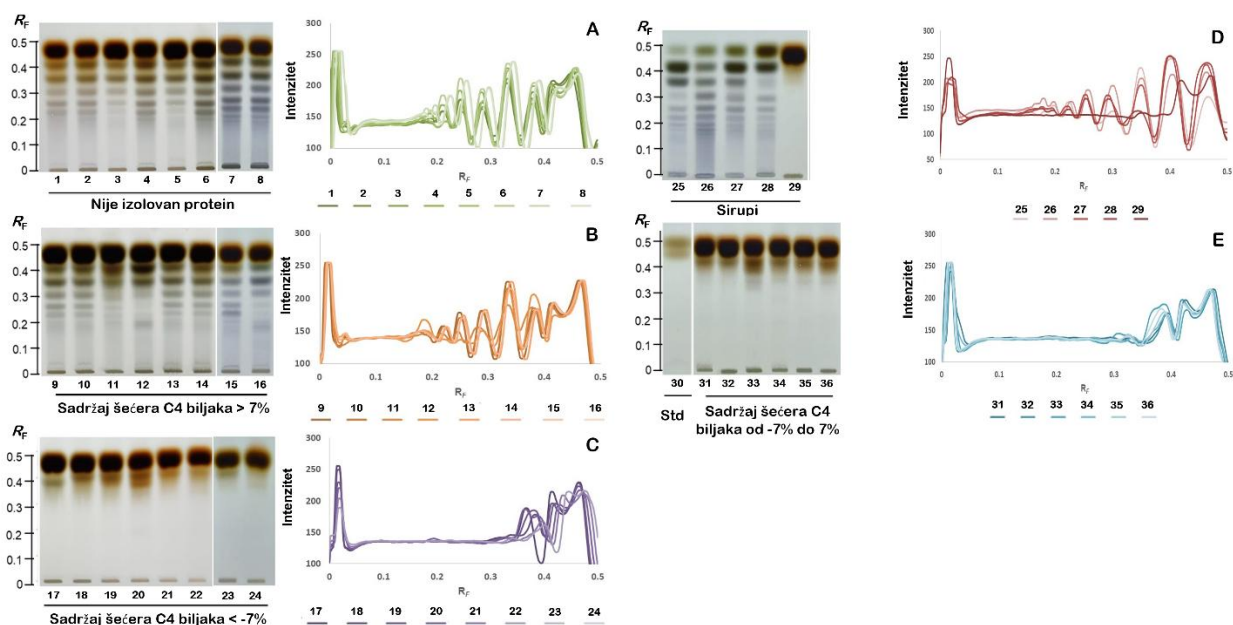
Broj	Mobilna faza	Odnos rastvarača (v/v)
1	<i>n</i> -BuOH/H ₂ O/AcOH	2/1/1
2	MeCN/MeOH/H ₂ O	17/3/0,25
3	AcOEt/2-PrOH/H ₂ O	40/30/10
4	AcOH/CHCl ₃ /H ₂ O	7/5/1
5	AcOEt/MeOH/H ₂ O/CH ₃ COOH	40/40/10/10
6	MeCN/H ₂ O/MeOH/CH ₃ COOH	70/15/5/10

n-BuOH (*n*-butanol; 1-butanol; AcOH (etanska (sirćetna) kiselina); MeCN (acetonitril); MeOH (metanol); AcOEt (etil–etanoat); 2-PrOH (2–propanol)

Pored toga, izvršeno je dodatno ispitivanje tri različita odnosa komponenata unutar odabrane mobilne faze, uz ispitivanje opcije u kojoj je metanol, zbog svojih nepovoljnih ekoloških karakteristika, izostavljen iz sastava. Kao rezultat ovih ispitivanja odabran je sistem MeCN/H₂O/CH₃COOH (70:25:5, v/v/v) kao optimalna mobilna faza za dalju primenu u analizi šećera. Tabela 12 je koncipirana tako da prati redosled nanošenja uzoraka na HPTLC pločama, kako je prikazano na Slici 57, čime je omogućeno jasno identifikovanje i poređenje među uzorcima.

Primenom optimizovane HPTLC metode, oligosaharidi iz uzoraka meda i referentnih šećernih sirupa su uspešno razdvojeni. Hromatogrami su pokazali pojavu „suvog fronta” u zoni iznad R_F vrednosti od 0,5, te su slike hromatograma snimane i analizirane do te vrednosti. Vizuelna analiza hromatograma i odgovarajućih hromatografskih signala (Slika 57) ukazala je na prisustvo karakterističnih obrazaca oligosaharida kod uzoraka 1–8 (Slika 57A), kod kojih protein nije mogao biti izolovan, kao i kod uzoraka 9–16 (Slika 57B), koji prema IRMS analizi sadrže više od 7% šećera poreklom od C4 biljaka. Ovi uzorci pokazali su izražen broj jasno definisanih traka u R_F opsegu od 0,20 do 0,40, što ukazuje na prisustvo oligosaharida.

Uzorci šećernih sirupa (Tabela 12, uzorci 25–29), analizirani pod istim hromatografskim uslovima (Slika 57D), pokazali su sličan profil oligosaharida kao pomenute grupe meda, što ukazuje na moguću sličnost u sastavu i potencijalno prisustvo istih ili sličnih komponenti. Prisustvo traka oligosaharida u uzorcima meda može se smatrati značajnim pokazateljem mogućeg falsifikovanja dodavanjem šećernih sirupa, s obzirom na to da je prethodnim istraživanjima potvrđeno da oligosaharidi i polisaharidi čine značajnu komponentu šećernih sirupa¹⁸⁶. Većina oligosaharida u sirupima nastaje usled nepotpune enzimske hidrolize skroba, a građeni su isključivo od glukoznih monomera povezanih $\alpha(1\rightarrow4)$ i/ili $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidnim vezama.



Slika 57. HPTLC hromatogrami i intenziteti zona uzoraka korišćenih za optimizaciju metode u kojima: A) nije izolovan protein B) je sadržaj šećera C4 biljaka bio veći od 7% C) je sadržaj šećera C4 biljaka bio manji od -7% D) šećerni sirupi E) je sadržaj šećera C4 biljaka između -7% i 7%.

Suprotno uzorcima koji su pokazali izražene oligosaharidne obrasce, autentični uzorci meda, kod kojih je sadržaj C4 šećera bio u granicama od -7% do +7% (Slika 57E: uzorci 31–36), kao i oni sa sadržajem C4 šećera manjim od -7% (Slika 57C: uzorci 17–24), nisu sadržali trake koje ukazuju na prisustvo oligosaharida u hromatografskom intervalu R_F vrednosti između 0,20 i 0,40. U ovim uzorcima dominantni šećeri su bili glukoza, fruktoza i saharoza, što je potvrđeno upoređivanjem sa standardnom smešom šećera (Slika 57E: uzorak 30). Ovi nalazi su bili u skladu sa kriterijumima AOAC 998.12 metode¹⁴³, prema kojoj se med klasifikuje kao falsifikovan ukoliko sadržaj šećera C4 biljaka prelazi 7%. Međutim, dobijeni rezultati nisu bili u potpunosti usaglašeni sa nalazima Donga i saradnika⁸⁵, koji su ukazali da se uzorci sa sadržajem šećera C4 biljaka manjim od -7% takođe mogu smatrati neautentičnim.

Dodatno, ispitivan je i uzorak invertnog sirupa (Slika 57D: uzorak 29), čiji je hromatografski profil pokazivao sličnosti sa profilom prirodnog meda – karakterisan prisustvom osnovnih šećera (glukoze, fruktoze, saharoze), ali bez traka koje bi ukazivale na prisustvo oligosaharida. Ovakav rezultat ukazuje na ograničenje primenjene HPTLC metode u razlikovanju autentičnog meda od meda krivotvorenog invertnim sirupom, budući da oligosaharidni markeri u ovom slučaju izostaju. Dobijeni rezultat ukazuje da HPTLC metoda, zasnovana isključivo na analizi profila šećera, ima ograničenu sposobnost pouzdanog razlikovanja autentičnog meda od meda krivotvorenog invertnim sirupom, koji predstavlja izvor šećera porekla iz C3 biljaka. Stoga se za pouzdanu procenu autentičnosti meda preporučuje primena komplementarnih analitičkih tehnika. Sličnost hromatografskih obrazaca potiče od činjenice da invertni sirupi sadrže pretežno glukozu i fruktozu u odnosima uporedivim sa onima u prirodnom medu, pri čemu izostaju karakteristična jedinjenja koja bi dala jasno diferencirane zone. Shodno tome, iako je HPTLC metoda korisna za brzo i relativno jednostavno dobijanje analitičkog *otiska prsta* i detektovanje nekih netipičnih zona koje mogu da ukažu na krivotvorenje, njena sposobnost razlikovanja autentičnog meda od meda falsifikovanog sirupima poreklom od C3 biljaka je ograničena. Ovo ograničenje je u skladu sa opštim analitičkim izazovom detektovanja dodatka šećera C3 biljaka, budući da su metode zasnovane na odnosima stabilnih izotopa ugljenika primarno razvijene za detektovanje šećera poreklom od C4 biljaka.

Profil šećera u ispitivanim uzorcima meda određen je primenom HPAEC–PAD tehnike kao referentne metode u cilju potvrde rezultata dobijenih HPTLC analizom. S obzirom na to da monosaharidi, pretežno glukozu i fruktozu, čine oko 90% ukupnog sadržaja ugljenih hidrata u medu, njihovo detektovanje i kvantifikovanje se uspešno ostvaruje različitim analitičkim metodama. Međutim, prisustvo disaharida, trisaharida i viših oligosaharida, iako su zastupljeni u manjim količinama, može imati značajnu analitičku vrednost u kontekstu kontrole autentičnosti meda.

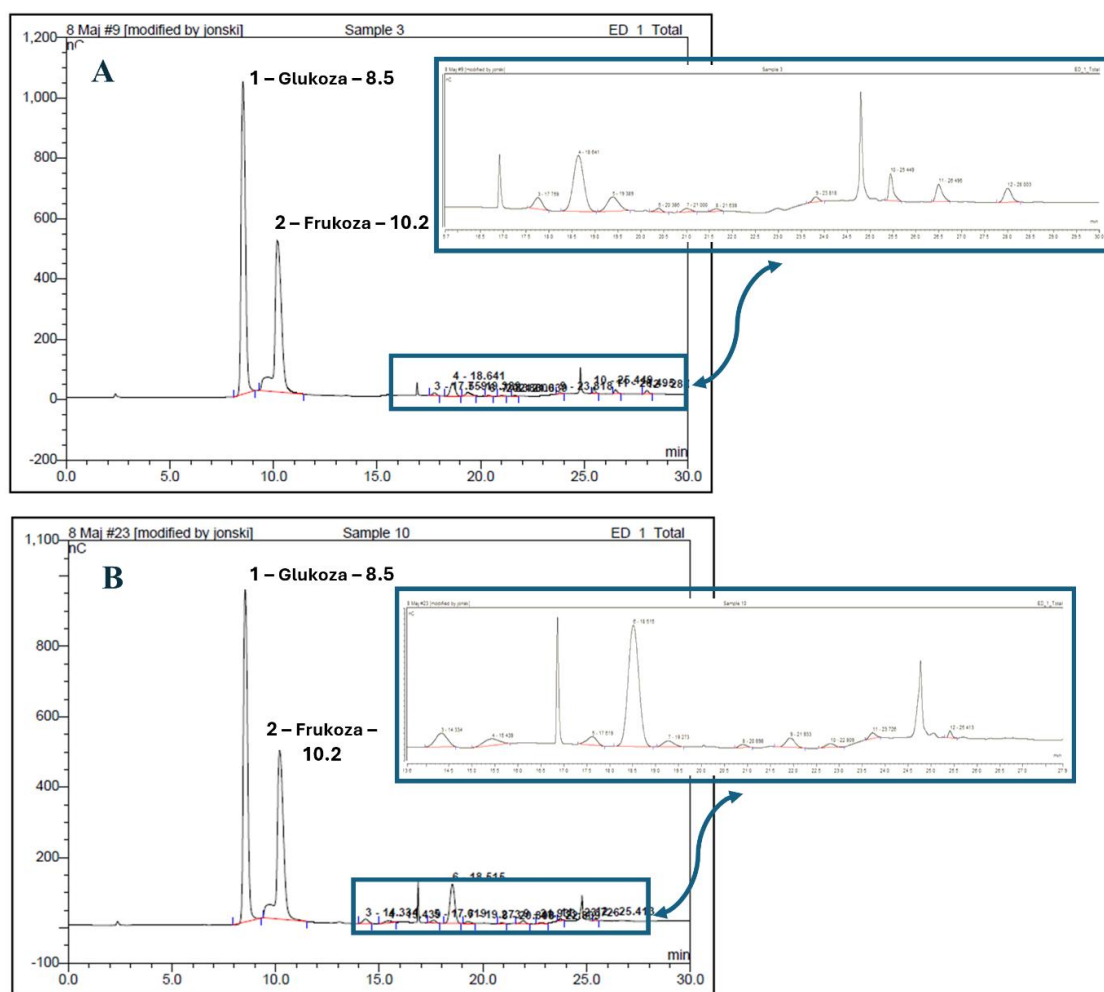
Identifikovanje i kvantifikovanje oligosaharida u medu predstavljaju analitički izazov, prvenstveno zbog ograničene dostupnosti komercijalnih standarda i niskih koncentracija ovih jedinjenja u realnim uzorcima. Dodatne poteškoće proizilaze iz uticaja matriksa, odnosno velikih količina prisutnih monosaharida glukoze i fruktoze, kao i zbog strukturne sličnosti različitih oligosaharida, što otežava postizanje odgovarajuće rezolucije pikova. Zbog toga je u okviru ovog rada HPAEC–PAD metoda optimizovana s ciljem dobijanja specifičnog *otiska prsta* autentičnih uzoraka meda, odnosno za otkrivanje prisustva tragova oligosaharida kao mogućih indikatora falsifikovanja meda dodatkom šećernih sirupa.

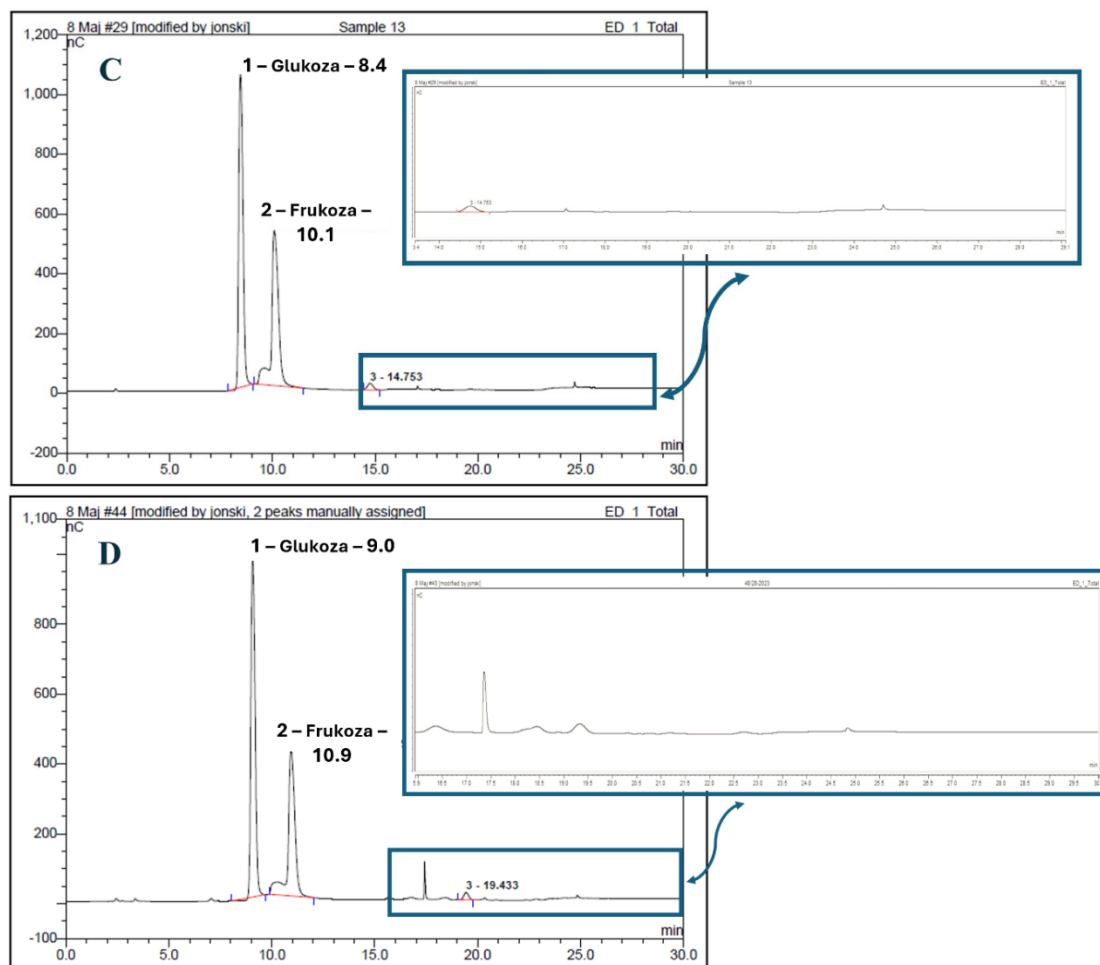
Najzastupljeniji šećeri u svim ispitivanim uzorcima bili su glukozu i fruktozu, dok je saharoza bila prisutna u značajno manjim koncentracijama. Primena HPAEC–PAD metode omogućila je efikasno razdvajanje prisutnih oligosaharida, pri čemu su odgovarajući hromatografski pikovi registrovani nakon t_R od približno 15 minuta. Uočeno je prisustvo većeg broja pikova niskog intenziteta, što ukazuje na prisustvo niza oligosaharidnih jedinjenja u tragovima. Na Slici 58 prikazani su hromatogrami reprezentativnih uzoraka meda: uzorak iz kojeg izolovanje proteina nije bilo uspešno (Slika 58A), uzorak sa sadržajem šećera C4 biljaka većim od 7% (Slika 58B), uzorak sa sadržajem šećera C4 biljaka manjim od -7% (Slika 58C), i uzorak sa sadržajem C4 šećera u rasponu između -7% i +7% (Slika 58D). U uzorcima prikazanim na Slici 58A i 58B uočena je serija pikova koji odgovaraju oligosaharidima i koji se eluiraju nakon 15 minuta. Suprotno tome, uzorci prikazani na Slici 58C i Slici 58D imali su znatno manji broj ovih pikova, što je rezultovalo jednostavnijim i preglednijim hromatografskim profilom.

Zbog ograničene dostupnosti komercijalnih standarda nije bilo moguće pouzdano identifikovanje pojedinačnih jedinjenja. Poređenjem karakterističnih hromatografskih profila moguće je brzo i relativno lako vizuelno uočiti razlike između uzoraka, pri čemu za potrebe skrining analize nije neophodna identifikacija i kvantifikacija svakog pojedinačnog oligosaharida. Prisustvo netipičnih pikova u zoni oligosaharida može ukazivati na neuobičajen sastav uzorka i potencijalno prisustvo

stranih šećera, zbog čega se ovakav pristup može koristiti za brzo izdvajanje uzoraka koji zahtevaju detaljniju analizu primenom komplementarnih analitičkih tehnika.

Poređenjem HPAEC–PAD hromatograma i HPTLC profila ispitivanih uzoraka meda uočena je podudarnost između ove dve tehnike. Uzorci koji su pokazivali veći broj zona u HPTLC hromatogramima pri R_F vrednostima između 0,20 i 0,40 (Slika 57A i 57B) istovremeno su imali povećan broj kasno eluiranih pikova ($t_R > 15$ min) u HPAEC–PAD hromatogramima (Slika 58A i 58B). Ovi signali pripisuju se oligosaharidima, što ukazuje da obe hromatografske metode detektuju iste promene u sastavu uzoraka. Uporedo sa HPAEC–PAD analizom, primenjena HPTLC metoda pokazala se efikasnom za dobijanje vizuelno prepoznatljivog analitičkog „otiska prsta” uzoraka meda i šećernih sirupa. Pored toga, rezultati HPTLC i HPAEC–PAD analiza bili su u skladu sa nalazima EA–IRMS analize, pri čemu je svaka od primenjenih tehnika pružila komplementarne informacije o ispitivanim uzorcima a njihova zajednička interpretacija pouzdaniju procenu sastava uzoraka i mogućeg prisustva dodatnih šećernih sirupa.





Slika 58. Profil šećera analiziranih uzoraka meda dobijenih HPAEC–PAD metodom; A) uzorka meda iz kojeg protein nije izolovan; B) uzorka meda koji je imao sadržaj šećera C4 biljaka > 7%; C) uzorka meda koji je imao sadržaj šećera C4 biljaka < -7%; D) uzorka meda koji je imao sadržaj šećera C4 biljaka između < -7% i > 7%

Standardna AOAC 998.12 metoda ¹⁴³ za procenu autentičnosti meda uglavnom se fokusira na uzorke koji sadrže više od 7% šećera poreklom od C4 biljaka, dok Dong i saradnici ⁸⁵ sugerišu da medove sa sadržajem C4 šećera manjim od -7% takođe treba smatrati neautentičnim ⁸⁵. Prema rezultatima ove doktorske disertacije, profili šećera dobijeni primenom HPTLC i HPAEC–PAD tehnika na uzorcima meda sa sadržajem C4 šećera manjim od -7% ukazuju na to da ovi uzorci pokazuju neke karakteristike autentičnih medova, budući da u profilu izostaju zone koje odgovaraju oligosaharidima poreklom iz dodatih šećernih sirupa. Ovi rezultati se ne poklapaju sa zaključcima koje su izneli Dong i saradnici ⁸⁵, čime se ukazuje na potrebu za daljim istraživanjem predloženih hipoteza u cilju utvrđivanja preciznijih kriterijuma za razlikovanje krivotvorenih uzoraka meda.

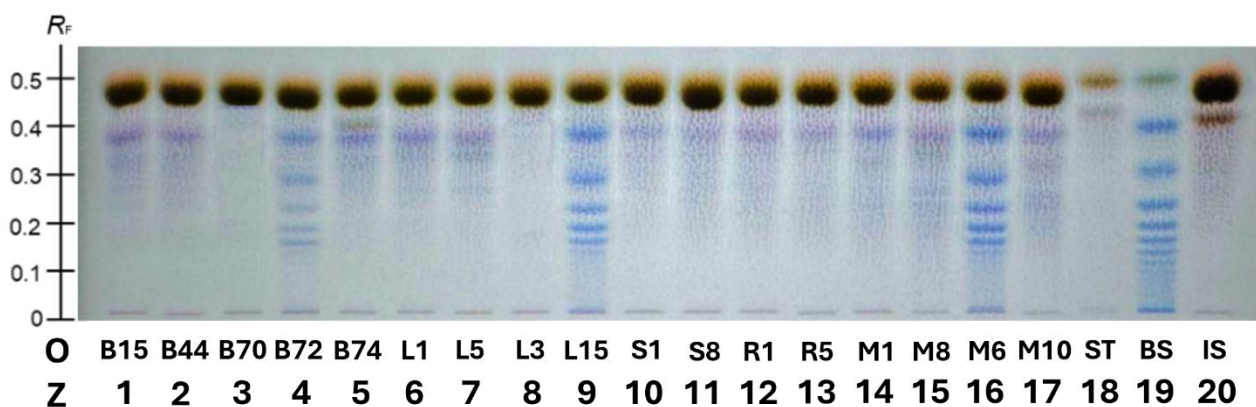
Uzimajući u obzir sve tri primenjene metode za procenu autentičnosti meda, uprkos stalnom napretku sofisticiranih tehnika kao što su HPAEC–PAD i EA–IRMS, zbog potrebe za preciznim podešavanjem brojnih parametara, visokih troškova opreme i reagenasa, kao i osposobljenosti analitičara, čini se da je HPTLC metoda pogodna za prvu fazu procene autentičnosti meda (inicijalni skrining). Glavne prednosti HPTLC metode uključuju njenu jednostavnost izvođenja, fleksibilnost, pristupačnost i nisku cenu. Razvojem naprednih slojeva adsorbenata, kao i sofisticirane instrumentacije za nanošenje uzoraka, razvijanje hromatograma, derivatizaciju i procenu rezultata, upotreba HPTLC u tzv.

fingerprint analizama postala je nezaobilazna, što je potvrđeno i u ovoj studiji. Ipak, kao i druge analitičke metode, HPTLC ima ograničenja u detektovanju krivotvorenja meda dodatkom sirupa poreklom od C3 biljaka, pri čemu su rezultati ove metode pretežno kvalitativne, a ne kvantitativne prirode. Ovo ograničenje potvrđeno je i eksperimentalno, gde je invertni sirup pokazao hromatografske profile slične autentičnom medu.

Posmatrano u celini, rezultati ukazuju da kombinovana primena EA–IRMS, HPAEC–PAD i HPTLC metoda pruža komplementarne informacije: EA–IRMS omogućava pouzdano detektovanje prisustva šećera poreklom od C4 biljaka, dok hromatografske *fingerprint* tehnike pružaju dodatni uvid u kvalitativni i kvantitativni sastav, odnosno profil ugljenih hidrata i daju potporu proceni autentičnosti meda, naročito kod uzoraka sa izmenjenim sadržajem oligosaharida. Saglasnost između tri nezavisna analitička pristupa povećava pouzdanost predložene strategije za procenu autentičnosti meda i smanjuje rizik od pogrešne klasifikacije koji može nastati primenom samo jedne metode.

Nakon potvrde validnosti primenjene metodologije na 30 različitih uzoraka, identični HPTLC uslovi primenjeni su na uzorke koji su korišćeni u ispitivanjima tokom izrade ove doktorske disertacije. Uzorci su pažljivo odabrani kako bi obuhvatili seriju medova različitog biljnog porekla, pri čemu su u ispitivanje uvršteni uzorci sa sadržajem šećera u rasponu od manje od -7% do više od 7% šećera C4 biljaka, kao i uzorci u kojima nije bilo moguće izolovati protein, prema rezultatima EA–IRMS metode. Ovim pristupom omogućeno je temeljno ispitivanje varijacija u hromatografskim profilima u zavisnosti od sadržaja C4 šećera i prisustva ili odsustva proteina, čime je osigurana bolja obuhvatnost analize.

Na Slici 59 prikazan je hromatogram koji uključuje medove svih pet analiziranih biljnih vrsta (Prilog 1), kao i smešu standarda (glukoza, fruktoza i saharoza, ST, zona 18), bombonski sirup (BS, zona 19) i invertni sirup (IS, zona 20). Za analizu je korišćeno pet uzoraka bagremovog meda (dva autentična B15 i B44, zone 1 i 2, tri neautentična B70, B72 i B74, zone 3 – 5), četiri uzorka lipovog meda (dva autentična L1 i L5, zone 6 i 7, dva neautentična L3 i L15, zone 8 i 9), dva uzorka suncokretovog meda (jedan autentičan S1, zona 10, jedan neautentičan S8, zona 11), dva uzorka meda od uljane repice (jedan autentičan R1, zona 12, jedan neautentičan R5, zona 13) i četiri uzorka medljikovca (dva autentična M1 i M8, zone 14 i 15, dva neautentična M6 i M10, zone 16 i 17).



Slika 59. HPTLC hromatogram analiziranih uzoraka meda i sirupa

Odabir uzoraka za hromatografsku analizu izvršen je na osnovu prethodno utvrđenog statusa njihove autentičnosti, primenom fizičko-hemijskih parametara i IRMS analize (Prilog 1 i Prilog 6). Uzorci bagremovog meda (B15 i B44) su se pokazali kao autentični po oba kriterijuma. Uzorak B70 je imao sadržaj šećera C4 biljaka manji od -7%, dok uzorak B72 nije ispunio kriterijume analize fizičko–hemijskih parametara i nije bilo moguće izolovati protein. Uzorak B74 je prošao IRMS analizu, ali nije bio u skladu sa fizičko–hemijskim parametrima. Sličan obrazac uočen je i kod lipovog meda, gde su uzorci L1 i L5 potvrđeni kao autentični po oba kriterijuma. Kod uzorka L3 sadržaj šećera C4

biljaka bio je manji od -7%, dok L15 nije ispunio kriterijume analize fizičko–hemijskih parametara, uz izostanak uspešnog izolovanja proteina. Za suncokretov med, uzorak S1 bio je autentičan, dok je uzorak S8 imao sadržaj C4 šećera veći od 7%. Med od uljane repice takođe je pokazao varijacije, pri čemu je uzorak R1 bio autentičan, dok je uzorak R5 imao sadržaj C4 šećera veći od 7%. Kod medljikovca, uzorci M1 i M8 su bili autentični, dok uzorak M6 nije ispunio kriterijume analize fizičko–hemijskih parametara i nije bilo moguće izolovati protein, dok je uzorak M10 ispunio kriterijume IRMS analize, ali nije ispunio kriterijume analize fizičko–hemijskih parametara.

Analizom hromatograma prikazanog na Slici 59, jasno se uočavaju specifični profili oligosaharida koji omogućavaju preciznu diferencijaciju uzoraka. Kod uzoraka bagremovog meda (B72, zona 4), lipovog meda (L15, zona 9) i medljikovca (M6, zona 16) detektovan je jasan obrazac višestrukih zona u donjem delu hromatograma (u regiji R_F od 0 do 0,4). Ovaj specifični raspored oligosaharidnih zona veoma je sličan hromatografskom profilu bombonskog sirupa (BS, zona 19). Ovakav vizuelni nalaz, uz prethodno utvrđenu nemogućnost izolovanja proteina iz navedenih uzoraka, sa velikom pouzdanošću ukazuje na to da su ovi medovi krivotvoreni dodatkom upravo bombonskog sirupa ili sirupa sličnog hemijskog sastava. Na ovaj način, primenjena HPTLC metoda se potvrđuje kao visokoefikasan i pouzdan alat za brzi skrining autentičnosti meda. S druge strane, kod uzoraka bagremovog (B70, zona 3) i lipovog meda (L3, zona 8) uočen je potpuni izostanak zona koje potiču od oligosaharida, odnosno njihovi hromatografski profili su uporedivi sa profilom standardne smeše (ST, zona 18). Ovaj rezultat je od posebnog značaja za pravilnu interpretaciju rezultata IRMS analize. Naime, iako su pomenuti uzorci imali sadržaj C4 šećera manji od -7%, što je prema nekim autorima znak neautentičnosti, rezultati HPTLC analize govori u prilog njihovoj autentičnosti. Odsustvo zona oligosaharida karakterističnih za neautentične uzorke ukazuje na to da ovi uzorci nisu krivotvoreni ispitivanim šećernim sirupima.

4.7. Profil organskih kiselina

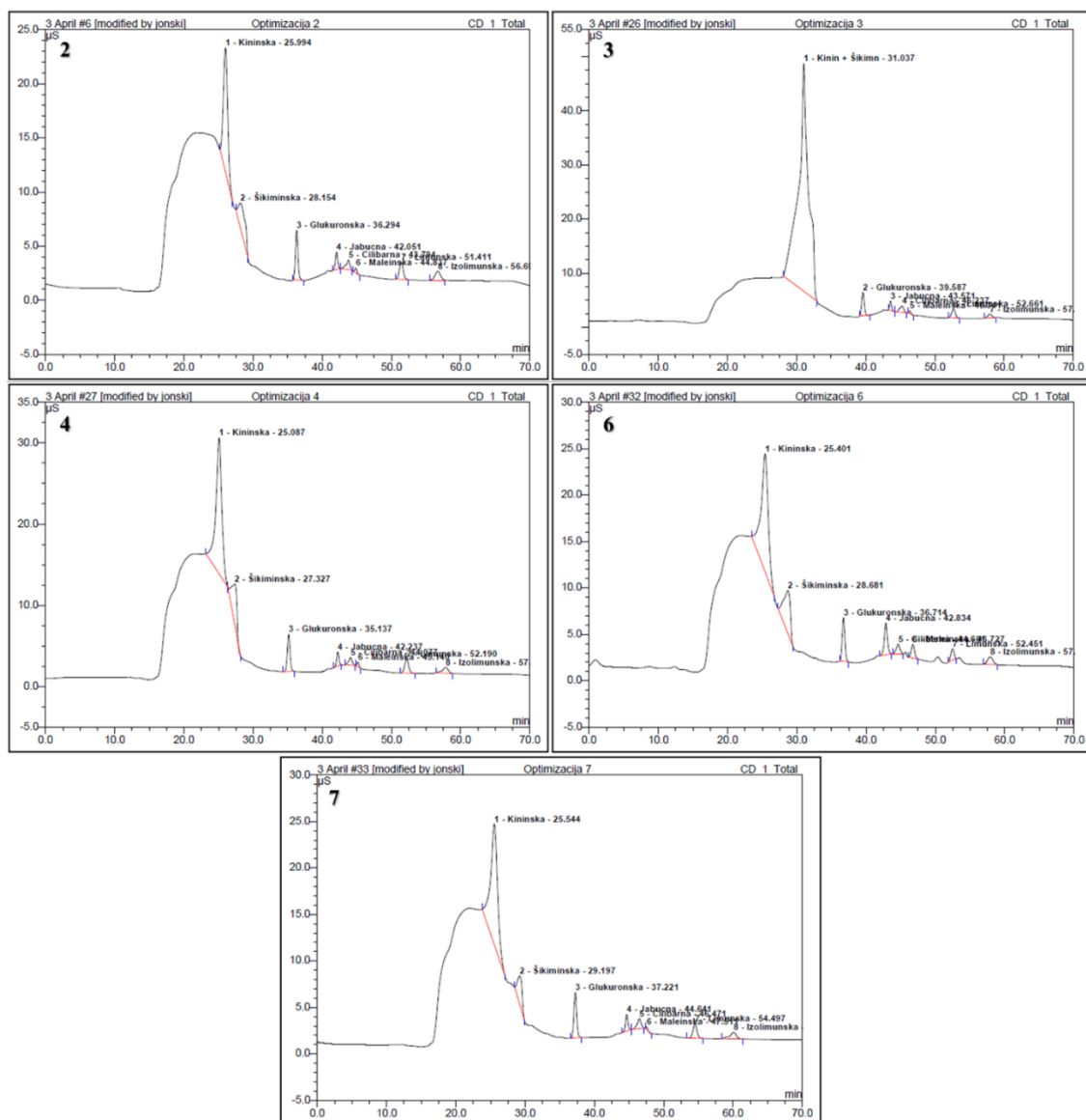
Organske kiseline, iako prisutne u medu u količinama manjim od 0,5%, imaju značajan uticaj na njegova fizičko–hemijska i senzorna svojstva. Njihovo prisustvo doprinosi izraženim antibakterijskim i antioksidativnim svojstvima meda, a istovremeno mogu poslužiti kao indikatori fermentacije. Svojstva kao što su boja, ukus, pH–vrednost, ukupna kiselost i električna provodljivost meda u bliskoj su korelaciji sa sadržajem i vrstom prisutnih organskih kiselina. Analiza profila organskih kiselina, koja obuhvata identifikovanje i kvantifikovanje pojedinačnih kiselina, može se koristiti kao pouzdan pokazatelj za diferencijaciju medova različitog biljnog i/ili geografskog porekla, kao i načina proizvodnje. Na primer, medljikovci se generalno odlikuju većim sadržajem ukupnih kiselina, uključujući kininsku, jabučnu, ćilibarnu, limunsku i izolimunsku kiselinu, dok medovi od uljane repice sadrže najmanje količine organskih kiselina. Bagremov med, ukoliko je proizveden na autentičan način, ne sadrži izolimunsku kiselinu. Ove razlike u kiselinskom profilu direktno su povezane sa specifičnom florom sa koje pčele prikupljaju nektar ili medljiku, te se sastav organskih kiselina može koristiti kao validan hemijski marker biljnog porekla meda ^{3, 22, 36, 37, 113}.

Pored diferencijacije biljnog porekla, profil organskih kiselina može doprineti otkrivanju mogućih falsifikata meda, posebno onih nastalih dodatkom invertiranih šećernih sirupa tokom procesa proizvodnje. Naime, prisustvo specifičnih kiselina, kao što je limunska, u neuobičajeno visokim koncentracijama može ukazivati na upotrebu sirupa invertovanih pomoću odgovarajućih organskih kiselina, što se odražava na ukupni kiselinski profil meda. Stoga, analiza organskih kiselina može poslužiti kao jedinstven hemijski „otisak prsta” meda, koji omogućava ne samo identifikovanje eventualnih manipulacija, već i kontrolu autentičnosti i kvaliteta proizvoda. U tom kontekstu, profil organskih kiselina predstavlja značajan analitički alat u okviru šireg spektra metoda za procenu autentičnosti meda ^{3, 22, 36, 37, 113}.

4.7.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih uslova za određivanje profila kiselina obuhvatila je optimizaciju uslova eluiranja i izvršena je variranjem gradijenta mobilne faze tokom procesa hromatografskog razdvajanja. Hromatogrami dobijeni primenom predloženih gradijenata prikazani su na Slici 60.

U okviru ovog istraživanja, izvršena je optimizacija hromatografskih uslova razdvajanja pomoću ukupno sedam različitih gradijenata, detaljno opisanih u poglavlju (3.7.1.). Na Slici 60 prikazani su hromatogrami dobijeni primenom gradijenata označenih brojevima 2, 3, 4, 6 i 7. Gradijent 1, iako je omogućio kraće ukupno vreme analize u poređenju sa ostalima, nije obezbedio zadovoljavajuće razdvajanje ciljanih organskih kiselina, pri čemu su pikovi bili izrazito niske rezolucije i međusobno se preklapali. Gradijent 5, koji takođe nije prikazan na pomenutoj slici, pokazao je nedovoljnu sposobnost razdvajanja jabučne, čilibarne i maleinske kiseline, usled čega su ove komponente eluirane kao dva spojena pika (koeluiranje).



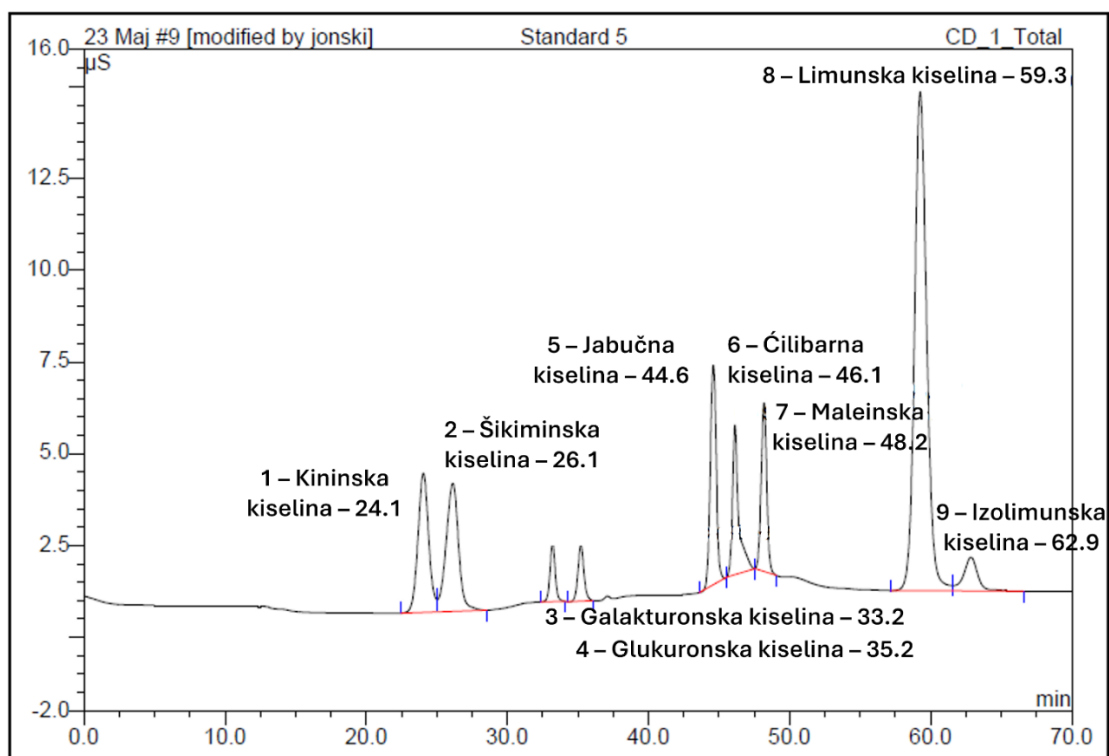
Slika 60. Hromatogrami zbirnog uzorka bagremovog meda na kojima su primenjeni različiti optimizovani gradijenti (2, 3, 4, 6 i 7) za razdvajanje organskih kiselina

Kod gradijenata 2 i 4 zabeležena je niža rezolucija pikova kininske i šikiminske kiseline, dok su jabučna, čilibarna i maleinska kiselina pokazale izraženo koeluiranje. Sličan problem uočen je i kod

gradijenta 3, gde je došlo do preklapanja pikova kako kininske i šikiminske, tako i jabučne, ćilibarne i maleinske kiseline, čime je znatno kompromitovan kvalitet kvantitativne analize. Gradijent 7 omogućio je adekvatno razdvajanje kininske i šikiminske kiseline, ali je eluiranje izolimunske kiseline bilo znatno produženo u poređenju sa gradijentom 6, što je produžilo ukupno trajanje analize. Uz to, rezolucija pikova jabučne, ćilibarne i maleinske kiseline bila je nešto lošija u odnosu na gradijent 6. Suprotno tome, gradijent 6 je obezbedio optimalno razdvajanje svih pomenutih kiselina, uključujući visoku rezoluciju i mogućnost pouzdane kvantifikacije jabučne, ćilibarne, maleinske, kininske i šikiminske kiseline.

Kod gradijenta 6 početna koncentracija KOH iznosila je 10 mmol/L tokom prvih 16 minuta analize, što je omogućilo efikasno razdvajanje kininske i šikiminske kiseline. U poređenju s tim, kod gradijenta 7 ista početna koncentracija zadržana je samo do 12,5 minuta, što je rezultovalo slabijim razdvajanjem navedenih komponenti. Nakon toga, kod gradijenta 6 uvodi se linearno povećanje koncentracije KOH od 16,0 do 18,0 minuta, dostigavši 30 mmol/L, koju potom održava do 29,0 minuta, čime je omogućeno optimalno razdvajanje jabučne, ćilibarne i maleinske kiseline. Nasuprot tome, u gradijentu 7 povećana je koncentracija KOH na samo 25 mmol/L u intervalu od 12,5 do 17,0 minuta i zadržana do 30,0 minuta, što je rezultovalo slabijom rezolucijom navedenih kiselina.

U završnoj fazi, gradijent 6 koristi koncentraciju od 50 mmol/L od 29,0 do 58,0 minuta, omogućivši efikasno razdvajanje izolimunske i limunske kiseline. Kod gradijenta 7 ova koncentracija je primenjena u nešto kraćem vremenskom intervalu, do 55,0 minuta, što je rezultovalo nešto lošijim razdvajanjem navedenih kiselina. Najefikasnije razdvajanje organskih kiselina postignuto je korišćenjem gradijenta označenog kao 6, uz ukupno vreme analize od 70 minuta.



Slika 61. Hromatogram standardne serije organskih kiselina razdvojenih primenom optimizovanog gradijenta

Hromatografski uslovi opisani za gradijent 6 su zatim primenjeni na standardnu seriju organskih kiselina korišćenih za validaciju metode i kvantifikovanje organskih kiselina u medu, pri čemu je dobijen hromatogram prikazan na Slici 61. U cilju kvantitativne analize organskih kiselina u uzorcima meda, korišćen je multikomponentni standard koji obuhvata devet strukturno različitih organskih

kiselina. Među analiziranim jedinjenjima identifikovane su četiri monokarboksilne kiseline (kininska, šikiminska, glukuronska i galakturonska), tri dikarboksilne (jabučna, ćilibarna i maleinska), kao i dve trikarboksilne kiseline (limunska i izolimunska). Ova podela zasnovana je na broju karboksilnih grupa prisutnih u molekulu, koje značajno utiču na njihova hemijska svojstva i ponašanje tokom hromatografskog razdvajanja.

Redosled eluiranja karboksilnih kiselina određen je prvenstveno afinitetom prema stacionarnoj fazi kolone IonPac AS15, kao i strukturnim karakteristikama svake ispitivane organske kiseline. Ključni faktori koji su uticali na retenciju uključuju broj karboksilnih grupa, prisustvo i prirodu dodatnih funkcionalnih grupa (npr. hidroksilne), kao i ukupnu polarizaciju molekula. U skladu sa uočenim trendom eluiranja monokarboksilne kiseline pokazuju kraća retenciona vremena, nakon čega slede di- i trikarboksilne kiseline, čime se potvrđuje uticaj ukupnog broja karboksilnih funkcionalnih grupa na retenciono ponašanje u uslovima anjonske izmenjivačke hromatografije.

4.7.2. Validacija metode

Validacija razvijene metode obuhvatila je ispitivanje performansi optimizovane metode razdvajanja organskih kiselina primenom HPAEC-CD tehnike. U okviru validacije ispitivane su ključne analitičke karakteristike metode uključujući linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, analitički prinos, preciznost i tačnost (Prilog 9, Tabela 14).

Tabela 14. Statistički parametri validacije metode određivanja organskih kiselina u medu

Parametar	Kininska	Šikiminska	Galakturonska	Glukuronska	Jabučna	Ćilibarna	Maleinska	Limunska
r^2	0,9983	0,9986	0,9991	0,9992	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
$S_{y/x}$	0,0592	0,0573	0,0089	0,0093	0,0094	0,0032	0,0035	0,0027
$RSD\ S_{y/x}\ (%)$	3,47	3,07	2,5	2,45	0,6	0,22	0,34	0,04
F	1787	2158	3360	3708	51793	70218	205059	13440546
t	42	46	58	61	228	265	453	3666
LOD (mg/kg)	2,20	2,10	0,40	0,40	0,10	0,10	0,05	0,05
LOQ (mg/kg)	7,30	7,00	1,32	1,25	0,32	0,31	0,18	0,19
$\bar{x}$ (mg/kg)	1870	390	4,8	4,0	44	39	12	76
s (mg/kg)	100	30	0,5	0,6	2	6	3	2
$RSD_r\ (%)$	5,40	7,04	10,62	15,60	3,51	13,12	18,79	2,50
R (mg/kg)	290	80	2	2	5	20	7	6
$RSD_{R-H}\ %$	5,15	6,52	12,64	12,99	9,06	9,23	11,06	8,33
HorRat	1,05	1,08	0,84	1,2	0,39	1,42	1,7	0,3
<i>Spike</i> 75%	93	75	97	74	108	97	76	108
<i>Spike</i> 100%	80	99	88	82	91	92	79	104
<i>Spike</i> 125%	96	78	80	96	88	94	85	95

Linearnost analitičke metode ispitana je primenom linearne regresione analize, pri čemu su površine hromatografskih pikova upoređivane sa odgovarajućim koncentracijama pet standardnih rastvora. Dobijeni koeficijenti determinacije, prikazani u Tabeli 14, za sve analizirane organske kiseline bili su veći od 0,9980, što ukazuje na izuzetno visok stepen linearne zavisnosti između koncentracije i intenziteta odgovora detektora. Regresioni modeli dodatno su evaluirani na osnovu standardne greške

regresije ($S_{y/x}$), koja se kretala u intervalu od 0,0027 za limunsku do 0,0592 za kininsku kiselinu. Niske vrednosti $S_{y/x}$ ukazuju na usku disperziju eksperimentalnih tačaka oko regresione linije i time potvrđuju visok kvalitet modela. Relativne standardne devijacije izračunate na osnovu $S_{y/x}$ (RSD $S_{y/x}$, %) iznosile su između 0,04% i 3,47%, dodatno potvrđujući pouzdanost linearnih modela. Statistička značajnost modela potvrđena je visokim vrednostima F -testa (≥ 1700) i Studentovog t -testa (≥ 40), čime je potvrđena adekvatnost linearnih regresionih pravaca. S obzirom na to da izolimunska kiselina nije detektovana u grupnom uzorku bagremovog meda korišćenom za optimizaciju hromatografskih uslova, njena validacija nije sprovedena u okviru ovog istraživanja^{178, 179}.

Dobijene vrednosti LOD za analizirane organske kiseline kretale su se u opsegu od 0,05 do 2,20 mg/kg, što potvrđuje visoku osetljivost metode. Granica kvantifikacije iznosila je od 0,18 do 7,30 mg/kg. Ove vrednosti ukazuju na sposobnost metode da detektuje i kvantifikuje organske kiseline čak i u vrlo niskim koncentracijama u složenom matriksu kao što je med^{178, 179}.

Preciznost razvijene metode ispitana je kroz ocenu njene ponovljivosti (RSD_r) i reproduktivnosti (RSD_{R-H}) korišćenjem grupnog uzorka bagremovog meda. Analiza je sprovedena na tri odvojene odvage istog uzorka tokom tri uzastopna dana, pri čemu je svakog dana izvršeno po 6 ponovljenih merenja (ukupno 18 analiza). Niske vrednosti standardne devijacije određivanja (S_r) ukazale su na visoku konzistentnost rezultata. RSD_r vrednosti pokazale su da je određivanje maleinske kiseline imalo najnižu preciznost ($RSD_r = 18,79\%$), dok su limunska, jabučna i kininska kiselina pokazale najveću preciznost određivanja (RSD_r između 2,50% i 5,40%). Kvalitet metode dodatno je potvrđen upotrebom HorRat koeficijenta. Sve kvantifikovane kiseline imale su HorRat vrednosti niže od 2,0, dok su limunska i jabučna kiselina imale HorRat ispod 0,5, što ukazuje na izuzetno visoku preciznost metode. Navedeni rezultati potvrđuju da optimizovana metoda ispunjava zahteve međunarodnih smernica za analitičku preciznost^{122, 178, 179}.

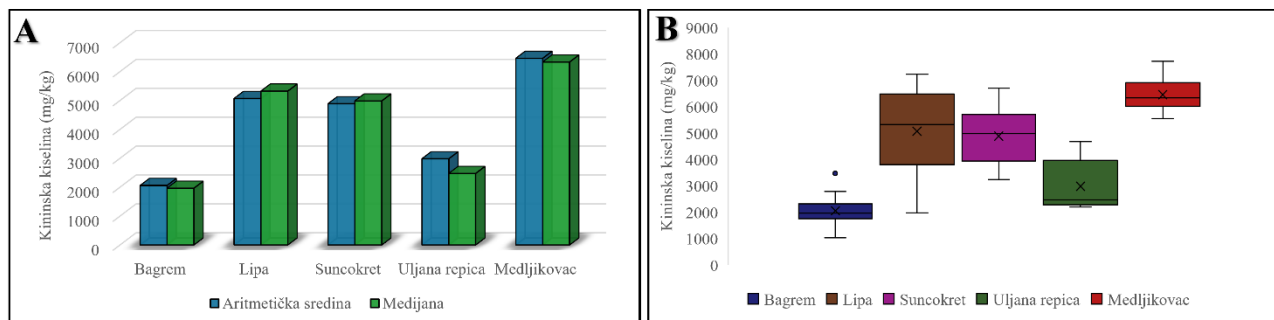
Tačnost metode potvrđena je sprovođenjem testa analitičkog prinosa, kojim se procenjuje uticaj matriksa na kvantitativno određivanje analita. Analitički prinos je ispitivan dodatkom poznatih količina standarda organskih kiselina (spajkovanjem) u uzorke meda na tri koncentraciona nivoa (75%, 100% i 125% u odnosu na inicijalnu koncentraciju analita). Dobijene vrednosti analitičkog prinosa za sve analizirane kiseline kretale su se u intervalu od 74% do 108%, što ukazuje na visok stepen tačnosti. Uzevši u obzir složenost matriksa meda i činjenicu da se kvantifikovanje vrši u ppm opsegu (mg/kg), navedene vrednosti se nalaze u okviru prihvatljivih granica predviđenih NMKL Protokolom 6 (60 – 115%), čime je dodatno potvrđena pouzdanost razvijene metode^{178, 179}.

4.7.3. Analiza profila organskih kiselina

Rezultati analize profila organskih kiselina ispitivanih uzoraka, izraženi kao srednja vrednost $\pm$ relativna standardna devijacija, prikazani su u Prilogu 11, dok su u Tabeli 16 predstavljeni parametri deskriptivne statistike (za autentične uzorke) za svaku analiziranu biljnu vrstu meda, uključujući minimalne i maksimalne vrednosti, aritmetičke sredine, medijane i standardne devijacije ispitivanih parametara.

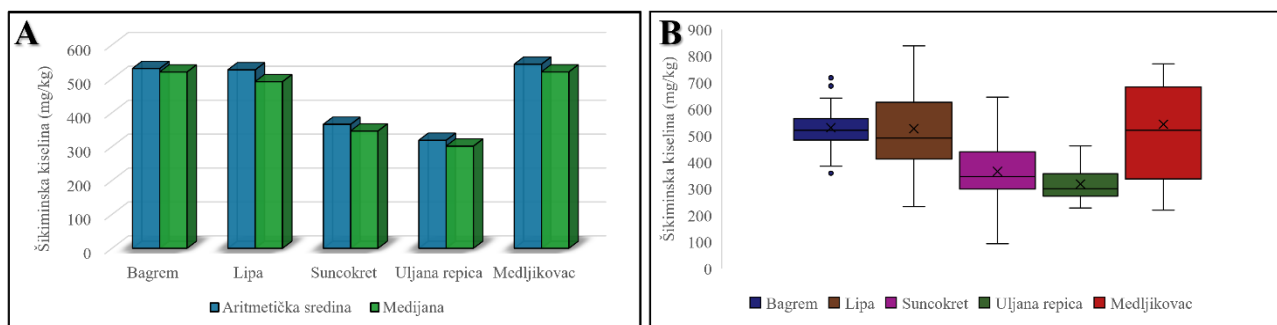
Kininska kiselina je aromatična kiselina koja se u medu javlja u malim količinama. Njeno poreklo u medu uglavnom se povezuje sa biljnim izvorima, posebno sa nektarom biljaka koje sadrže alkaloida, kao što su vrste roda *Cinchona* i *Rhamnus*. Pored toga, kininska kiselina može nastati kao produkt metaboličkih reakcija pčela ili mikroorganizama prisutnih u medu, naročito u slučaju fermentacije ili razgradnje drugih fenolnih jedinica. Takođe, ova kiselina može biti prisutna zbog kontaminacije meda medljikom, koja sadrži određenu količinu kininske kiseline. Sadržaj kininske kiseline u analiziranim uzorcima značajno je varirao u zavisnosti od biljnog porekla meda. Najniže koncentracije kininske kiseline zabeležene su kod bagremovog meda, sa vrednostima u rasponu od 1030 do 3500 mg/kg. Veći sadržaji detektovani su u uzorcima meda od uljane repice (2190 – 4680 mg/kg) i suncokretovog meda (3240 – 6700 mg/kg). Nasuprot tome, lipov med i medljikovac jasno su se izdvojili znatno

većim sadržajem kininske kiseline. Kod lipovog meda uočen je veliki varijabilitet (1980 – 7230 mg/kg), dok su kod medljikovca zabeležene najveće koncentracije u okviru analiziranog seta, u intervalu od 5540 do 7720 mg/kg (Slika 62).



Slika 62. Sadržaj kininske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

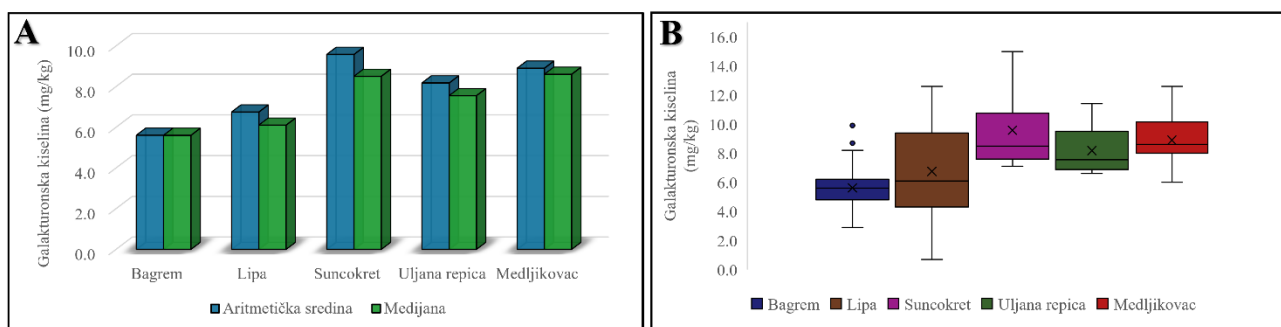
Šikiminska kiselina je centralni intermedijer u biosintezi aromatičnih amino-kiselina kod biljaka i mikroorganizama. Prisustvo u medu direktno je uslovljeno njegovim biljnim poreklom, jer mnoge biljke u svom nektaru sadrže šikiminsku kiselinu, naročito one koje pripadaju familiji Apiaceae. Takođe, šikiminska kiselina može nastati kao metabolički produkt pčela ili mikrobiota prisutnih u saću i medu tokom fermentacije. Sadržaj šikiminske kiseline pokazao je specifičnu raspodelu među ispitivanim uzorcima, pri čemu je najniža koncentracija detektovana u suncokretovom medu (94 – 640 mg/kg). Relativno nizak sadržaj ovog jedinjenja pronađen je i u medu od uljane repice (230 – 460 mg/kg), dok su u bagremovom medu detektovane umerene koncentracije (360 – 720 mg/kg). Nasuprot tome, lipov med i medljikovac izdvojili su se većim sadržajem šikiminske kiseline i izraženijom varijabilnošću među uzorcima. Kod lipovog meda koncentracije su varirale od 230 do 840 mg/kg, dok je medljikovac pokazao najširi opseg vrednosti (330 – 1300 mg/kg), pri čemu su u ovoj grupi zabeležene i najveće koncentracije šikiminske kiseline u analiziranom setu uzoraka (Slika 63).



Slika 63. Sadržaj šikiminske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

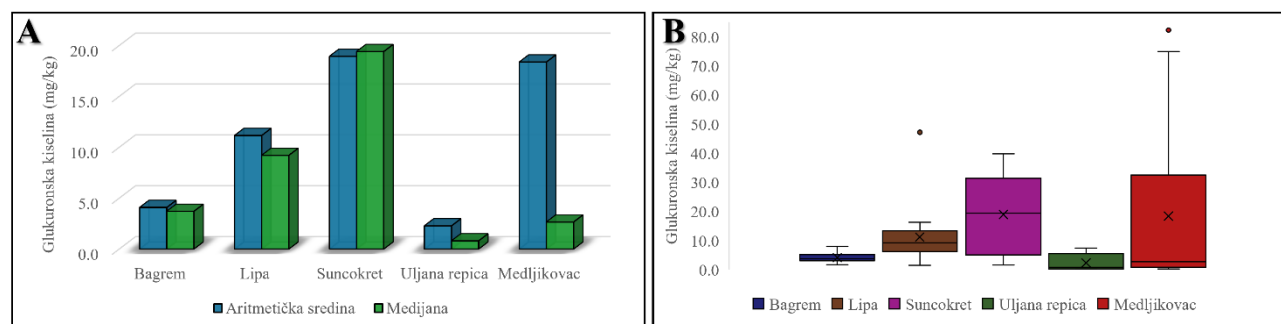
Galakturonska kiselina je komponenta pektina, prirodnog polisaharida koji je prisutan u ćelijskim zidovima biljaka. U medu se galakturonska kiselina javlja kao rezultat razgradnje pektina iz nektara biljaka koje ga sadrže. Takođe, pomenuta kiselina može biti prisutna kao rezultat aktivnosti pčela koje razgrađuju polisaharide tokom procesa sakupljanja i prerade nektara. Njeno prisustvo u medu može biti korisno za identifikaciju biljnog porekla, jer se nalazi u većim količinama u medovima od biljaka bogatih pektinom, kao što su voće i povrće. Sadržaj galakturonske kiseline pokazao je varijacije u zavisnosti od biljne vrste. Najmanje koncentracije pronađene su u bagremovom medu (2,9 – 9,9 mg/kg), dok su veće vrednosti ove kiseline prisutne u uzorcima meda od uljane repice (6,6 – 11,4 mg/kg). Maksimalne vrednosti u okviru ispitivanog seta zabeležene su kod suncokretovog meda (7,1

– 15,0 mg/kg) i medljikovca (6,0 – 12,6 mg/kg). Sadržaj galakturonske kiseline u uzorcima u skladu je sa publikovanim rezultatima ⁴¹ (Slika 64).



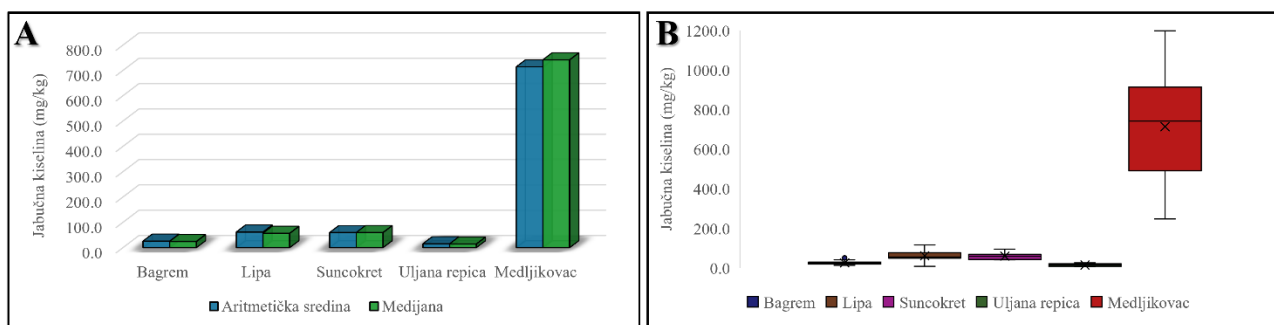
Slika 64. Sadržaj galakturonske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Glukuronska kiselina, iako se navodi kao jedna od dominantnih organskih kiselina u medu, često nije detektovana u značajnim koncentracijama uobičajenim analitičkim pristupima, što se objašnjava njenim prisustvom u formi D–glukono– δ –laktona. U odsustvu alkalne hidrolize tokom pripreme uzorka, laktonska forma ostaje stabilna i ne prelazi u slobodnu glukuronsku kiselinu, čime se otežava njeno kvantifikovanje i može doći do potcenjivanja njenog stvarnog sadržaja u medu. Sadržaj glukuronske kiseline pokazao je razlike u zavisnosti od biljne vrste. Najniže koncentracije i najuži opsezi detektovani su kod meda od uljane repice (0,2 – 7,4 mg/kg) i bagremovog meda (1,7 – 7,9 mg/kg). Znatno širi rasponi i veće vrednosti zabeleženi su u uzorcima suncokretovog (1,6 – 39,8 mg/kg) i lipovog meda (1,5 – 47,2 mg/kg). Medljikovac se posebno istakao najvećim varijabilitetom i maksimalnim koncentracijama u okviru analiziranog seta, sa vrednostima koje su se nalazile u intervalu od 0,2 do 82,3 mg/kg (Slika 65).



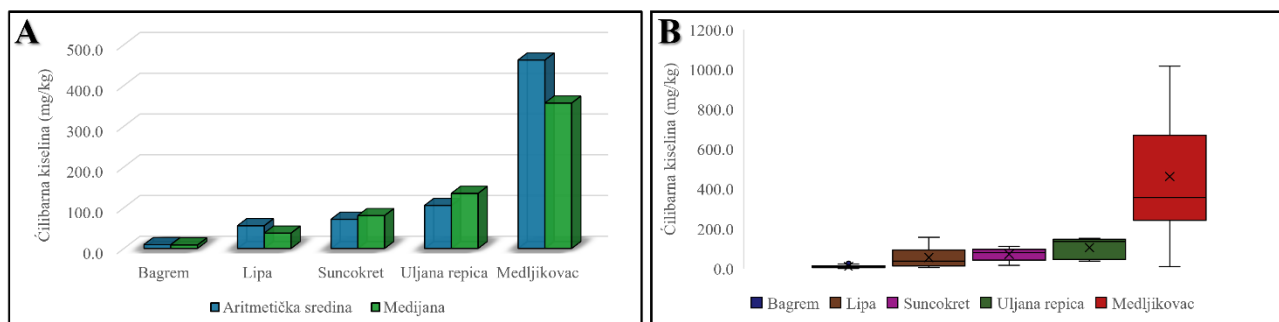
Slika 65. Sadržaj glukuronske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Jabučna kiselina je dikarboksilna kiselina koja je široko rasprostranjena u prirodi, posebno u voću. U medu je jabučna kiselina često prisutna kao rezultat metaboličkih aktivnosti pčela i mikrobiološke fermentacije, gde može nastati kao proizvod razgradnje šećera, posebno fruktoze. Njeno prisustvo takođe može biti povezano sa biljnim poreklom, jer mnoge biljke, posebno voće, sadrže jabučnu kiselinu u svom nektaru. Ova kiselina može biti i indikator zrelosti meda i njegovih senzorskih karakteristika. Najniže koncentracije jabučne kiseline detektovane su kod meda od uljane repice (6,4 – 26,8 mg/kg) i bagremovog meda (13,1 – 50 mg/kg). Nešto veći nivoi zabeleženi su u uzorcima suncokretovog meda (41 – 94 mg/kg), dok je lipov med pokazao specifičan, širi opseg od 7,7 do 116 mg/kg. S druge strane, medljikovac se jasno izdvojio maksimalnim koncentracijama u okviru celokupnog analiziranog seta, sa vrednostima koje su se nalazile u rasponu od 248 do 1200 mg/kg (Slika 66). Svi dobijeni opsezi, kako za nektarne vrste meda tako i za medljikovac, u skladu su sa raspoloživim literaturnim navodima ^{40, 44, 46, 47}.



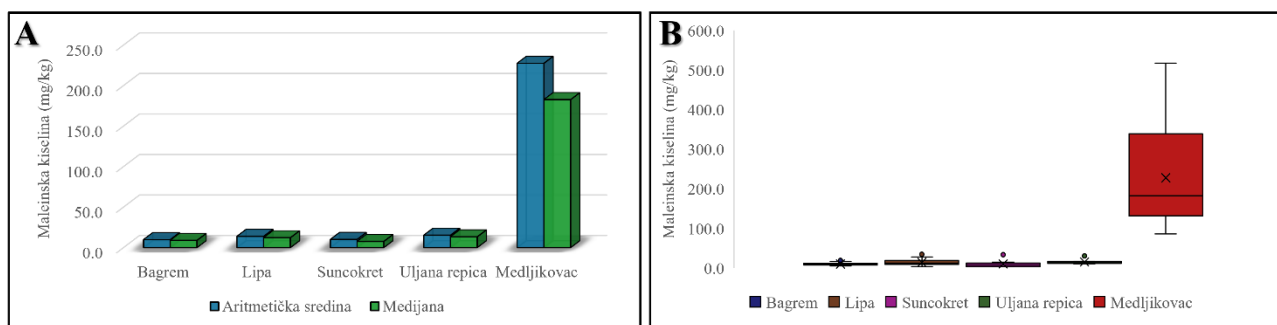
Slika 66. Sadržaj jabučne kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Ćilibarna kiselina je organska kiselina koja potiče od biljnih izvora. Neke biljke, kao što su vrste roda *Hippophae*, poznate po prisustvu ćilibarne kiseline, mogu doprineti njenoj koncentraciji u medu. Takođe, ćilibarna kiselina može biti prisutna zbog razgradnje fenolnih jedinica u nektaru tokom prerade meda od strane pčela, ili kao rezultat aktivnosti mikroorganizama prisutnih u medu. Sadržaj ćilibarne kiseline varirao je među ispitivanim uzorcima, pri čemu su najniže koncentracije detektovane u bagremovom medu (0,2 – 26,8 mg/kg). Veći nivoi zabeleženi su kod suncokretovog meda (16 – 110 mg/kg) i meda od uljane repice (38 – 160 mg/kg), dok je lipov med pokazao nešto širi raspon koncentracija (4,6 – 160 mg/kg). Medljikovac se i u ovom slučaju jasno izdvojio maksimalnim koncentracijama u okviru analiziranog seta, uz izuzetno visok varijabilitet, sa vrednostima koje su se nalazile u intervalu od 9 do 1020 mg/kg (Slika 67). Dobijeni rezultati su u skladu sa dostupnim literaturnim podacima ^{40, 44, 46, 47, 162}.



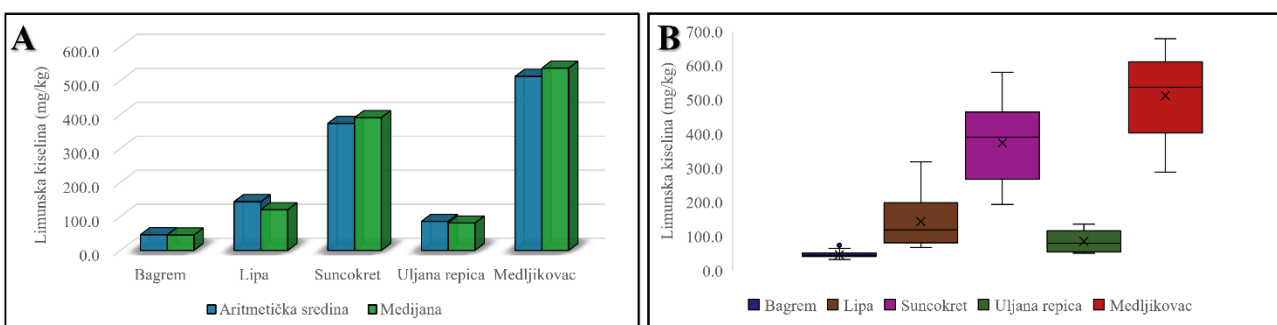
Slika 67. Sadržaj ćilibarne kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Maleinska kiselina je *cis*-izomer fumarne kiseline i može biti prisutna u medu kao rezultat mikrobiološke aktivnosti u procesu fermentacije. Maleinska kiselina se obično javlja u niskim koncentracijama u medu sa višim nivoima fermentacije ili kontaminacije mikroorganizmima. Pored toga, maleinska kiselina može biti prisutna u nektaru biljaka koje prirodno sadrže ovo jedinjenje, naročito u biljkama koje imaju specifičan metabolički profil. Sadržaj maleinske kiseline pokazao je niske vrednosti kod svih nektarnih vrsta meda, sa uskim opsezima variranja u uzorcima bagremovog (4,7 – 20 mg/kg), lipovog (3,1 – 35 mg/kg), suncokretovog (3,5 – 33 mg/kg) i meda od uljane repice (10 – 30 mg/kg). Nasuprot njima, medljikovac se izdvojio većim sadržajem ovog jedinjenja, dostižući koncentracije od 90 do 520 mg/kg (Slika 68). Svi kvantifikovani opsezi u potpunosti su saglasni sa dostupnom literaturom ⁴⁰.



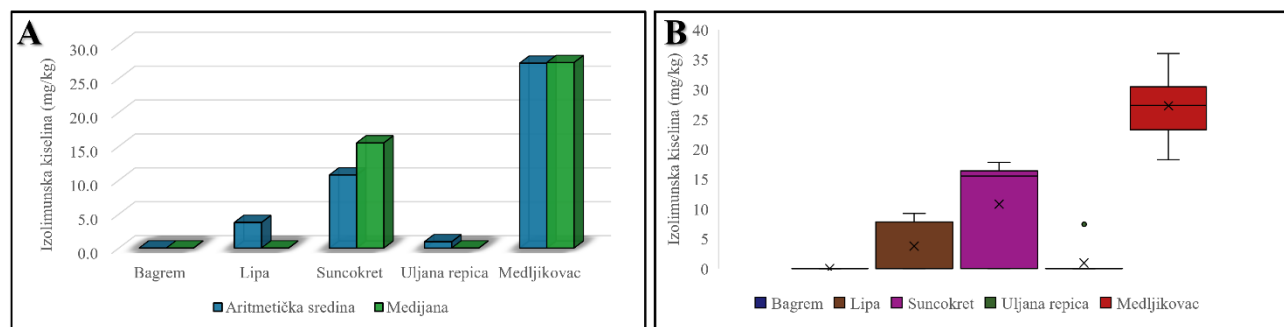
Slika 68. Sadržaj maleinske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Limunska kiselina je trikarbonska kiselina koja je široko rasprostranjena u biljnom svetu, posebno u citrusima. Limunska kiselina u medu je biljnog porekla, jer mnoge biljke koje pčele posećuju, uključujući citruse, sadrže značajne količine limunske kiseline u svom nektaru. Takođe, limunska kiselina može nastati i kao produkt metaboličkih aktivnosti pčela ili mikroorganizama prisutnih u medu tokom prerade i skladištenja. Sadržaj limunske kiseline (Slika 69) pokazao je specifičnu distribuciju u zavisnosti od biljnog porekla, pri čemu su najniže koncentracije detektovane kod uzoraka bagremovog meda (32 – 74 mg/kg) i meda od uljane repice (51 – 135 mg/kg). Nešto širi opseg zabeležen je kod lipovog meda (68 – 317 mg/kg), dok su maksimalne vrednosti kvantifikovane u suncokretovom medu (194 – 580 mg/kg) i medljikovcu (289 – 680 mg/kg). Utvrđeni opsezi saglasni su sa raspoloživom literaturom ^{40, 41, 46}.



Slika 69. Sadržaj limunske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Izolimunska kiselina je organska kiselina koja se može naći u nekim vrstama meda, naročito u medu koji potiče od biljaka koje sadrže limunsku kiselinu u svom nektaru. Iako retko proučavana, izolimunska kiselina može nastati metaboličkom konverzijom limunske kiseline ili kao rezultat aktivnosti mikroorganizama tokom fermentacije meda. Biljke koje sadrže visok nivo limunske kiseline mogu doprineti prisustvu izolimunske kiseline u medu. Izolimunska kiselina nije detektovana u uzorcima bagremovog meda, što je u skladu sa literaturnim podacima ⁴¹. Niske koncentracije ovog jedinjenja detektovane su kod ostalih nektarnih medova, sa opsezima variranja u uzorcima meda od uljane repice (0,0 – 7,4 mg/kg), lipovog (0,0 – 9,2 mg/kg) i suncokretovog meda (0,0 – 17,8 mg/kg). Medljikovac se jasno izdvojio većim sadržajem, sa kvantifikovanim vrednostima u rasponu od 18,2 do 36,0 mg/kg (Slika 70). Svi utvrđeni opsezi za posmatrane biljne vrste meda u skladu su sa ranijim istraživanjima ⁴¹.



Slika 70. Sadržaj izolimunske kiseline u ispitivanim uzorcima meda: A) aritmetičke sredine i medijane B) medijane sa opsezima

Profil organskih kiselina pokazao je jasnu diferencijaciju između autentičnih i sumnjivih uzoraka bagremovog meda. Autentični uzorci (Prilog 1, uzorci B1–B60), karakterisani odgovarajućim F/G odnosom ¹⁵¹, imali su ograničen sadržaj limunske kiseline, pri čemu rezultati ukazuju da njena gornja granica ne bi trebalo da prelazi 65,0 mg/kg, uz potpuno odsustvo izolimunske kiseline. Nasuprot tome, sumnjivi uzorci (Prilog 1, uzorci B61–B74) sa sniženim F/G odnosom odlikovali su se znatno većim koncentracijama limunske kiseline i prisustvom izolimunske kiseline, koja nije karakteristična za autentičan bagremov med. Dobijeni rezultati ukazuju da praćenje sadržaja limunske i izolimunske kiseline predstavlja pouzdan, brz i praktičan analitički pristup za detekciju krivotvorenja bagremovog meda invertnim sirupima, primenjiv kao efikasna metoda skrininga u rutinskoj kontroli autentičnosti.

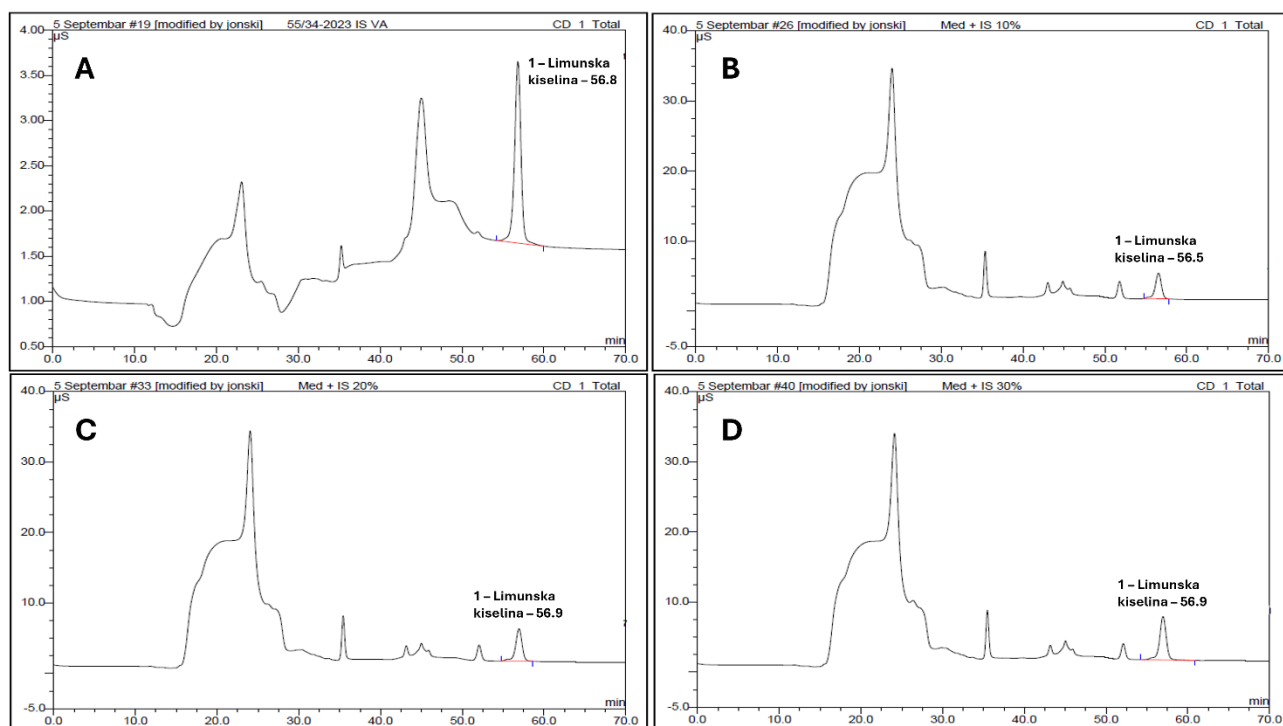
4.7.4. Model–sistem bagremovog meda sa udelom invertnog sirupa

Radi dodatne provere mogućnosti korišćenja sadržaja limunske kiseline kao pokazatelja autentičnosti, odnosno za detekciju krivotvorenja meda, sproveden je eksperiment mešanja autentičnog meda sa invertnim sirupom. U tu svrhu, autentičan uzorak bagremovog meda (B1) pomešan je sa invertnim sirupom u različitim masenim proporcijama (10%, 20% i 30%). Pre mešanja, izvršena je analiza čistog invertnog sirupa (Prilog 10), pri čemu je prosečan sadržaj limunske kiseline iznosio 1290 ± 40 mg/kg. Takođe, autentični uzorak bagremovog meda analiziran je pre dodatka sirupa, pri čemu je prosečan sadržaj limunske kiseline iznosio 60 ± 2 mg/kg (Tabela 15).

Tabela 15. Prosečan sadržaj limunske kiseline u autentičnom i uzorku bagremovog meda krivotvorenom invertnim sirupom (poređenje eksperimentalno dobijene i teorijski izračunate vrednosti)

Uzorak	Eksperimentalna vrednost (mg/kg)	Teorijska vrednost (mg/kg)
B1	60 ± 2	-
IS	1290 ± 40	-
B1 + IS 10%	225 ± 6	232
B1 + IS 20%	298 ± 8	304
B1 + IS 30%	420 ± 10	424

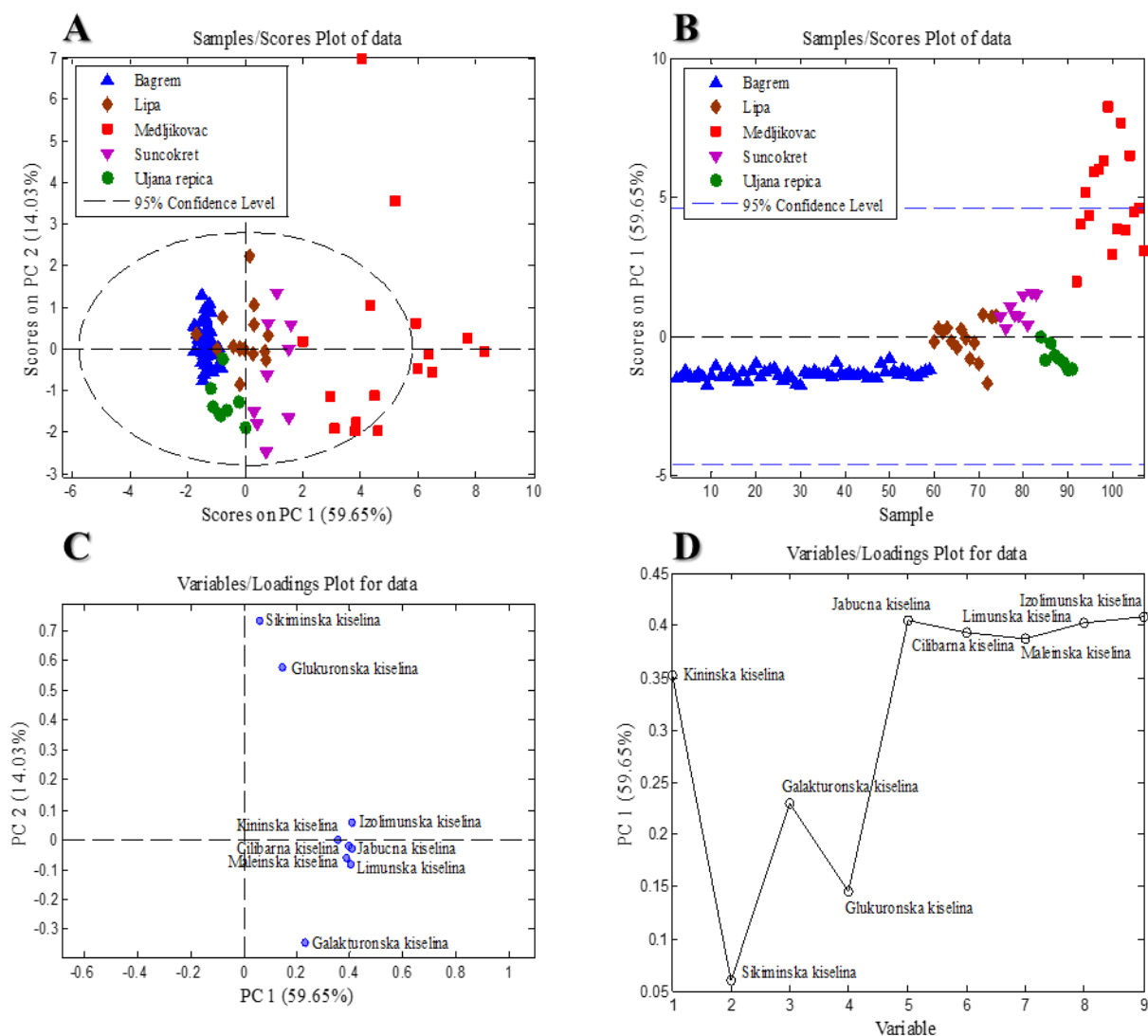
Nakon dodavanja invertnog sirupa u autentičan uzorak meda, eksperimentalno je određen sadržaj limunske kiseline u dobijenim smešama. Istovremeno, izračunat je teoretski očekivani sadržaj limunske kiseline, na osnovu poznatih masenih udela autentičnog meda i invertnog sirupa. Dobijeni eksperimentalni rezultati pokazali su dobro slaganje sa teorijskim vrednostima, što potvrđuje pretpostavku da dodatak sirupa invertovanog pomoću limunske kiseline, dovodi do povećanja koncentracije limunske kiseline u medu (Slika 71). Ovi rezultati dodatno ukazuju na potencijalnu primenljivost sadržaja limunske kiseline kao parametra za ocenu autentičnosti meda.



Slika 71. Hromatogrami: A) sirupa invertovanog limunskom kiselinom B) dodatak 10% invertnog sirupa uzorku autentičnog bagremovog meda C) dodatak 20% invertnog sirupa uzorku autentičnog meda i D) dodatak 30% invertnog sirupa uzorku autentičnog bagremovog meda

U cilju procene potencijala profila organskih kiselina za diferencijaciju meda prema biljnom poreklu, sprovedena je analiza glavnih komponenata na podacima koji se odnose na sadržaj organskih kiselina. Dobijeni model obuhvata tri glavne komponente, koje zajedno objašnjavaju 86,46% ukupne varijabilnosti među analiziranim podacima. Prva glavna komponenta obuhvata 59,65% ukupne varijanse, dok druga (PC2) i treća komponenta (PC3) doprinose sa dodatnih 14,03%, odnosno 12,77%, redom. Preostali deo varijabiliteta, sadržan u komponentama višeg reda, nije imao značajan uticaj na modelovanje strukture podataka.

Na grafikonu skorova latentnih varijabli (Slika 72A) identifikovana su dva jasno definisana klastera. Uzorci bagremovog meda grupisani su zajedno sa uzorcima lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice, za razliku od prethodno sprovedenih PCA analiza (Slika 41 i Slika 56), u kojima su se na osnovu pojedinačnih parametara, uzorci bagremovog meda jasno razlikovali od ostalih ispitivanih nektarnih medova. Nasuprot tome, uzorci medljikovca formirali su izdvojen klaster, karakterisan pozitivnim vrednostima duž PC1 i negativnim duž PC2.



Slika 72. Analiza glavnih komponenata za profil organskih kiselina: A) grafik skorova latentnih varijabli B) skorovi latentnih varijabli duž PC1 C) grafik vektora latentnih varijabli D) grafik vektora latentnih varijabli za PC1

Detaljna analiza grafikona koeficijenata latentnih varijabli (Slika 72C) ukazala je na značajan doprinos pojedinih organskih kiselina u procesu diferencijacije između dva identifikovana klastera. Uzorci medjickovca odlikovali su se višim sadržajem limunske, jabučne, izolimunske, maleinske, čilbarne i kininske kiseline u poređenju sa sadržajem ovih kiselina u grupi uzoraka bagremovog, lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice.

Tabela 16. Parametri deskriptivne statistike za kvantifikovane organske kiseline (mg/kg) uzoraka meda

Biljna vrsta meda	Parametar deskriptivne statistike	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
Bagrem	$X_{\min}$	1030	360	2,9	1,7	13,1	0,2	4,7	32	0,0
	$X_{\max}$	3500	720	9,9	7,9	50	26,8	20	74	0,0
	$\bar{x}$	2060	530	5,6	4,1	25,3	9,3	9,8	46	0,0
	$\tilde{x}$	1960	520	5,6	3,7	23,9	8,4	8,8	45	0,0
	s	480	80	1,3	1,4	7,6	6,1	3,8	8	0,0
Lipa	$X_{\min}$	1980	230	0,7	1,5	7,7	4,6	3,1	68	0,0
	$X_{\max}$	7230	840	12,6	47,2	116	160	35	317	9,2
	$\bar{x}$	5070	530	6,7	11,2	61	56	13,9	140	3,8
	$\tilde{x}$	5320	490	6,1	9,2	56	38	12,1	120	0,0
	s	1540	160	3,6	10,8	24,3	49,5	8,7	80	4,2
Suncokret	$X_{\min}$	3240	94	7,1	1,6	41	16	3,5	194	0,0
	$X_{\max}$	6700	640	15,0	39,8	94	110	33,3	580	17,8
	$\bar{x}$	4890	370	9,6	18,9	59	72	10,0	374	10,8
	$\tilde{x}$	4980	350	8,5	19,4	59	80	7,5	390	15,5
	s	1110	150	2,5	13,7	17,3	32,1	9,5	130	8,1
Uljana repica	$X_{\min}$	2190	230	6,6	0,2	6,4	38	10	51	0,0
	$X_{\max}$	4680	460	11,4	7,4	26,8	160	30	135	7,4
	$\bar{x}$	2980	320	8,2	2,3	14,8	106	15	85	0,9
	$\tilde{x}$	2470	300	7,6	0,8	14,1	135	13	80	0,0
	s	970	80	1,7	3,0	7,3	52,5	6,3	33	2,6
Medljikovac	$X_{\min}$	5540	220	6,0	0,2	248	9	90	289	18,2
	$X_{\max}$	7720	1300	12,6	82,3	1200	1020	520	680	36,0
	$\bar{x}$	6460	540	8,9	18,4	710	460	230	510	27,3
	$\tilde{x}$	6330	520	8,6	2,7	740	360	180	540	27,4
	s	630	270	1,7	27,8	257	293	126	120	4,7

4.8. Diferencijacija uzoraka meda prema biljnom poreklu

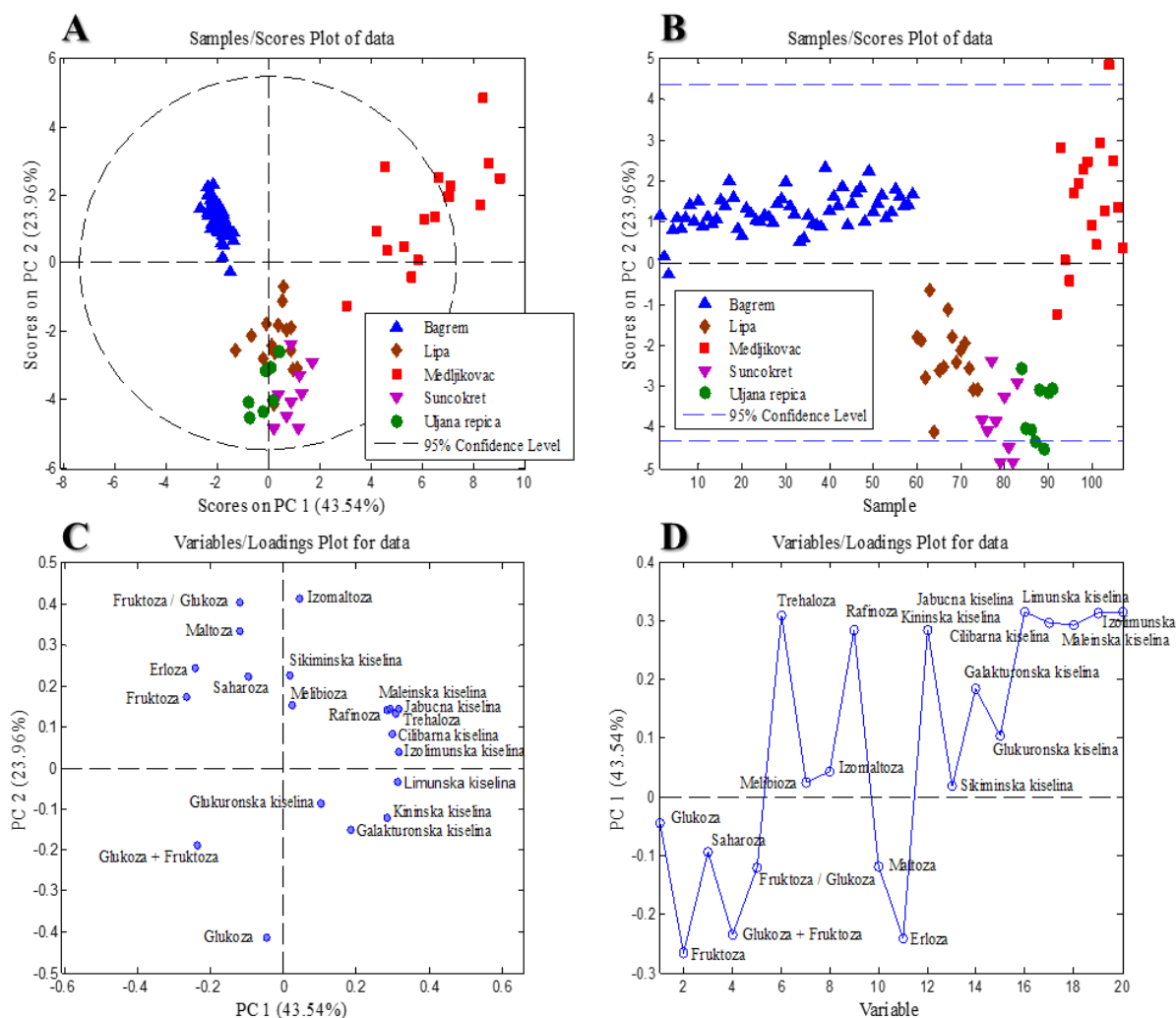
Savremeni izazovi u osiguranju autentičnosti meda zahtevaju sve sofisticiranije pristupe u kontroli kvaliteta, naročito u kontekstu učestalih krivotvorenja koja obuhvataju kako direktne tako i indirektne metode falsifikovanja. Ovi oblici krivotvorenja, koji često ostaju neotkriveni tradicionalnim metodama kontrole poput fizičko–hemijske i/ili polenske analize, zahtevaju primenu višedimenzionalnih i visoko osetljivih analitičkih tehnika koje mogu otkriti suptilne razlike u hemijskom sastavu između autentičnih i potencijalno krivotvorenih uzoraka.

U ovom poglavlju prikazana je primena metoda PCA i PLS–DA, razvijenih na autentičnim uzorcima različitih biljnih vrsta meda, sa ciljem identifikovanja najznačajnijih parametara za njihovu diferencijaciju. Poseban akcenat stavljen je na sposobnost ovih modela da precizno klasifikuju uzorke meda prema biljnom poreklu, kao i na potencijalnu upotrebu identifikovanih parametara u otkrivanju indirektnih i direktnih oblika krivotvorenja. Rezultati prikazani u nastavku predstavljaju ključni deo ove studije, jer potvrđuju praktičnu primenljivost predloženog višekomponentnog analitičkog pristupa u savremenoj kontroli kvaliteta i autentičnosti meda.

U cilju procene potencijala profila šećera i organskih kiselina za diferencijaciju meda prema biljnom poreklu, urađena je analiza glavnih komponenata na eksperimentalnim podacima. Dobijeni model obuhvata tri glavne komponente, koje kumulativno objašnjavaju 79,61% ukupne varijabilnosti među analiziranim uzorcima. Prva glavna komponenta obuhvata 43,54% ukupne varijanse, dok PC2 i PC3 doprinose sa dodatnih 23,96% i 12,11%, redom. Preostali deo varijabiliteta, sadržan u komponentama višeg reda, nije imao značajan doprinos u modelovanju strukture podataka.

Na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 73A), uočena su tri jasno definisana klastera. Uzorci bagremovog meda grupisani su pri negativnim vrednostima PC1 i pozitivnim vrednostima PC2, ukazujući na njihovu hemijsku specifičnost u odnosu na ostale analizirane vrste. Uzorci medljikovca formiraju zaseban klaster, okarakterisan pozitivnim skorovima duž PC1 i PC2. Treći klaster, koji obuhvata uzorke lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice, lociran je u domenu negativnih vrednosti PC2 i rasute oko nule duž PC1, sugerišući njihovu međusobnu sličnost u ispitivanim parametrima.

Detaljnijom analizom grafika koeficijenata latentnih varijabli (Slika 73C) identifikovan je značajan doprinos pojedinih šećera i organskih kiselina u procesu diferencijacije uzoraka. Fruktaza, saharaza, maltoza, erloza i odnos fruktoza/glukoza, locirani u negativnom kvadrantu duž PC1 i pozitivnom duž PC2, pokazali su ključnu ulogu u razdvajanju bagremovog meda od ostalih vrsta. Nasuprot tome, melibioza, izomaltoza, trehaloza, rafinoza, i organske kiseline poput šikiminske, maleinske, jabučne, čilubarne, limunske i izolimunske, koji su pozicionirani na pozitivnom delu PC1 i PC2 doprineli su diferencijaciji uzoraka medljikovca od ostalih biljnih vrsta meda. Glukoza, suma glukoze i fruktoze, glukuronska i galakturonska kiselina doprinose razdvajanju uzoraka lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice od ostalih tipova meda.



Slika 73. Analiza glavnih komponenta za profil šećera i organskih kiselina: A) grafik skorova latentnih varijabli B) skorovi latentnih varijabli duž PC1 C) grafik vektora latentnih varijabli D) grafik vektora latentnih varijabli za PC1

Kombinacijom profila šećera i organskih kiselina dobija se bolje razdvajanje ispitivanih uzoraka prema biljnim vrstama meda nego kada se bilo koji parametar koristi sam za sebe. Kako je i očekivano unapređenje diferencijacije među biljnim vrstama meda, moguće je samo kada se kombinuju svi parametri analize poput fizičko-hemijskih parametara i odnosa izotopa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, zajedno sa navedenim profilima (Slika 74).

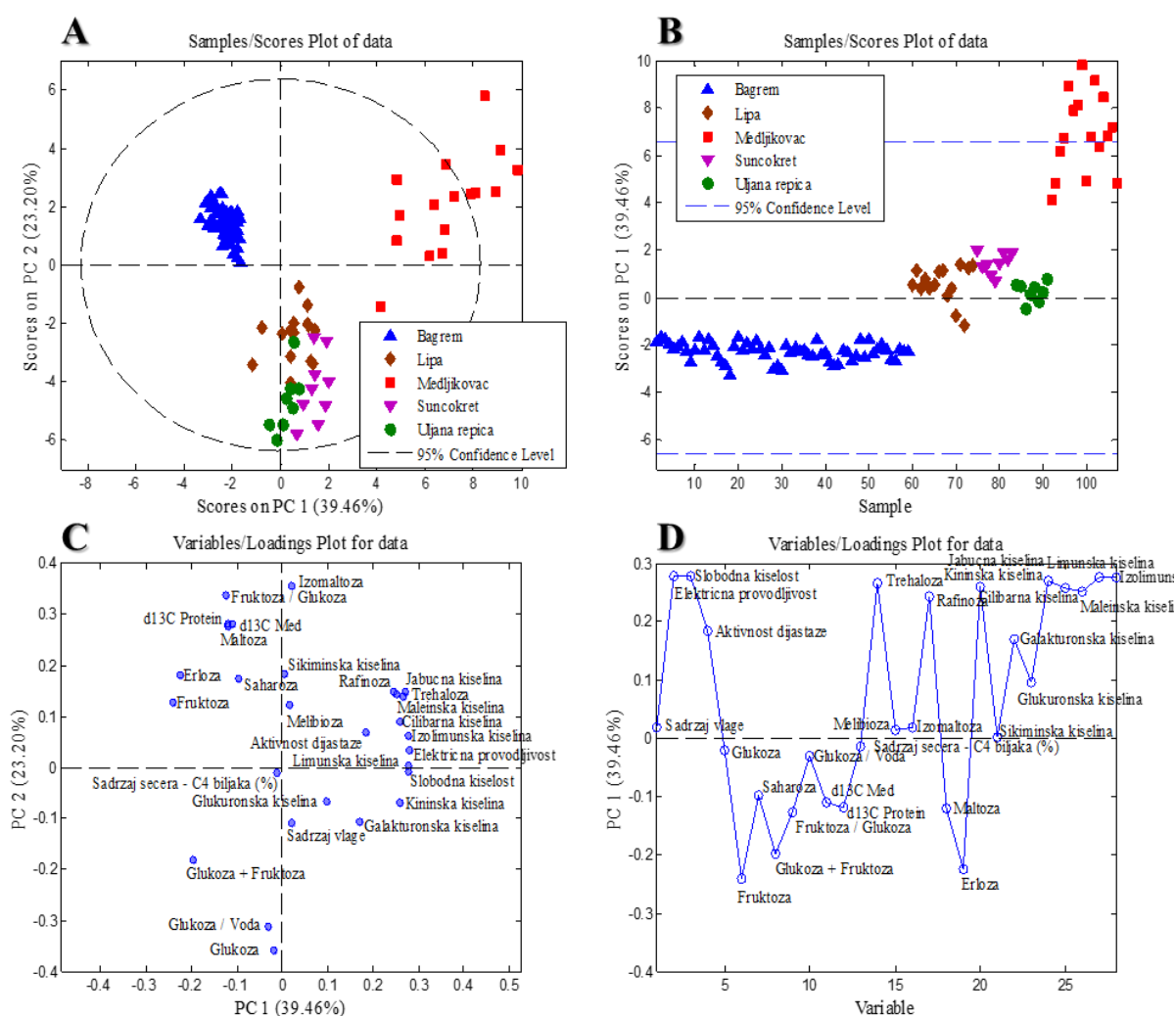
U cilju procene potencijala svih analiziranih parametara u ispitivanim uzorcima, za diferencijaciju meda prema biljnom poreklu, urađena je analiza glavnih komponenta na svim eksperimentalnim podacima. Dobijen je trokomponentni model koji kumulativno objašnjava 72,37% ukupne varijabilnosti među analiziranim uzorcima. Prva glavna komponenta obuhvata 39,46% ukupne varijanse, dok druga i treća komponenta doprinose sa dodatnih 23,20% i 9,71%, redom. Preostali deo varijabiliteta, sadržan u komponentama višeg reda, nije imao značajan doprinos u modelovanju strukture podataka.

Na grafiku skorova latentnih varijabli (Slika 74A), uočena su tri jasno definisana klastera. Uzorci bagremovog meda grupisani su pri negativnim vrednostima PC1 i pozitivnim vrednostima PC2, ukazujući na njihovu hemijsku distinktivnost u odnosu na ostale analizirane vrste. Uzorci medljikovca formiraju zaseban klaster, okarakterisan pozitivnim skorovima duž PC1 i PC2. Treći klaster, koji obuhvata uzorke lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice, lociran je u domenu negativnih

vrednosti PC2 i rasute oko nule duž PC1, sugerirajući njihovu međusobnu sličnost u ispitivanim parametrima.

Detaljnijom analizom grafika koeficijenata latentnih varijabli (Slika 74C) identifikovan je značajan doprinos pojedinih parametara u procesu diferencijacije uzoraka. Fruktaza, saharoza, maltoza, erloza, odnos fruktoza/glukoza, $\delta^{13}\text{C}_{\text{meda}}$ i $\delta^{13}\text{C}_{\text{proteina}}$, locirani u negativnom kvadrantu duž PC1 i pozitivnom duž PC2, pokazali su ključnu ulogu u razdvajanju bagremovog meda od ostalih vrsta. Nasuprot tome, parametri električna provodljivost, slobodna kiselost, aktivnost dijastaze, melibioza, izomaltoza, trehaloza, rafinoza, i organske kiseline poput šikiminske, maleinske, jabučne, čilubarne, limunske i izolimunske, koji su pozicionirani na pozitivnom delu PC1 i PC2 doprineli su diferencijaciji uzoraka medljikovca od ostalih biljnih vrsta meda. Sadržaj vode, glukoza, odnos glukoza/voda, suma glukoze i fruktoze, glukuronska i galakturonska kiselina doprinose razdvajanju uzoraka lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice od ostalih tipova meda.

Kombinacijom svih analiziranih hemijskih parametara meda dobija se šira slika i bolje razdvajanje biljnih vrsta nego kada se bilo koji parametar koristi kao uniforman.



Slika 74. Analiza glavnih komponenta za fizičko-hemijske parametre, odnose stabilnih izotopa ugljenika, profil šećera i organskih kiselina: A) grafik skorova latentnih varijabli B) skorovi latentnih varijabli duž PC1 C) grafik vektora latentnih varijabli D) grafik vektora latentnih varijabli za PC1

U prethodno sprovedenoj analizi PCA je korišćena u cilju identifikacije kriterijuma za diferencijaciju uzoraka meda prema njihovom biljnom poreklu. Prema dostupnim literaturnim podacima, karakterizacija prirodnih proizvoda, koji predstavljaju složene smeše sa velikim brojem prisutnih

jedinjenja, retko je moguća posmatranjem samo jedne klase hemijskih komponenti, već se najčešće zasniva na kombinaciji više različitih klasa analita. Saglasno tome i rezultati dobijeni u okviru ove disertacije predstavljaju primer relativno uspešne klasifikacije meda po biljnom poreklu na osnovu kombinacije više hemijskih parametara.

Iako je primena PCA metode omogućila uvid u unutrašnju strukturu podataka i ukazala na prisustvo određenih obrazaca koji mogu biti interpretirani u kontekstu biljnog porekla meda, ova metoda nije prikladna za klasifikaciju, već prvenstveno služi za preliminarni uvid u strukturu podataka i vizuelizaciju njihovog grupisanja. Za kvantitativnu evaluaciju klasifikacionog potencijala primenjenih analitičkih tehnika korišćena je PLS regresija sa diskriminativnim pristupom. U ovom modelu zavisna promenljiva predstavljala je kategoričku varijablu, odnosno biljnu vrstu kojoj pripada dati uzorak. Prilikom modelovanja, uzeta je u obzir činjenica da je broj biljnih vrsta bio ograničen samo na one sa statistički reprezentativnim brojem uzoraka, čime je obezbeđena pouzdanost dobijenih rezultata.

PLS–DA modeli (LV1 – LV3) pokazali su statističku značajnost i dobru prediktivnu sposobnost, naročito za uzorke bagremovog meda i medljikovca, što je potvrđeno visokim vrednostima koeficijenata determinacije za kalibraciju (R^2_{cal}) i validaciju (R^2_{cv}), kao i malom razlikom između greške kalibracije (RMSEC) i greške unakrsne validacije (RMSECV), koja je iznosila 0,01 za bagremov med i 0,03 za medljikovac (Tabela 17). Razlike između RMSEC i RMSECV kod lipovog meda bile su 0,07, kod suncokretovog 0,01, a kod meda od uljane repice 0,03. Niže vrednosti R^2_{cal} i R^2_{cv} zabeležene su za grupe lipovog, suncokretovog i meda od uljane repice, što ukazuje na ograničenu sposobnost ovih modela za pouzdano međusobno razdvajanje uzoraka ovih vrsta meda.

Modeli za bagremov med i medljikovac dodatno su se istakli visokim vrednostima koeficijenta determinacije za predikciju (R^2_{pred}) i niskim vrednostima greške predikcije (RMSEP), dok je greška misklasifikacije za ove dve vrste meda iznosila 0. Ovi rezultati ukazuju na visok stepen pouzdanosti PLS–DA modela u diferencijaciji bagremovog meda i medljikovca od ostalih biljnih vrsta meda na osnovu kombinovanih podataka za fizičko–hemijske parametrie, izotopski sastav ugljenika, profile šećera i organskih kiselina (Tabela 17).

Međutim, iako modeli za klasifikaciju medova od lipe, suncokreta i uljane repice nisu dostigli isti nivo preciznosti, to ne implicira njihovu statističku irelevantnost, već ukazuje na veću verovatnoću međusobne misklasifikacije, posebno između lipovog i suncokretovog meda. Vrednosti R^2_{cal} za pojedine grupe iznosile su: 0,9473 za bagremov med, 0,9261 za medljikovac, 0,4131 za lipov med, 0,2762 za suncokretov i 0,4844 za med od uljane repice (Tabela 17).

Tabela 17. Statističke performanse PLS–DA modela za klasifikaciju pet biljnih vrsta analiziranih medova

Parametar	Bagrem	Lipa	Suncokret	Uljana repica	Medljikovac
Broj latentnih varijabli – 3					
R^2_{cal}	0,9473	0,4131	0,2762	0,4844	0,9261
R^2_{cv}	0,9428	0,2040	0,2340	0,3369	0,9073
R^2_{pred}	0,9389	0,4562	0,2306	0,1765	0,8602
RMSEC	0,11	0,26	0,24	0,19	0,10
RMSECV	0,12	0,33	0,25	0,22	0,11
RMSEP	0,13	0,28	0,23	0,25	0,14
Class. Err (cal)	0	0,05	0,09	0,02	0
Class. Err (CV)	0	0,10	0,15	0,01	0
Class. Err (pred)	0	0,15	0,10	0,25	0

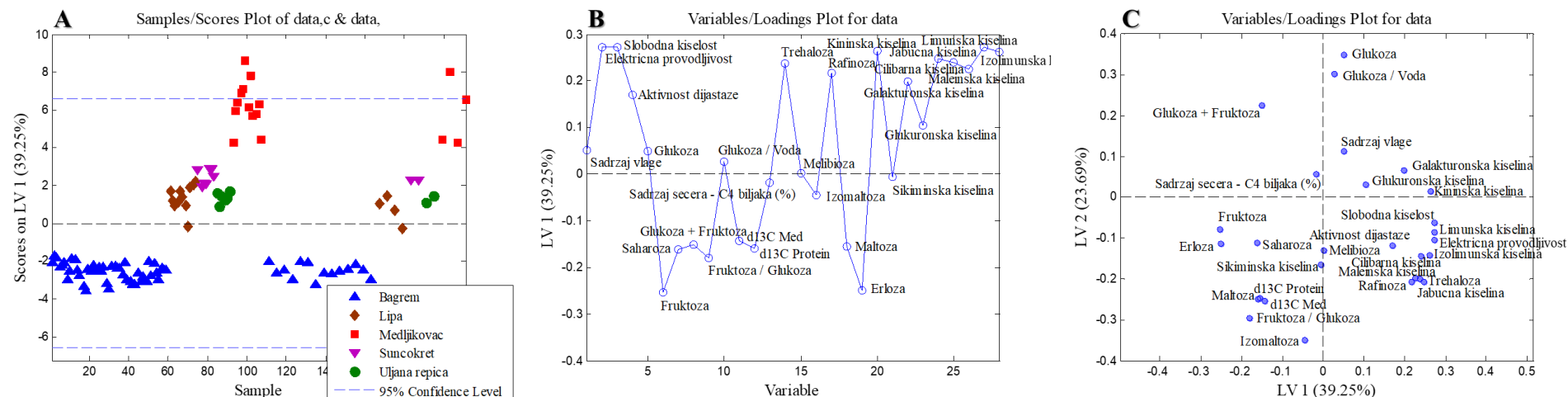
Na osnovu analize grafika skorova latentnih varijabli (LV1) prikazanog na Slici 75A, može se uočiti jasno razdvajanje uzoraka meda različitog biljnog porekla. Ovakvo razdvajanje ostvareno je na osnovu parametara prikazanih na grafiku vektora latentnih varijabli (Slika 75B), pri čemu su identifikovani ključni parametri slični onima uočenim u PCA analizi (Slika 74). Test set, koji obuhvata uzorke prikazane na desnoj strani grafikona na Slici 76A, pokazuje dobro poklapanje sa validacionim setom, što ukazuje na uspešnu klasifikaciju uzoraka u skladu sa biljnim poreklom putem razvijenog modela. Za grupu medljikovaca identifikovani parametri koji doprinose razdvajanju uključuju: slobodnu kiselost, električnu provodljivost, aktivnost dijastaze, kao i prisustvo šećera (trehaloza, rafinoza) i organskih kiselina (kininska, ćilibarna, jabučna, maleinska, limunska i izolimunska). Nasuprot tome, uzorke bagremovog meda karakterišu sadržaj fruktoze, erloze, maltoze, saharoze, zbirne vrednosti glukoze i fruktoze, kao i specifični odnosi izotopa ugljenika meda i proteina. Lipov, suncokretov i med od uljane repice pokazuju međusobno slične obrasce, pri čemu su parametri koji doprinose njihovoj diferencijaciji sadržaj vode, koncentracija glukoze, odnos glukoze i vode, kao i prisustvo melibioze, izomaltoze i šikimske kiseline.

S obzirom na to da su autentični uzorci bagremovog meda pokazali visoke vrednosti koeficijenata determinacije u fazama kalibracije (R^2_{cal}) i unakrsne validacije (R^2_{cv}), posebno su analizirani rezultati PLS–DA modela za ovu grupu meda. Rezultati prikazani na Slici 76 jasno ukazuju na odsustvo misklasifikacije testiranih uzoraka, pri čemu je postignuto potpuno poklapanje sa validacionim setom, što potvrđuje visoku pouzdanost modela u identifikaciji bagremovog meda. Analizom VIP skorova, prikazanih na Slici 76B, identifikovani su ključni parametri koji značajno doprinose razdvajanju uzoraka, pri čemu svi pokazuju važnost iznad proseka. Među najrelevantnijim parametrima izdvajaju se: električna provodljivost, slobodna kiselost, fruktoza, trehaloza, rafinoza, maltoza, erloza, $\delta^{13}C$ vrednosti proteina, kao i prisustvo organskih kiselina – kininske, jabučne, ćilibarne, maleinske, limunske i izolimunske. Dodatno, uvidom u regresione koeficijente modela prikazane na Slici 76C, identifikovani su parametri sa značajnim pozitivnim i negativnim uticajem na klasifikaciju. Parametri sa pozitivnim uticajem uključuju fruktozu, maltozu, izomaltozu, erlozu, $\delta^{13}C$ vrednosti proteina i $\delta^{13}C$ vrednosti meda. S druge strane, negativan doprinos modelu imaju slobodna kiselost, električna provodljivost, glukoza, odnos glukoze i vode, kao i kininska, galakturonska i limunska kiselina.

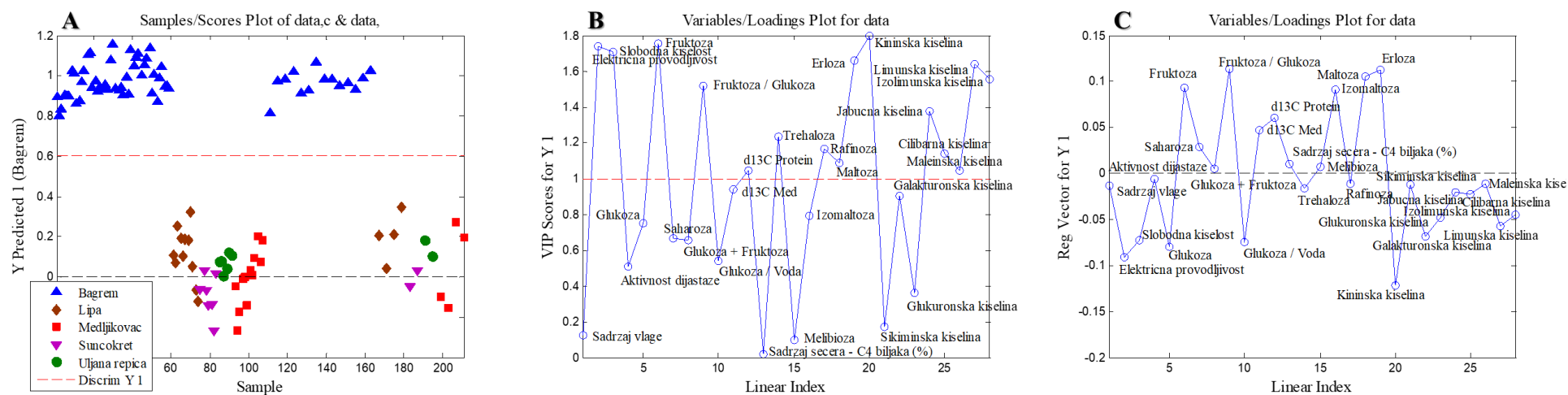
Za autentične uzorke medljikovca, koji su u prethodnim analizama pokazali visoke vrednosti koeficijenata determinacije za kalibraciju (R^2_{cal}) i unakrsnu validaciju (R^2_{cv}), konstruisan je izdvojeni PLS–DA model (Slika 77). Odsustvo misklasifikacije u test setu, uz potpuno poklapanje sa validacionim uzorcima, potvrđuje stabilnost i prediktivnu pouzdanost modela za ovu biljnu vrstu meda. Prema grafiku VIP skorova (Slika 77B), parametri sa izraženim doprinosom razdvajanju medljikovca od ostalih uzoraka uključuju: električnu provodljivost, slobodnu kiselost, fruktozu, glukoza, trehalozu, rafinozu, izomaltozu, maltozu i erlozu, kao i stabilne izotopske odnose ($\delta^{13}C$ meda i $\delta^{13}C$ proteina). Takođe, među značajnim determinativnim faktorima nalaze se i organske kiseline: kininska, jabučna, ćilibarna, maleinska, limunska i izolimunska. Analiza regresionog vektora (Slika 77C) dodatno osvetljava ulogu pojedinačnih promenljivih u modelu. Parametri koji pozitivno utiču na klasifikaciju medljikovca obuhvataju: slobodnu kiselost, električnu provodljivost, aktivnost dijastaze, izomaltozu, rafinozu, trehalozu, kao i većinu zastupljenih organskih kiselina (kininska, ćilibarna, jabučna, maleinska, limunska i izolimunska). Nasuprot tome, glukoza, zbir glukoze i fruktoze, kao i odnos glukoze i sadržaja vode pokazali su negativan uticaj na model.

Rezultati istraživanja pokazali su da je pouzdana klasifikacija i diferencijacija medova prema biljnom poreklu ostvarena jedino kombinovanjem različitih analitičkih pokazatelja – profila šećera i organskih kiselina, fizičko–hemijskih parametara i odnosa izotopa ugljenika. Među ispitivanim vrstama bagremov med se jasno izdvojio zahvaljujući visokom sadržaju fruktoze, saharoze, erloze i maltoze, kao i najvećem F/G odnosu i niskoj električnoj provodljivosti. Medljikovac se razlikovao od nektarskih vrsta meda prema sadržaju trehaloze, rafinoze, izomaltoze i melibioze, u kombinaciji sa

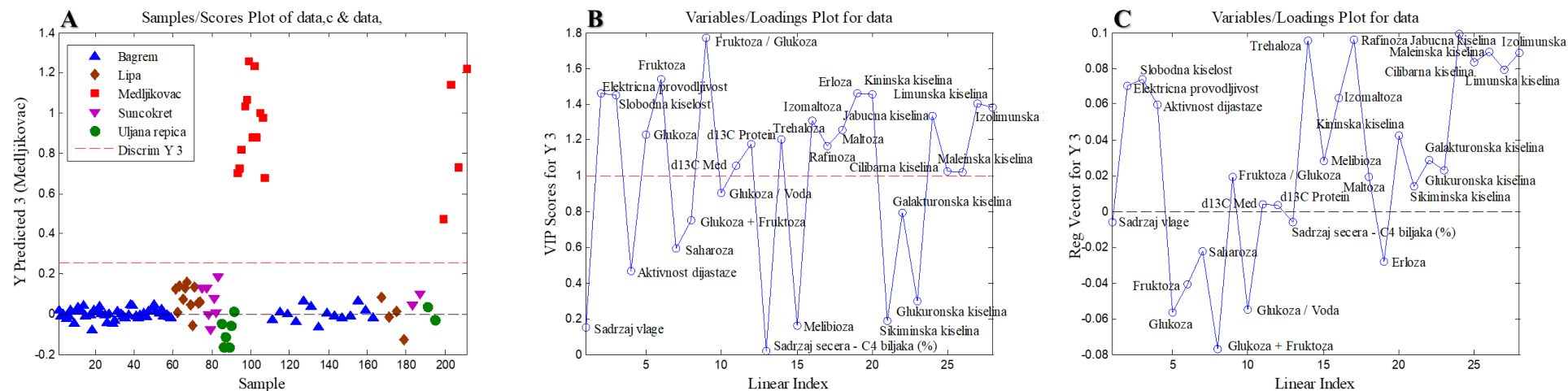
značajno višim koncentracijama organskih kiselina – jabučne, limunske, izolimunske, maleinske, kininske i ćilibarne. Ovi parametri, zajedno sa visokom električnom provodljivošću, slobodnom kiselošću i aktivnošću diastaze, omogućili su jasno razlikovanje medljikovca od svih ispitivanih nektarskih vrsta meda. Suprotno tome, lipov, suncokretov i med od uljane repice pokazali su međusobnu hemijsku sličnost, ali su se odvojili od bagremovog i medljikovca zahvaljujući razlikama u fizičko–hemijskim parametrima poput sadržaja glukoze, odnosa glukoze i vode, sadržaja glukuronske i galakturonske kiseline kao odnosu stabilnih izotopa ugljenika. Kod lipovog meda uočena je veća slobodna kiselost i značajan doprinos šikimske kiseline, dok su suncokretov i med od uljane repice karakterisali niski F/G i visoki G/V odnosi. Ovi nalazi jasno ukazuju da nijedna pojedinačna grupa analita (šećeri ili kiseline) nije dovoljna za potpunu klasifikaciju, već da se najviši stepen tačnosti i pouzdanosti postiže integracijom različitih hemijskih markera, čime je potvrđena praktična primenljivost razvijenog višekomponentnog analitičkog pristupa u kontroli autentičnosti i određivanju biljnog porekla meda.



Slika 75. PLS-DA primenjen na podacima autentičnih uzoraka meda (kalibracioni i test set): A) grafik skorova latentnih varijabli duž LV1 B) grafik vektora latentnih varijabli duž LV1 C) grafik vektora latentnih varijabli



Slika 76. PLS-DA predikcioni model za autentične uzorke bagremovog meda: A) grafik skorova B) vip skorovi C) regresioni vektori



Slika 77. PLS–DA predikcioni model za autentične uzorke medljikovca: A) grafik skorova B) vip skorovi C) regresioni vektori

5. ZAKLJUČAK

Ova doktorska disertacija obuhvata razvoj, optimizaciju i unapređenje metoda visokoeфикаsne tečne hromatografije za određivanje profila šećera i organskih kiselina sa ciljem pouzdanije procene autentičnosti meda različitog biljnog porekla. U okviru istraživanja analizirani su uzorci pet biljnih vrsta meda: bagremovog, lipovog, suncokretovog, meda od uljane repice i medljikovca.

Melizopalinološka analiza potvrđena je kao neophodna osnova za verifikaciju biljnog porekla nektarnih medova i medljikovaca, dok su fizičko–hemijski parametri omogućili potvrdu osnovnih kriterijuma kvaliteta prema zahtevima važećih propisa, odnosno pravilnika i direktiva. Rezultati su pokazali da sadržaj pojedinačnih šećera, njihovi međusobni odnosi, električna provodljivost, slobodna kiselost i aktivnost dijastaze, osim uloge u proceni kvaliteta, poseduju izražen diskriminatorni potencijal za diferencijaciju meda prema biljnom poreklu. Primena multivarijantnih statističkih metoda omogućila je integraciju većeg broja fizičko–hemijskih parametara i pouzdanu klasifikaciju uzoraka. Dobijeni rezultati potvrđuju da kombinovani pristup, zasnovan na melizopalinološkoj analizi, fizičko–hemijskim ispitivanjima i multivarijantnoj analizi podataka, predstavlja dobar osnov za kontrolu autentičnosti meda u skladu sa zakonskom regulativom.

Rezultati ispitivanja stabilnosti bagremovog meda tokom skladištenja pokazali su da vreme čuvanja značajno utiče na promene fizičko–hemijskih karakteristika. Tokom dvanaestomesečnog perioda zabeležen je statistički značajan porast slobodne kiselosti i sadržaja HMF–a, uz istovremeno smanjenje pH–vrednosti i aktivnosti dijastaze. Dobijeni rezultati potvrđuju da navedeni parametri predstavljaju pouzdane pokazatelje promena kvaliteta i stabilnosti meda tokom dugotrajnog skladištenja, čak i u odsustvu termičkog tretmana.

Poređenje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti meda i izolovanog proteina omogućilo je identifikaciju dodatka šećera poreklom od C4 biljaka i formiranje reprezentativnog skupa autentičnih uzoraka za dalju karakterizaciju profila šećera i organskih kiselina. Pored primarne uloge u detekciji C4 šećera, analiza stabilnih izotopa ugljenika pokazala je i određeni diskriminatorni potencijal u razlikovanju ispitivanih vrsta meda prema biljnom poreklu. Bagremov med i medljikovac jasno su se izdvojili od meda od uljane repice, dok se bagremov med uspešno diferencirao i u odnosu na suncokretov med.

Optimizacijom hromatografskih uslova razvijena je i validovana pouzdana HPAEC–PAD metoda za određivanje profila šećera u medu. Primena optimizovanog gradijenta omogućila je potpuno razdvajanje 11 mono–, di– i trisaharida sa vremenom analize od 35 minuta. Parametri validacije potvrdili su veoma visoku linearnost metode ($R^2 > 0,9999$), visoku preciznost i ponovljivost, uz granice detekcije od 0,01 do 0,02 g/100 g meda i granice kvantifikacije od 0,05 do 0,08 g/100 g meda. Dobijeni rezultati potvrđuju pogodnost metode za pouzdanu kvantifikaciju šećera prisutnih u medu i u veoma niskim koncentracijama. Analiza profila šećera pokazala je da pojedini di– i trisaharidi predstavljaju značajne markere biljnog porekla meda. Medljikovac se jasno izdvojio od ispitivanih nektarskih vrsta meda povećanim sadržajem trehaloze, melibioze i rafinoze, dok je bagremov med pokazao specifičan profil koji karakterišu veći sadržaj saharoze, maltoze i erloze u poređenju sa ostalim ispitivanim nektarnim vrstama meda. Integracija dobijenih hromatografskih podataka sa multivarijantnom analizom potvrdila je da optimizovani profil šećera predstavlja značajan alat za karakterizaciju i procenu autentičnosti meda.

U cilju unapređenja kontrole autentičnosti meda primenom relativno jednostavnih i široko dostupnih analitičkih metoda razvijena je i optimizovana HPTLC metoda za analizu profila ugljenih hidrata. Direktnim poređenjem sa odabranim šećernim sirupima potvrđeno je da prisustvo karakterističnih obrazaca oligosaharida može ukazati na krivotvorenje meda što je naročito značajno kod uzoraka kod kojih primena EA–IRMS metode nije omogućila pouzdanu ocenu autentičnosti zbog nemogućnosti izolovanja proteina. Rezultati su pokazali da HPTLC predstavlja značajnu komplementarnu tehniku u slučajevima kada izotopska analiza daje granične rezultate, jer može da

se primeni za razlikovanje autentičnih medova od uzoraka sa profilima karakterističnim za šećerne sirupe. Uzorci sa sadržajem šećera C4 biljaka manjim od 7% nisu pokazali prisustvo zona oligosaharida karakterističnih za ispitivane šećerne sirupe, već su imali profile šećera uporedive sa autentičnim uzorcima meda, ukazujući da autentičnost takvih uzoraka ne može biti procenjena samo na osnovu rezultata analize odnosa stabilnih izotopa ugljenika. Nasuprot tome, uzorci sa većim sadržajem C4 šećera pokazali su istovremenu neusaglašenost rezultata dobijenih primenom EA–IRMS, HPAEC–PAD i HPTLC metoda, potvrđujući prisustvo dodatnih šećera. Iako HPTLC metoda ima ograničenja u detekciji pojedinih tipova sirupa i pruža prvenstveno kvalitativne informacije, njena jednostavnost, ekonomičnost i mogućnost brze vizuelne interpretacije čine je pogodnom za početni skrining i selekciju uzoraka koji zahtevaju detaljniju instrumentalnu analizu. U kombinaciji sa EA–IRMS i HPAEC–PAD metodama, HPTLC doprinosi sveobuhvatnijoj i pouzdanijoj proceni autentičnosti meda kroz integrisani multidisciplinarni analitički pristup.

Razvijena, optimizovana i validovana metoda jonske hromatografije sa konduktometrijskom detekcijom omogućila je određivanje profila organskih kiselina u medu. Optimizacijom hromatografskih uslova postignuto je efikasno razdvajanje devet strukturno različitih mono-, di- i trikarboksilnih kiselina u okviru jedne analize. Parametri validacije potvrdili su visoku analitičku pouzdanost metode, karakterisanu veoma visokom linearnošću ($R^2 > 0,9980$), optimalnim analitičkim prinosom (74% – 108%), visokom preciznošću (HorRat < 2,0), kao i niskim granicama detekcije (LOD: 0,05–2,20 mg/kg) i kvantifikacije (LOQ: 0,18–7,30 mg/kg). Dobijeni parametri, uz pojednostavljen postupak pripreme uzoraka, potvrđuju pogodnost ove metode za pouzdanu karakterizaciju profila kiselina u meda i predstavljaju praktičnu alternativu složenijim instrumentalnim pristupima. Primena razvijene metode pokazala je da profil organskih kiselina predstavlja značajan hemijski pokazatelj kvaliteta i biljnog porekla meda. Medljikovci su se jasno izdvojili od svih ispitivanih nektarskih vrsta meda većim sadržajem organskih kiselina pri čemu su kininska, jabučna, ćilibarna, limunska, maleinska i izolimunska kiselina identifikovane kao ključni markeri ove grupe uzoraka. Ovakva diferencijacija potvrđena je multivarijantnom analizom formiranjem zasebnog klastera medljikovca, dok su nektarske vrste pokazale veću međusobnu sličnost. Dobijeni rezultati potvrđuju da organske kiseline, iako samostalno ne omogućavaju potpunu klasifikaciju svih vrsta meda, predstavljaju značajan dopunski parametar koji u kombinaciji sa drugim hemijskim markerima unapređuje pouzdanost procene autentičnosti. Poseban značaj analize organskih kiselina ogleda se u mogućnosti detekcije sofisticiranog krivotvorenja bagremovog meda dodatkom invertnog sirupa. Utvrđeno je da autentični bagremov med karakteriše nizak sadržaj limunske kiseline, manji od 65 mg/kg, i odsustvo izolimunske kiseline dok su sumnjivi uzorci pokazivali povišene koncentracije limunske kiseline i prisustvo izolimunske kiseline. Ovi rezultati potvrđuju potencijal praćenja prisustva i sadržaja navedenih kiselina u bagremovom medu kao pouzdanog pristupa u detekciji dodatka invertnog sirupa i proceni integriteta proizvodnog procesa.

Primena multivarijantnih statističkih metoda (PCA i PLS–DA) zasnovanih na integraciji profila šećera, organskih kiselina, fizičko–hemijskih parametara i odnosa stabilnih izotopa ugljenika, pokazala je da kombinovanje različitih analitičkih pokazatelja omogućava najpouzdaniju klasifikaciju meda prema biljnom poreklu. Razvijeni modeli omogućili su razdvajanje ispitivanih grupa, pri čemu su bagremov med i medljikovac pokazali najveću diskriminacionu moć bez misklasifikacije testiranih uzoraka. Bagremov med izdvojio se na osnovu specifičnog profila šećera, pre svega višeg sadržaja fruktoze, saharoze, maltoze i erloze, višeg F/G odnosa, kao i karakterističnih vrednosti odnosa stabilnih izotopa ugljenika. Među ispitivanim vrstama meda medljikovac je predstavljao hemijski najdistinktivniju grupu čije je razdvajanje bilo uslovljeno većim vrednostima električne provodljivosti, slobodne kiselosti i aktivnosti diastaze, kao i prisustvom specifičnih oligosaharida (trehaloza, rafinoza, izomaltoza i melibioza) i povišenim sadržajem organskih kiselina, posebno kininske, jabučne, ćilibarne, limunske, izolimunske i maleinske kiseline. Lipov, suncokretov i med od uljane repice pokazali su veću međusobnu sličnost i veći potencijal za međusobnu misklasifikaciju, što ukazuje na potrebu primene većeg broja komplementarnih pokazatelja za

pouzdaniju klasifikaciju. Dobijeni rezultati potvrđuju da nijedna pojedinačna grupa analita ne može obezbediti potpunu klasifikaciju i pouzdanu procenu autentičnosti meda, već da se najveća diskriminaciona moć postiže integracijom različitih hemijskih markera i primenom multivarijantne analize podataka. Na ovaj način potvrđena je praktična primenljivost razvijenog višekomponentnog analitičkog pristupa kao osnove za unapređenje postupaka kontrole kvaliteta, autentičnosti i određivanja biljnog porekla meda.

6. LITERATURA

1. Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius Commission, Revised codex standard for honey. CXS 234-1999, Rome: FAO and WHO. (1999).
2. Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, „Službeni glasnik RS” broj 101/2015.
3. da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. & Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* **196**, 309–323 (2016).
4. Pita-Calvo, C. & Vázquez, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **59**, 79–87 (2017).
5. Balkanska, R., Stefanova, K. & Stoikova – Grigorova, R. Main honey botanical components and techniques for identification: a review. *J. Apic. Res.* **59**, 852–861 (2020).
6. Pita-Calvo, C., Guerra-Rodríguez, M. E. & Vázquez, M. Analytical Methods Used in the Quality Control of Honey. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 690–703 (2017).
7. Trifković, J., Andrić, F., Ristivojević, P., Guzelmeric, E. & Yesilada, E. Analytical Methods in Tracing Honey Authenticity. *J. AOAC Int.* **100**, 827–839 (2017).
8. Anklam, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **63**, 549–562 (1998).
9. Fakhlaei, R., Selamat, J., Khatib, A., Abdull Razis, A. F., Sukor, R., Ahmad, S. & Babadi, A. A. The Toxic Impact of Honey Adulteration: A Review. *Foods* **9**, 1538 (2020).
10. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. & Gallmann, P. Honey for nutrition and health: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* **27**, 677–689 (2008).
11. Kamboj, R., Nayik, G. A., Bera, M. B. & Nanda, V. Sugar profile and rheological behaviour of four different Indian honey varieties. *J. Food Sci. Technol.* **57**, 2985–2993 (2020).
12. Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C. & Mammi, S. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* **8**, 679–690 (2012).
13. Kaškonienė, V. & Venskutonis, P. R. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safe.* **9**, 620–634 (2010).
14. Tedesco, R., Barbaro, E., Zangrando, R., Rizzoli, A., Malagnini, V., Gambaro, A., Fontana, P. & Capodaglio, G. Carbohydrate determination in honey samples by ion chromatography-mass spectrometry (HPAEC-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 5217–5227 (2020).
15. Schievano, E., Sbrizza, M., Zuccato, V., Piana, L. & Tessari, M. NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity. *Food Chem.* **309**, 125788 (2020).
16. Recklies, K., Peukert, C., Kölling-Speer, I. & Speer, K. Differentiation of Honeydew Honeys from Blossom Honeys and According to Their Botanical Origin by Electrical Conductivity and Phenolic and Sugar Spectra. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 1329–1347 (2021).
17. Pascual Maté, A., Rosés, S., Muiño, M. A. & Sancho, M. Methods of analysis of honey. *J. Apic. Res.* **57**, 38–74 (2018).
18. Jakanovski, M. V., Krstić, Đ. D., Pavlović, A. V., Trifković, J. Đ., Ristivojević, P. M. & Milojković-Opsenica, D. M. Tracing honey production authenticity: comparative performance evaluation of HPTLC, EA-IRMS, and HPAEC-PAD techniques. *Eur. Food Res. Technol.* **252**, (2026).
19. Consonni, R., Cagliani, L. R. & Cogliati, C. Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. *Food Control.* **32**, 543–548 (2013).
20. Cotte, J. F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J. & Grenier-Loustalot, M. F. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J. Chromatogr. A.* **1021**, 145–155 (2003).

- 21.Korošec, M., Bertoncelj, J., Pereyra Gonzales, A., Kropf, U., Golob, U. & Golob, T. Monosaccharides and oligosaccharides in four types of Slovenian honey. *Acta Alimentaria* **38**, 459–469 (2009).
- 22.Jakanovski, M. V., Horvački, N. M., Dramićanin, A. M., Radoičić, A. D., Šegan, S. B. & Milojković-Opsenica, D. M. Organic acids as promising authenticity markers of *Robinia pseudoacacia* honey. *J. Food Compos. Anal.* **148**, 108384 (2025).
- 23.Lazarević, K. B., Jovetić, M. S. & Tešić, Ž. L. Physicochemical Parameters as a Tool for the Assessment of Origin of Honey. *J. AOAC Int.* **100**, 840–851 (2017).
- 24.Lazarević, K. B., Andrić, F., Trifković, J., Tešić, Ž. & Milojković-Opsenica, D. Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chem.* **132**, 2060–2064 (2012).
- 25.Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M. & Seijo, M. C. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* **149**, 84–90 (2014).
- 26.Belay, A., Haki, G. D., Birringer, M., Borck, H., Lee, Y.-C., Cho, C.-W., Kim, K.-T., Bayissa, B., Baye, K. & Melaku, S. Sugar profile and physicochemical properties of Ethiopian monofloral honey. *Int. J. Food Prop.* **20**, 2855–2866 (2017).
- 27.Shaaban, B., Seeburger, V., Schroeder, A. & Lohaus, G. Suitability of sugar, amino acid, and inorganic ion compositions to distinguish fir and spruce honey. *Eur. Food Res. Technol.* **247**, 879–888 (2021).
- 28.Bentabol Manzanares, A., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R. & Romero, C. D. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chem.* **126**, 664–672 (2011).
- 29.Geana, E.-I. & Ciucure, C. T. Establishing authenticity of honey via comprehensive Romanian honey analysis. *Food Chem.* **306**, 125595 (2020).
- 30.Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bachir Bey, M., Djoudad-Kadji, H. & Louaileche, H. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.* **121**, 561–568 (2010).
- 31.Souares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P. & Mafra, I. A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 1072–1100 (2017).
- 32.De La Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J. & Martínez Castro, I. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.* **129**, 1483–1489 (2011).
- 33.Cordella, C. B. Y., Militão, J., Clément, M.-C., Drajnudel, P. & Cabrol-Bass, D. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: Preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **531**, 239–248 (2005).
- 34.Nozal, M. J., Bernal, J. L., Toribio, L., Alamo, M., Diego, J. C. & Tapia, J. The Use of Carbohydrate Profiles and Chemometrics in the Characterization of Natural Honeys of Identical Geographical Origin. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3095–3100 (2005).
- 35.Elfllein, L. & Ræzke, K.-P. 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 ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie* **39**, 574–587 (2008).
- 36.Kuan Wei, S., Wahab, R., Syed Yaacob, S. & Ghoshal, S. K. Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *Food Res. Int.* **80**, 16–32 (2019).
- 37.Wang, J. & Li, Q. X. Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Adv. Food Nutr. Res.* **62**, 89–137 (2011).

38. Del Campo, G., Zuriarrain, J., Zuriarrain, A. & Berregi, I. Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by ^1H NMR. *Food Chem.* **196**, 1031–1039 (2016).
39. Tezcan, F., Kolayli, S., Ulusoy, H. S.-E. & Erim, F. B. Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys. *J. Food Nutr. Res.* **50**, 33–40 (2011).
40. Brugnerotto, P., Della Betta, F., Gonzaga, L. V., Fett, R. & Oliveira Costa, A. C. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey. *J. Food Compos. Anal.* **82**, 103243 (2019).
41. Daniele, G., Maitre, D. & Casabianca, H. Identification, quantification and carbon stable isotopes determinations of organic acids in monofloral honeys. A powerful tool for botanical and authenticity control. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **26**, 1993–1998 (2012).
42. Nozal, M., Bernal, J., Gomez, L., Higes, M. & Meana, A. Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie* **34**, 181–188 (2003).
43. Matysiak, I., Balcerzak, M. & Michalski, R. Ion chromatography with conductometric detection for quantitation of formic acid in Polish bee honey. *J. Food Compos. Anal.* **73**, 55–59 (2018).
44. Tischer Seraglio, S. K., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L. V., Fett, R. & Oliveira Costa, A. C. Aliphatic organic acids as promising authenticity markers of bracatinga honeydew honey. *Food Chem.* **343**, 128449 (2021).
45. Sun, L., Shi, F., He, X., Cai, Y., Yu, Y., Yao, D., Zhou, J. & Wei, X. Establishment and application of quantitative method for 22 organic acids in honey based on SPE-GC-MS. *Eur. Food Res. Technol.* **249**, 473–484 (2023).
46. Suárez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. & Sancho, M. T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **955**, 207–214 (2002).
47. Suto, M., Kawashima, H. & Nakamura, Y. Determination of Organic Acids in Honey by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods.* **13**, (2020).
48. Valverde, S., Ares, A. M., Stephen Elmore, J. & Bernal, J. Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chem.* **387**, 132920 (2022).
49. 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.* **100**, 862–870 (2017).
50. Tsagkaris, A. S., Koulis, G. A., Danezis, G. P., Martakos, I., Dasenaki, M., Georgiou, C. A. & Thomaidis, N. S. Honey authenticity: analytical techniques, state of the art and challenges. *RSC Advances.* **11**, 11273–11294 (2021).
51. Naczek, M. & Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.* **1054**, 95–111 (2004).
52. Giada, M. de L. R. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (IntechOpen, 2013).
53. Gašić, U., Kečkeš, S., Dabić, D., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M. & Tešić, Ž. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chem.* **145**, 599–607 (2014).
54. Sun, Z., Zhao, L., Cheng, N., Xue, X., Wu, L., Zheng, J. & Cao, W. Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods. *J. Pharm. Anal.* **7**, 317–323 (2017).
55. Bogdanov, S., Ruoff, K. & Persano Oddo, L. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* **35**, S4–S17 (2004).

56. Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V. & Georgiou, C. A. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends Anal. Chem.* **85**, 123–132 (2016).
57. Kartheek, M., Smith, A. A., Muthu, A. K. & Manavalan, R. Determination of Adulterants in Food: A Review. (2011). *J. Chem. Pharm. Res.* **3**, 629–636 (2011).
58. Fuentes Molina, O., Alizadeh, K., Bucarey, S. A., Castaneza Zúñiga, E. & Vásquez-Quitral, P. Analysis of organic molecules, physicochemical parameters, and pollen as indicators for authenticity, botanical origin, type and quality of honey samples examined. *Int. J. Food Prop.* **23**, 2242–2256 (2020).
59. Wu, L., Du, B., Vander Heyden, Y., Chen, L., Zhao, L., Wang, M. & Xue, X. Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challenge. *Trends Anal. Chem.* **86**, 25–38 (2017).
60. Sun, Y., Liang, J., Zhang, Z., Sun, D., Li, H. & Chen, L. Extraction, physicochemical properties, bioactivities and application of natural sweeteners: A review. *Food Chem.* **457**, 140103 (2024).
61. Manoochehri, H., Fayazi Hosseini, N., Saidijam, M., Taheri, M., Rezaee, H. & Nouri, F. A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **25**, 101599 (2020).
62. Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V. & Yadavilli, K. S. Invertase and its applications – A brief review. *J. Pharm. Res.* **7**, 792–797 (2013).
63. Moura, A. V., Silva, J. D. S. da & Gubert, P. Ion Chromatography: Principles and instrumentation. *Orbital: Electron. J. Chem.* 110–115 (2022).
64. Schnepf, A., Kolb, M., Seubert, A. & Läubli, M. *Practical Ion Chromatography An Introduction*. (Metrohm Monograph, Herisau, Switzerland, 2020).
65. Corradini, C., Cavazza, A. & Bignardi, C. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2012**, 487564 (2012).
66. Cataldi, T. R. I., Campa, C. & De Benedetto, G. E. Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **368**, 739–758 (2000).
67. Rantakokko, P., Mustonen, S. & Vartiainen, T. Suppressor current switching: a simple and effective means to reduce background noise in ion chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1020**, 265–272 (2003).
68. Bose, R., Saari-Nordhaus, R., Sonaike, A. & Sethi, D. S. New suppressor technology improves the ion chromatographic determination of inorganic anions and disinfection by-products in drinking water. *J. Chromatogr. A.* **1039**, 45–49 (2004).
69. Saari-Nordhaus, R. & Anderson, J. M. Recent advances in ion chromatography suppressor improve anion separation and detection. *J. Chromatogr. A.* **956**, 15–22 (2002).
70. Morales, V., Corzo, N. & Sanz, M. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chem.* **107**, 922–928 (2008).
71. Wang, S., Guo, Q., Wang, L., Lin, L., Shi, H., Cao, H. & Cao, B. Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* **172**, 669–674 (2015).
72. Adgaba, N., Al-Ghamdi, A. A., Getachew, A., Tadesse, Y., Belay, A., Ansari, M. J., Radloff, S. E. & Sharma, D. Characterization of honeys by their botanical and geographical origins based on physico-chemical properties and chemo-metrics analysis. *Food Measure* **11**, 1106–1117 (2017).
73. Gün, R. & Karaoğlu, M. M. Detection of honey adulteration by characterization of the physico-chemical properties of honey adulterated with the addition of glucose–fructose and maltose corn syrups. *Eur. Food Res. Technol.* **250**, 2255–2272 (2024).
74. Xue, X., Wang, Q., Li, Y., Wu, L., Chen, L., Zhao, J. & Liu, F. 2-Acetylfuran-3-Glucopyranoside as a Novel Marker for the Detection of Honey Adulterated with Rice Syrup. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 7488–7493 (2013).

- 75.Reiffová, K. Analysis of Food Bioactive Oligosaccharides by Thin-Layer Chromatography. in *Food Oligosaccharides* (eds Moreno, F. J. & Sanz, M. L.) 350–369 (Wiley, 2014).
- 76.Milojković-Opsenica, D. M., Trifković, J. Đ., Ristivojević, P. M. & Andrić, F. Lj. Thin-layer chromatography in the authenticity testing of bee-products. *J. Chromatogr. B.* **1188**, 123068 (2022).
- 77.Puscas, A., Hosu, A. & Cimpoiu, C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *J. Chromatogr. A.* **1272**, 132–135 (2013).
- 78.Islam, M. K., Sostaric, T., Lim, L. Y., Hammer, K. & Locher, C. Sugar Profiling of Honeys for Authentication and Detection of Adulterants Using High-Performance Thin Layer Chromatography. *Molecules* **25**, 5289 (2020).
- 79.Opsenica, D. M., Lušić, D. & Tešić, Ž. Modern analytical techniques in the assessment of the authenticity of Serbian honey / Moderne analitičke tehnike u procjeni izvornosti meda iz Srbije. *AIHT* **66**, 233–241 (2015).
- 80.Muccio, Z. & Jackson, G. P. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst* **134**, 213–222 (2009).
- 81.Camin, F., Bontempo, L., Perini, M. & Piasentier, E. Stable Isotope Ratio Analysis for Assessing the Authenticity of Food of Animal Origin. *Comp Rev Food Sci Food Safe.* **15**, 868–877 (2016).
- 82.Förstel, H. The natural fingerprint of stable isotopes—use of IRMS to test food authenticity. *Anal Bioanal. Chem.* **388**, 541–544 (2007).
- 83.Cabañero, A. I., Recio, J. L. & Rupérez, M. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9719–9727 (2006).
- 84.Dong, H., Xiao, K. & Xian, Y. Isotope Ratio Mass Spectrometry Coupled to Element Analyzer and Liquid Chromatography to Identify Commercial Honeys of Various Botanical Types. *Food Anal. Methods.* **10**, (2017).
- 85.Dong, H., Xiao, K., Luo, D., Xian, Y., Luo, H., Guo, X., Li, C. & Zhao, M. Adulteration Identification of Commercial Honey with the C-4 Sugar Content of Negative Values by an Elemental Analyzer and Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 3258–3265 (2016).
- 86.Xu, J., Liu, X., Wu, B. & Cao, Y. A comprehensive analysis of ^{13}C isotope ratios data of authentic honey types produced in China using the EA-IRMS and LC-IRMS. *J. Food Sci. Technol.* **57**, 1216–1232 (2020).
- 87.Tosun, M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chem.* **138**, 1629–1632 (2013).
- 88.Simsek, A., Bilsel, M. & Goren, A. C. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chem.* **130**, 1115–1121 (2012).
- 89.Pang, G.-F., Fan, C.-L., Cao, Y.-Z., Zhang, J.-J., Li, X.-M., Li, Z.-Y. & Jia, G.-Q. Study on distribution pattern of stable carbon isotope ratio of Chinese honeys by isotope ratio mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 315–319 (2006).
- 90.Guler, A., Kocaokutgen, H., Garipoglu, A. V., Onder, H., Ekinci, D. & Biyik, S. Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C_3 and C_4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. *Food Chem.* **155**, 155–160 (2014).
- 91.Zhou, X., Taylor, M. P., Salouros, H. & Prasad, S. Authenticity and geographic origin of global honeys determined using carbon isotope ratios and trace elements. *Sci. Rep.* **8**, 14639 (2018).

92. Kawashima, H., Suto, M. & Suto, N. Determination of carbon isotope ratios for honey samples by means of a liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry system coupled with a post-column pump. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **32**, 1271–1279 (2018).
93. El Hawari, K., Al Iskandarani, M., Jaber, F., Ezzeddine, R., Ziller, L., Perini, M., Bontempo, L., Pellegrini, M. & Camin, F. Evaluation of honey authenticity in Lebanon by analysis of carbon stable isotope ratio using elemental analyzer and liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **56**, e4730 (2021).
94. Kawashima, H., Suto, M. & Suto, N. Stable carbon isotope ratios for organic acids in commercial honey samples. *Food Chem.* **289**, 49–55 (2019).
95. Dinca, O. R., Roxana, I., Popescu, R., Diana, C. & Radu, G. Geographical and Botanical Origin Discrimination of Romanian Honey Using Complex Stable Isotope Data and Chemometrics. *Food Anal. Methods* **8**, (2014).
96. Aliferis, K. A., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C. & Alissandrakis, E. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chem.* **121**, 856–862 (2010).
97. Sanz, M. L., Sanz, J. & Martínez-Castro, I. Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *J. Chromatogr. A* **1059**, 143–148 (2004).
98. Ruiz-Matute, A. I., Brokl, M., Soria, A. C., Sanz, M. L. & Martínez-Castro, I. Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chem.* **120**, 637–642 (2010).
99. Cheng, X., Wei, Y., Zhang, Y., Zhang, Y. & Wang, Y. Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode. *Food Chem.* **106**, 830–835 (2008).
100. Donarski, J. A., Jones, S. A., Harrison, M., Driffield, M. & Charlton, A. J. Identification of botanical biomarkers found in Corsican honey. *Food Chem.* **118**, 987–994 (2010).
101. Lolli, M., Bertelli, D., Plessi, M., Sabatini, A. G. & Restani, C. Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1298–1304 (2008).
102. Fan, K. & Zhang, M. Recent developments in the food quality detected by non-invasive nuclear magnetic resonance technology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 2202–2213 (2019).
103. Boffo, E. F., Tavares, L. A., Tobias, A. C. T., Ferreira, M. M. C. & Ferreira, A. G. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT-Food Sci. Technol.* **49**, 55–63 (2012).
104. Bertelli, D., Lolli, M., Papotti, G., Bortolotti, L., Serra, G. & Plessi, M. Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8495–8501 (2010).
105. Schievano, E., Morelato, E., Facchin, C. & Mammi, S. Characterization of Markers of Botanical Origin and Other Compounds Extracted from Unifloral Honeys. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 1747–1755 (2013).
106. Schievano, E., Peggion, E. & Mammi, S. ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Chloroform Extracts of Honey for Chemometric Determination of Its Botanical Origin. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 57–65 (2010).
107. Consonni, R., Cagliani, L. R. & Cogliati, C. NMR Characterization of Saccharides in Italian Honeys of Different Floral Sources. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 4526–4534 (2012).
108. Milla, L., Sniderman, K., Lines, R., Mousavi-Derazmahalleh, M. & Encinas-Viso, F. Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecol. Evol.* **11**, 8683–8698 (2021).

109. Utzeri, V. J., Ribani, A. & Fontanesi, L. Authentication of honey based on a DNA method to differentiate *Apis mellifera* subspecies: Application to Sicilian honey bee (*A. m. siciliana*) and Iberian honey bee (*A. m. iberiensis*) honeys. *Food Control*. **91**, 294–301 (2018).
110. Chiara, B., Benedetti, M., Borrello, S., Di Cagno, R., De Angelis, M. & Gobbetti, M. Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding. *Food Control*. **128**, 108175 (2021).
111. Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., Baillie, L. & Adams-Groom, B. Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLoS ONE*. **10**, e0134735 (2015).
112. Prosser, S. W. J. & Hebert, P. D. N. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chem*. **214**, 183–191 (2017).
113. Soares, S., Rodrigues, F. & Delerue-Matos, C. Towards DNA-Based Methods Analysis for Honey: An Update. *Molecules* **28**, 2106 (2023).
114. Wirta, H., Abrego, N., Miller, K., Roslin, T. & Vesterinen, E. DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Sci. Rep.* **11**, 4798 (2021).
115. Araujo, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B*. **877**, 2224–2234 (2009).
116. Đukić, M., Vasiljević, S., Sovrlić, Z. & Adamović, D. Verification and validation of analytical methods in accordance with the ISO/IEC 17025 standard. *Bakar* **48**, 25–34 (2023).
117. Huber, L. Validation of Analytical Methods and Processes. in *Pharmaceutical Process Validation* (CRC Press, Boca Raton, 2003).
118. Konieczka, P. & Namie, J. *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory*. (CRC Press, 2009).
119. Taverniers, I., De Loose, M. & Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* **23**, 535–552 (2004).
120. Gustavo González, A. & Ángeles Herrador, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal. Chem.* **26**, 227–238 (2007).
121. Shrivastava, A. & Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* **2**, 21 (2011).
122. Horwitz, W. & Albert, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Int.* **89**, 1095–1109 (2006).
123. Miller, J. & Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. (Pearson Education Canada, Harlow, England ; New York, 2005).
124. Andrić, F. & Trifković, J. *Osnove Obrade Podataka u Hemiji*. (Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, 2023).
125. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. (John Wiley & Sons, 2003).
126. Ringnér, M. What is principal component analysis? *Nat. Biotechnol.* **26**, 303–304 (2008).
127. Giuliani, A. The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. *Drug Discov. Today*. **22**, 1069–1076 (2017).
128. Varmuza, K. & Filzmoser, P. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*. (CRC Press, Boca Raton, 2009).
129. Krstić, Đ. Metabolomička procena autentičnosti semena samoniklog i gajenog voća. Univerzitet u Beogradu - Hemijski Fakultet, Doktorska Disertacija. (2023).
130. Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K. & Narasimhan, G. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*. **21**, 2 (2020).

131. Lee, L. C., Liong, C.-Y. & Jemain, A. A. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst* **143**, 3526–3539 (2018).
132. Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F. & Milojković-Opsenica, D. Recent trends in image evaluation of HPTLC chromatograms. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **43**, 291–299 (2020).
133. Lutier, P. M. & Vaissière, B. E. An improved method for pollen analysis of honey. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **78**, 129–144 (1993).
134. Díez, M. J., Andrés, C. & Terrab, A. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *Int. J. of Food Sci. Tech.* **39**, 167–176 (2004).
135. Bogdanov, S. Harmonised methods of the International Honey Commission. *International Honey Commission (IHC)* 1–62 (2009).
136. 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.* **305**, 125457 (2020).
137. Vasić, V. Korelacija fizičko-hemijskih parametara i fitohemijskog profila medljikovaca sa njihovim biljnim poreklom. Univerzitet u Beogradu - Hemijski Fakultet, Doktorska Disertacija. (2019).
138. Konieczka, P. The Role of and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **37**, 173–190 (2007).
139. Hembeck, H.-W. GLP and other Quality Assurance Systems – A Comparison. *Accred. Qual. Assur.* **7**, 266–268 (2002).
140. Valcárcel, M. & Ríos, A. Analytical chemistry and quality. *Trends Anal. Chem.* **13**, 17–23 (1994).
141. Valcárcel, M., Gómez-Hens, A. & Rubio, S. Selectivity in analytical chemistry revisited. *Trends Anal. Chem.* **20**, 386–393 (2001).
142. Lazarević, K. Fizičko-hemijska karakterizacija i klasifikacija meda sa teritorije Republike Srbije prema botaničkom i regionalnom poreklu primenom multivarijantne hemometrijske analize. Univerzitet u Beogradu - Hemijski Fakultet, Doktorska Disertacija. (2016).
143. AOAC International. *AOAC Official Method 998.12: C-4 Plant Sugars in Honey—Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method*. In AOAC Official Methods of Analysis (1998).
144. Dobre, I., Alexe, Petru, Escuredo, Olga & and Seijo, C. M. Palynological evaluation of selected honeys from Romania. *Grana* **52**, 113–121 (2013).
145. Kostić, A. Ž., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. Lj., Šikoparija, B., Radišić, P., Prentović, M. & Pešić, M. B. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT-Food Sci. Technol.* **62**, 301–309 (2015).
146. Uršulin-Trstenjak, N., Levanić, D., Grabar, I., Koldenjak, M. & Bosnir, J. Physico-Chemical Profiles of Croatian Honey with an Overview of Its Consumption among Healthcare Students. *J. Appl. Health Sci.* **3**, 51–59 (2017).
147. Uršulin-Trstenjak, N., Puntarić, D., Levanić, D., Gvozdić, V., Pavlek, Ž., Puntarić, A., Puntarić, E., Puntarić, I., Vidosavljević, D., Lasić, D. & Vidosavljević, M. Pollen, Physicochemical, and Mineral Analysis of Croatian Acacia Honey Samples: Applicability for Identification of Botanical and Geographical Origin. *J. Food Qual.* **2017**, 8538693 (2017).
148. Matkovits, A., Nagy, K., Fodor, M. & Jókai, Z. Analysis of polyphenolic components of Hungarian acacia (*Robinia pseudoacacia*) honey; method development, statistical evaluation. *J. Food Compos. Anal.* **120**, 105336 (2023).
149. Mohamed, A. S., Abdah, M. A., Ramasamy, K., Hasan, M. H., Aida Hamimi, I. & Zolkapli, E. Physicochemical analysis and sugar profiling of Acacia honey. *Malays. J. Microsc.* **14**, 157–164 (2018).

150. Terrab, A., Berjano, R., Sanchez, J., Gomez Pajuelo, A. & Díez, M. Palynological and geographical characterisation of Spanish oak honeydew honeys. *Grana* **58**, 1–15 (2018).
151. Oddo, L. P. *et al.* Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* **35**, S38–S81 (2004).
152. Čeksteryte, V. Pollen diversity in honey collected from Lithuania's protected landscape areas. *Proc. Est. Acad. Sci.*, **62**, 277–282 (2013).
153. Kostić, A. Ž., Milinčić, D. D., Gašić, U. M., Nedić, N., Stanojević, S. P., Tešić, Ž. Lj. & Pešić, M. B. Polyphenolic profile and antioxidant properties of bee-collected pollen from sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant. *LWT-Food Sci. Technol.* **112**, 108244 (2019).
154. Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H., Waś, E., Kachaniuk, K. & Teper, D. Characteristics of Polish unifloral honeys. I. Rape honey (*Brassica napus* L. Var. *oleifera* Metzger). *J. Apic. Sci.* **55**, 111–119 (2011).
155. Rajs, B. B., Flanjak, I., Mutić, J., Vukojević, V., Đurđić, S. & Primorac, L. Characterization of Croatian Rape (*Brassica* sp.) Honey by Pollen Spectrum, Physicochemical Characteristics, and Multielement analysis by ICP-OES. *J. AOAC Int.* **100**, 881–888 (2017).
156. Escuredo, O., Fernández-González, M. & Seijo, M. C. Differentiation of Blossom Honey and Honeydew Honey from Northwest Spain. *Agriculture* **2**, 25–37 (2012).
157. Seijo, M. C., Escuredo, O. & Rodríguez-Flores, M. S. Physicochemical Properties and Pollen Profile of Oak Honeydew and Evergreen Oak Honeydew Honeys from Spain: A Comparative Study. *Foods* **8**, 126 (2019).
158. The Council of the European Union, Council Directive 2001/110/EC relating to honey (2001).
159. Đogo Mračević, S., Krstić, M., Lolić, A. & Ražić, S. Comparative study of the chemical composition and biological potential of honey from different regions of Serbia. *Microchem. J.* **152**, 104420 (2020).
160. Živkov Baloš, M., Popov, N., Jakšić, S., Mihaljev, Ž., Pelić, M., Ratajac, R. & Ljubojević Pelić, D. Sunflower Honey—Evaluation of Quality and Stability during Storage. *Foods* **12**, 2585 (2023).
161. Tucak, Z., Periškić, M., Škrivanko, M. & Konjarević, A. The influence of the botanic origin of honey plants on the quality of honey. *Agric. Sci. Prof. Rev.* **13**, (2007).
162. Pauliuc, D. & Oroian, M. Organic Acids And Physico-chemical Parameters Of Romanian Sunflower Honey. *Food Environ. Saf.* **19**, (2020).
163. Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L. & Bogdanov, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem.* **112**, 863–867 (2009).
164. Primorac, L., Angelkov, B., Mandić, M. L., Kenjerić, D., Nedeljko, M., Flanjak, I., Perl Pirički, A. & Arapceska, M. Comparison Of The Croatian And Macedonian Honeydew Honey. *J. Cent. Eur. Agric.* **10**, (2009).
165. Rodopoulou, M.-A., Tananaki, C., Kanelis, D., Liolios, V., Dimou, M. & Thrasyvoulou, A. A chemometric approach for the differentiation of 15 monofloral honeys based on physicochemical parameters. *J. Sci. Food Agric.* **102**, 139–146 (2022).
166. Czipa, N., Phillips, C. J. C. & Kovács, B. Composition of acacia honeys following processing, storage and adulteration. *J. Food Sci. Technol.* **56**, 1245–1255 (2019).
167. Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delègue, M. H. & Doré, J. C. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chem.* **86**, 305–312 (2004).
168. Pascual-Maté, A., Osés, S. M., Marcazzan, G. L., Gardini, S., Fernández Muiño, M. A. & Sancho, M. T. Sugar composition and sugar-related parameters of honeys from the northern Iberian Plateau. *J. Food Compos. Anal.* **74**, 34–43 (2018).

- 169.Kropf, U., Korošec, M., Bertoneclj, J., Ogrinc, N., Nečemer, M., Kump, P. & Golob, T. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. *Food Chem.* **121**, 839–846 (2010).
- 170.Bilić Rajs, B. Primjena stabilnih izotopa i mineralnih tvari u određivanju botaničkog i zemljopisnog podrijetla izabranih vrsta hrvatskoga meda. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - Doktorska Disertacija. (2019).
- 171.Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H. & Ré, E. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chem.* **106**, 883–887 (2008).
- 172.Kádár, M., Juan, M., Hellebrandova, M., Domenech, E. & Escriche, I. Differentiation of Acacia, Sunflower and Tilia Honeys from Different Countries Based on Sugar Composition, Physicochemical and Color Parameters. *Bulletin USAMV Agric.* **67**, 1843–5386 (2010).
- 173.Chou, W.-M., Liao, H.-C., Yang, Y.-C. & Peng, C.-C. Evaluation of Honey Quality with Stored Time and Temperatures. *JFNR* **8**, 591–599 (2020).
- 174.Al-Ghamdi, A., Mohammed, S. E. A., Ansari, M. J. & Adgaba, N. Comparison of physicochemical properties and effects of heating regimes on stored *Apis mellifera* and *Apis florea* honey. *Saudi J. Biol. Sci.* **26**, 845–848 (2019).
- 175.Mouhoubi-Tafnine, Z., Ouchemoukh, S., Bey, M., Louaileche, H. & Tamendjari, A. Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. *Int. Food Res. J.* **25**, 1044–1050 (2018).
- 176.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.* **240**, 717–724 (2018).
- 177.Chen, C.-T., Chen, B.-Y., Nai, Y.-S., Chang, Y.-M., Chen, K.-H. & Chen, Y.-W. Novel inspection of sugar residue and origin in honey based on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio and protein content. *J. Food Drug Anal.* **27**, 175–183 (2019).
- 178.Rao, T. N. 7. Validation of Analytical Methods. in *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches* (IntechOpen, 2018).
- 179.International Council for Harmonisation (ICH). ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures. European Medicines Agency, Amsterdam (2024).
- 180.Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C. & Yavuz, O. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chem.* **105**, 1119–1125 (2007).
- 181.Cotte, J. F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J. & Grenier-Loustalot, M. F. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 698–705 (2004).
- 182.Amariei, S., Norocel, L. & Scripcă, L. A. An innovative method for preventing honey crystallization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **66**, 102481 (2020).
- 183.Sugars: Structure and Classification. in *Enological Chemistry* (eds Moreno, J. & Peinado, R.) 77–93 (Academic Press, San Diego, 2012).
- 184.Kaškonienė, V., Venskutonis, P. R. & Čeksterytė, V. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT-Food Sci. Technol.* **43**, 801–807 (2010).
- 185.Persano Oddo, L., Piazza, M. G., Sabatini, A. G. & Accorti, M. Characterization of unifloral honeys. *Apidologie* **26**, 453–465 (1995).
- 186.Megherbi, M., Herbreteau, B., Faure, R. & Salvador, A. Polysaccharides as a Marker for Detection of Corn Sugar Syrup Addition in Honey. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2105–2111 (2009).

7. PRILOG

Prilog 1. Fizičko–hemijski parametri ispitivanih uzoraka meda

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
<i>Robinia pseudoacacia</i>											
B1	15,4 ± 0,6	0,185 ± 0,003	9,5 ± 0,4	20,4 ± 5,3	3,9 ± 0,3	26,5 ± 2,8	42,1 ± 4,3	0,50 ± 0,02	68,5 ± 5,3	1,59 ± 0,14	1,72
B2	17,0 ± 0,6	0,159 ± 0,003	8,9 ± 0,4	24,0 ± 6,2	1,4 ± 0,1	27,4 ± 2,9	42,7 ± 4,3	0,48 ± 0,02	70,1 ± 5,4	1,56 ± 0,14	1,61
B3	19,6 ± 0,7	0,132 ± 0,002	9,1 ± 0,4	16,4 ± 4,3	4,6 ± 0,3	26,5 ± 2,8	41,4 ± 4,2	0,32 ± 0,01	67,9 ± 5,2	1,56 ± 0,14	1,35
B4	16,6 ± 0,6	0,146 ± 0,002	8,1 ± 0,3	16,8 ± 4,4	1,7 ± 0,1	27,9 ± 3,0	42,8 ± 4,4	0,50 ± 0,02	70,7 ± 5,4	1,54 ± 0,14	1,68
B5	15,7 ± 0,6	0,149 ± 0,002	7,7 ± 0,3	16,3 ± 4,2	2,9 ± 0,2	27,1 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,54 ± 0,02	69,6 ± 5,4	1,57 ± 0,14	1,73
B6	16,6 ± 0,6	0,168 ± 0,003	8,0 ± 0,3	12,9 ± 3,3	4,2 ± 0,3	26,4 ± 2,8	41,7 ± 4,2	0,48 ± 0,02	68,1 ± 5,2	1,58 ± 0,14	1,59
B7	16,4 ± 0,6	0,156 ± 0,002	7,8 ± 0,3	19,4 ± 5,0	3,6 ± 0,3	26,4 ± 2,8	42,1 ± 4,3	0,48 ± 0,02	68,5 ± 5,3	1,59 ± 0,14	1,61
B8	16,1 ± 0,6	0,128 ± 0,002	7,8 ± 0,3	16,3 ± 4,2	4,5 ± 0,3	26,2 ± 2,8	41,3 ± 4,2	0,49 ± 0,02	67,5 ± 5,2	1,58 ± 0,14	1,63
B9	16,3 ± 0,6	0,124 ± 0,002	7,1 ± 0,3	17,0 ± 4,4	4,4 ± 0,3	27,5 ± 2,9	42,7 ± 4,3	0,49 ± 0,02	70,2 ± 5,4	1,55 ± 0,14	1,69
B10	16,7 ± 0,6	0,141 ± 0,002	7,6 ± 0,3	11,6 ± 3,0	4,0 ± 0,3	25,2 ± 2,7	41,1 ± 4,2	0,46 ± 0,02	66,3 ± 5,1	1,63 ± 0,15	1,51
B11	15,6 ± 0,6	0,169 ± 0,003	10,7 ± 0,4	21,1 ± 5,5	4,9 ± 0,3	26,6 ± 2,8	42,1 ± 4,3	0,44 ± 0,02	68,7 ± 5,3	1,58 ± 0,14	1,70
B12	16,0 ± 0,6	0,148 ± 0,003	7,6 ± 0,3	16,8 ± 4,4	0,7 ± 0,1	26,5 ± 2,8	41,3 ± 4,2	0,49 ± 0,02	67,8 ± 5,2	1,56 ± 0,14	1,65
B13	16,2 ± 0,6	0,137 ± 0,002	7,5 ± 0,3	18,9 ± 4,9	1,2 ± 0,1	26,3 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,54 ± 0,02	67,9 ± 5,3	1,58 ± 0,14	1,62
B14	16,2 ± 0,6	0,184 ± 0,003	10,1 ± 0,4	22,5 ± 5,8	1,5 ± 0,1	26,4 ± 2,8	42,7 ± 4,3	0,47 ± 0,02	69,1 ± 5,3	1,62 ± 0,14	1,62
B15	15,4 ± 0,6	0,153 ± 0,002	7,3 ± 0,3	14,7 ± 3,8	1,1 ± 0,1	26,2 ± 2,8	41,9 ± 4,3	0,55 ± 0,03	68,1 ± 5,2	1,60 ± 0,14	1,70
B16	15,9 ± 0,6	0,131 ± 0,002	7,1 ± 0,3	17,2 ± 4,5	2,4 ± 0,2	27,6 ± 2,9	42,4 ± 4,3	0,52 ± 0,02	70,0 ± 5,4	1,54 ± 0,14	1,74
B17	14,8 ± 0,5	0,157 ± 0,002	7,4 ± 0,3	14,9 ± 3,9	4,1 ± 0,3	26,4 ± 2,8	42,7 ± 4,3	0,59 ± 0,03	69,1 ± 5,3	1,62 ± 0,14	1,78
B18	15,4 ± 0,6	0,128 ± 0,002	7,3 ± 0,3	12,9 ± 3,3	2,0 ± 0,2	27,9 ± 3,0	43,0 ± 4,4	0,46 ± 0,02	70,9 ± 5,5	1,54 ± 0,14	1,81
B19	15,9 ± 0,6	0,195 ± 0,003	10,0 ± 0,4	21,2 ± 5,5	4,4 ± 0,3	26,8 ± 2,9	42,1 ± 4,3	0,45 ± 0,02	68,9 ± 5,3	1,57 ± 0,14	1,69
B20	16,4 ± 0,6	0,192 ± 0,003	9,7 ± 0,4	24,7 ± 6,4	2,1 ± 0,2	26,2 ± 2,8	41,3 ± 4,2	0,46 ± 0,02	67,5 ± 5,2	1,57 ± 0,14	1,59
B21	15,3 ± 0,6	0,151 ± 0,002	8,2 ± 0,3	20,2 ± 5,2	0,6 ± 0,1	26,7 ± 2,9	41,7 ± 4,2	0,48 ± 0,02	68,4 ± 5,3	1,56 ± 0,14	1,75
B22	14,9 ± 0,5	0,196 ± 0,003	10,2 ± 0,4	22,5 ± 5,8	1,5 ± 0,1	26,5 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,49 ± 0,02	68,1 ± 5,2	1,57 ± 0,14	1,78

Prilog 1. Nastavak

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
B23	16,6 ± 0,6	0,193 ± 0,003	8,4 ± 0,3	11,5 ± 3,0	1,3 ± 0,1	26,2 ± 2,8	42,2 ± 4,3	0,48 ± 0,02	68,4 ± 5,3	1,61 ± 0,14	1,58
B24	16,3 ± 0,6	0,194 ± 0,003	7,9 ± 0,3	18,8 ± 4,9	0,3 ± 0,1	25,8 ± 2,8	41,7 ± 4,2	0,48 ± 0,02	67,5 ± 5,2	1,62 ± 0,14	1,58
B25	16,3 ± 0,6	0,138 ± 0,002	8,2 ± 0,3	17,2 ± 4,5	3,1 ± 0,2	26,5 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,41 ± 0,02	68,1 ± 5,2	1,57 ± 0,14	1,63
B26	16,1 ± 0,6	0,136 ± 0,002	7,7 ± 0,3	16,1 ± 4,2	4,7 ± 0,3	27,4 ± 2,9	42,6 ± 4,3	0,45 ± 0,02	70,0 ± 5,4	1,55 ± 0,14	1,70
B27	16,2 ± 0,6	0,157 ± 0,002	8,8 ± 0,4	17,6 ± 4,6	3,2 ± 0,2	26,6 ± 2,8	42,4 ± 4,3	0,43 ± 0,02	69,1 ± 5,3	1,59 ± 0,14	1,64
B28	15,9 ± 0,6	0,134 ± 0,002	7,8 ± 0,3	10,8 ± 2,8	4,6 ± 0,3	27,7 ± 3,0	42,8 ± 4,4	0,48 ± 0,02	70,5 ± 5,4	1,55 ± 0,14	1,74
B29	16,4 ± 0,6	0,114 ± 0,002	6,9 ± 0,3	12,5 ± 3,2	1,0 ± 0,1	26,8 ± 2,9	42,3 ± 4,3	0,46 ± 0,02	69,1 ± 5,3	1,58 ± 0,14	1,64
B30	16,0 ± 0,6	0,111 ± 0,002	6,5 ± 0,3	11,9 ± 3,1	0,8 ± 0,1	25,8 ± 2,7	42,4 ± 4,3	0,48 ± 0,02	68,2 ± 5,2	1,65 ± 0,15	1,61
B31	15,9 ± 0,6	0,167 ± 0,003	8,2 ± 0,3	19,1 ± 5,0	3,3 ± 0,2	26,5 ± 2,8	42,7 ± 4,3	0,05 ± 0,02	69,3 ± 5,3	1,61 ± 0,14	1,67
B32	16,5 ± 0,6	0,149 ± 0,002	9,0 ± 0,4	16,3 ± 4,2	2,1 ± 0,2	26,8 ± 2,9	41,9 ± 4,3	0,43 ± 0,02	68,7 ± 5,3	1,56 ± 0,14	1,62
B33	17,6 ± 0,6	0,154 ± 0,002	9,4 ± 0,4	16,4 ± 4,3	2,5 ± 0,2	26,8 ± 2,9	42,6 ± 4,3	0,33 ± 0,02	69,4 ± 5,3	1,59 ± 0,14	1,52
B34	18,2 ± 0,6	0,145 ± 0,002	8,9 ± 0,4	12,9 ± 3,3	3,6 ± 0,3	26,8 ± 2,9	41,7 ± 4,2	0,27 ± 0,02	68,5 ± 5,3	1,56 ± 0,14	1,47
B35	16,0 ± 0,6	0,139 ± 0,002	8,1 ± 0,3	11,9 ± 3,1	3,4 ± 0,2	26,8 ± 2,9	42,0 ± 4,3	0,45 ± 0,02	68,8 ± 5,3	1,57 ± 0,14	1,68
B36	17,2 ± 0,6	0,146 ± 0,002	8,5 ± 0,4	15,6 ± 4,0	2,5 ± 0,2	26,6 ± 2,8	42,6 ± 4,3	0,35 ± 0,02	69,2 ± 5,3	1,60 ± 0,14	1,55
B37	17,1 ± 0,6	0,145 ± 0,002	8,4 ± 0,3	18,2 ± 4,7	4,9 ± 0,3	27,2 ± 2,9	42,9 ± 4,4	0,43 ± 0,02	70,1 ± 5,4	1,58 ± 0,14	1,59
B38	16,7 ± 0,6	0,195 ± 0,003	9,2 ± 0,4	18,6 ± 4,8	4,9 ± 0,3	25,9 ± 2,8	41,8 ± 4,2	0,44 ± 0,02	67,7 ± 5,2	1,61 ± 0,14	1,55
B39	15,7 ± 0,6	0,191 ± 0,003	9,2 ± 0,4	20,2 ± 5,2	3,9 ± 0,3	25,7 ± 2,7	41,7 ± 4,2	0,55 ± 0,03	67,4 ± 5,3	1,62 ± 0,14	1,64
B40	14,8 ± 0,5	0,128 ± 0,002	7,4 ± 0,3	16,9 ± 4,4	1,4 ± 0,1	26,3 ± 2,8	41,8 ± 4,2	0,40 ± 0,02	68,1 ± 5,2	1,59 ± 0,14	1,77
B41	15,2 ± 0,6	0,179 ± 0,003	7,9 ± 0,3	20,5 ± 5,3	3,8 ± 0,3	28,3 ± 3,0	43,2 ± 4,4	0,56 ± 0,03	71,5 ± 5,5	1,53 ± 0,14	1,86
B42	16,8 ± 0,6	0,186 ± 0,003	7,8 ± 0,3	11,2 ± 2,9	3,2 ± 0,2	26,7 ± 2,8	42,4 ± 4,3	0,44 ± 0,02	69,1 ± 5,3	1,59 ± 0,14	1,58
B43	16,3 ± 0,6	0,149 ± 0,002	7,4 ± 0,3	17,0 ± 4,4	0,6 ± 0,1	27,0 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,50 ± 0,02	69,5 ± 5,3	1,58 ± 0,14	1,66
B44	18,1 ± 0,6	0,156 ± 0,002	7,4 ± 0,3	17,1 ± 4,4	4,3 ± 0,3	27,3 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,43 ± 0,02	69,8 ± 5,4	1,60 ± 0,14	1,51
B45	16,7 ± 0,6	0,124 ± 0,002	7,4 ± 0,3	19,2 ± 5,0	3,0 ± 0,2	26,9 ± 2,9	41,9 ± 4,3	0,50 ± 0,02	68,8 ± 5,3	1,56 ± 0,14	1,61
B46	16,3 ± 0,6	0,129 ± 0,002	7,2 ± 0,3	19,1 ± 5,0	4,3 ± 0,3	27,5 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,50 ± 0,02	70,0 ± 5,4	1,60 ± 0,14	1,69
B47	17,0 ± 0,6	0,136 ± 0,002	7,7 ± 0,3	18,8 ± 4,9	1,7 ± 0,1	26,5 ± 2,8	41,8 ± 4,2	0,48 ± 0,02	68,3 ± 5,3	1,58 ± 0,14	1,56

Prilog 1. Nastavak

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
B48	17,0 ± 0,6	0,193 ± 0,003	10,8 ± 0,4	23,7 ± 6,1	3,8 ± 0,3	26,7 ± 2,8	42,8 ± 4,3	0,46 ± 0,02	69,5 ± 5,3	1,60 ± 0,14	1,57
B49	15,7 ± 0,6	0,185 ± 0,003	8,4 ± 0,3	24,9 ± 6,5	2,7 ± 0,2	26,4 ± 2,8	42,6 ± 4,3	0,55 ± 0,03	69,0 ± 5,3	1,61 ± 0,15	1,68
B50	16,0 ± 0,6	0,198 ± 0,003	9,4 ± 0,4	22,1 ± 5,7	1,0 ± 0,1	26,8 ± 2,9	42,0 ± 4,3	0,44 ± 0,02	68,8 ± 5,3	1,57 ± 0,14	1,67
B51	15,4 ± 0,6	0,159 ± 0,003	7,0 ± 0,3	18,9 ± 4,9	4,1 ± 0,3	26,8 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,53 ± 0,02	69,2 ± 5,3	1,59 ± 0,14	1,74
B52	15,7 ± 0,6	0,134 ± 0,002	7,5 ± 0,3	18,6 ± 4,8	2,4 ± 0,2	26,1 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,52 ± 0,02	67,8 ± 5,2	1,59 ± 0,14	1,66
B53	16,4 ± 0,6	0,147 ± 0,002	9,4 ± 0,4	17,5 ± 4,5	4,1 ± 0,3	26,8 ± 2,9	42,8 ± 4,3	0,41 ± 0,02	69,6 ± 5,4	1,59 ± 0,14	1,64
B54	16,6 ± 0,6	0,180 ± 0,003	9,1 ± 0,4	19,2 ± 5,0	4,8 ± 0,3	26,8 ± 2,9	42,4 ± 4,3	0,51 ± 0,02	69,2 ± 5,3	1,58 ± 0,14	1,62
B55	16,0 ± 0,6	0,130 ± 0,002	7,4 ± 0,3	16,4 ± 4,2	0,6 ± 0,1	26,4 ± 2,8	42,6 ± 4,3	0,50 ± 0,02	69,0 ± 5,3	1,61 ± 0,14	1,65
B56	15,5 ± 0,6	0,130 ± 0,002	6,6 ± 0,3	17,0 ± 4,4	0,7 ± 0,1	27,2 ± 2,9	42,9 ± 4,4	0,53 ± 0,02	70,1 ± 5,4	1,57 ± 0,14	1,75
B57	16,3 ± 0,6	0,168 ± 0,003	7,4 ± 0,3	15,6 ± 4,0	1,6 ± 0,1	26,8 ± 2,9	41,8 ± 4,2	0,54 ± 0,02	68,6 ± 5,3	1,56 ± 0,14	1,64
B58	15,8 ± 0,6	0,168 ± 0,003	7,8 ± 0,3	14,8 ± 3,8	2,2 ± 0,2	27,1 ± 2,9	42,8 ± 4,3	0,51 ± 0,02	69,9 ± 5,4	1,58 ± 0,14	1,71
B59	14,9 ± 0,5	0,151 ± 0,002	7,7 ± 0,3	16,3 ± 4,2	1,1 ± 0,1	27,5 ± 2,9	42,6 ± 4,3	0,52 ± 0,02	70,1 ± 5,4	1,55 ± 0,14	1,85
B60	16,3 ± 0,6	0,141 ± 0,002	8,1 ± 0,3	17,7 ± 4,6	4,4 ± 0,3	26,4 ± 2,8	40,9 ± 4,2	0,51 ± 0,02	67,3 ± 5,2	1,55 ± 0,14	1,72
B61	17,0 ± 0,6	0,157 ± 0,002	12,7 ± 0,5	19,3 ± 5,0	6,9 ± 0,5	29,1 ± 3,1	40,2 ± 4,1	0,46 ± 0,04	69,3 ± 5,3	1,38 ± 0,12	1,71
B62	16,8 ± 0,6	0,144 ± 0,001	9,5 ± 0,4	21,8 ± 5,7	3,0 ± 0,2	30,4 ± 3,2	40,1 ± 4,1	0,30 ± 0,02	70,5 ± 5,4	1,32 ± 0,12	1,81
B63	16,2 ± 0,6	0,178 ± 0,003	10,3 ± 0,4	17,3 ± 4,5	9,8 ± 0,6	27,9 ± 3,0	39,1 ± 4,0	0,08 ± 0,01	67,0 ± 5,2	1,40 ± 0,12	1,73
B64	16,2 ± 0,6	0,201 ± 0,002	14,5 ± 0,6	15,9 ± 4,1	7,2 ± 0,5	33,3 ± 3,6	34,3 ± 3,5	0,41 ± 0,03	67,6 ± 5,2	1,03 ± 0,09	2,05
B65	16,0 ± 0,6	0,162 ± 0,001	9,7 ± 0,4	12,9 ± 3,3	7,2 ± 0,5	32,0 ± 3,4	38,3 ± 3,9	0,53 ± 0,04	70,3 ± 5,4	1,20 ± 0,11	2,00
B66	16,4 ± 0,6	0,137 ± 0,001	7,8 ± 0,3	13,6 ± 3,5	6,5 ± 0,4	30,5 ± 3,3	37,5 ± 3,8	0,35 ± 0,03	68,0 ± 5,2	1,23 ± 0,11	1,86
B67	15,8 ± 0,6	0,131 ± 0,001	8,0 ± 0,3	12,3 ± 3,2	3,4 ± 0,2	28,8 ± 3,1	38,1 ± 3,9	0,02 ± 0,01	66,9 ± 5,2	1,32 ± 0,12	1,82
B68	16,5 ± 0,6	0,156 ± 0,001	9,8 ± 0,4	16,1 ± 4,2	0,5 ± 0,1	31,5 ± 3,4	40,7 ± 4,1	0,42 ± 0,03	72,2 ± 5,6	1,29 ± 0,11	1,90
B69	16,4 ± 0,6	0,182 ± 0,001	13,7 ± 0,5	14,2 ± 3,7	1,3 ± 0,1	30,6 ± 3,3	38,2 ± 3,9	0,16 ± 0,01	68,8 ± 5,3	1,25 ± 0,11	1,86
B70	17,2 ± 0,6	0,134 ± 0,001	10,1 ± 0,4	16,2 ± 4,2	5,0 ± 0,3	35,7 ± 3,8	39,1 ± 4,0	0,25 ± 0,02	74,8 ± 5,8	1,10 ± 0,10	2,08
B71	16,7 ± 0,6	0,305 ± 0,002	19,2 ± 0,7	15,1 ± 3,9	3,3 ± 0,2	32,3 ± 3,4	40,2 ± 4,1	0,36 ± 0,03	72,5 ± 5,6	1,24 ± 0,11	1,94
B72	16,5 ± 0,6	0,204 ± 0,002	17,3 ± 0,7	20,3 ± 5,3	6,0 ± 0,4	29,4 ± 3,1	39,1 ± 4,0	0,39 ± 0,03	68,5 ± 5,3	1,33 ± 0,12	1,78

Prilog 1. Nastavak

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
B73	16,4 ± 0,6	0,226 ± 0,002	17,8 ± 0,7	20,8 ± 5,4	4,0 ± 0,3	34,8 ± 3,7	40,3 ± 4,1	0,27 ± 0,02	75,1 ± 5,8	1,16 ± 0,10	2,12
B74	15,4 ± 0,6	0,263 ± 0,002	27,1 ± 1,0	22,0 ± 5,7	6,0 ± 0,4	35,3 ± 3,8	37,4 ± 3,8	0,66 ± 0,05	72,7 ± 5,6	1,06 ± 0,09	2,29
<i>Tilia cordata</i>											
L1	15,5 ± 0,6	0,496 ± 0,004	13,6 ± 0,7	18,4 ± 4,8	4,5 ± 0,3	31,5 ± 3,4	37,2 ± 3,8	1,45 ± 0,11	68,7 ± 5,3	1,18 ± 0,11	2,03
L2	18,1 ± 0,6	0,679 ± 0,005	11,6 ± 0,6	14,6 ± 3,8	3,3 ± 0,2	29,9 ± 3,2	35,4 ± 3,6	1,06 ± 0,08	65,3 ± 5,0	1,18 ± 0,10	1,65
L3	17,2 ± 0,6	0,505 ± 0,004	20,5 ± 0,8	19,6 ± 5,1	3,3 ± 0,2	29,2 ± 3,1	38,5 ± 3,6	0,05 ± 0,01	67,7 ± 5,2	1,32 ± 0,12	1,69
L4	16,8 ± 0,6	0,622 ± 0,005	21,8 ± 0,8	15,8 ± 4,1	7,4 ± 0,5	34,3 ± 3,7	40,5 ± 4,1	0,05 ± 0,01	74,8 ± 5,8	1,18 ± 0,11	2,04
L5	16,8 ± 0,6	0,780 ± 0,006	7,9 ± 0,4	16,6 ± 4,3	0,8 ± 0,1	27,3 ± 2,9	37,6 ± 3,8	0,05 ± 0,01	64,9 ± 5,0	1,38 ± 0,12	1,63
L6	16,2 ± 0,6	0,341 ± 0,003	20,0 ± 0,8	17,3 ± 4,5	7,3 ± 0,5	35,6 ± 3,8	36,8 ± 3,7	0,05 ± 0,01	72,4 ± 5,6	1,03 ± 0,09	2,20
L7	16,6 ± 0,6	0,419 ± 0,003	19,8 ± 0,8	20,0 ± 5,2	1,7 ± 0,1	31,2 ± 3,3	36,4 ± 3,7	0,18 ± 0,01	67,5 ± 5,2	1,17 ± 0,10	1,88
L8	15,2 ± 0,6	0,554 ± 0,004	27,2 ± 1,0	15,4 ± 4,0	5,1 ± 0,3	30,6 ± 3,3	34,9 ± 3,5	0,15 ± 0,01	65,5 ± 5,0	1,14 ± 0,10	2,01
L9	15,8 ± 0,6	0,578 ± 0,005	17,9 ± 0,7	21,3 ± 5,5	6,2 ± 0,4	28,1 ± 3,0	36,8 ± 3,7	0,64 ± 0,05	64,9 ± 5,0	1,32 ± 0,12	1,78
L10	15,6 ± 0,6	0,496 ± 0,004	11,5 ± 0,5	17,5 ± 4,5	6,2 ± 0,4	33,1 ± 3,5	34,5 ± 3,5	0,61 ± 0,05	67,7 ± 5,2	1,04 ± 0,09	2,12
L11	19,0 ± 0,7	0,716 ± 0,006	50,2 ± 1,9	18,5 ± 4,8	4,9 ± 0,3	35,6 ± 3,8	39,7 ± 4,0	0,23 ± 0,02	75,3 ± 5,8	1,11 ± 0,10	1,87
L12	17,1 ± 0,6	0,615 ± 0,005	16,5 ± 0,8	17,9 ± 4,6	4,5 ± 0,3	32,1 ± 3,4	38,3 ± 3,9	0,42 ± 0,03	70,4 ± 5,4	1,19 ± 0,11	1,88
L13	15,6 ± 0,6	0,483 ± 0,004	13,1 ± 0,5	14,9 ± 3,9	0,7 ± 0,1	33,9 ± 3,6	37,1 ± 3,8	0,50 ± 0,04	71,0 ± 5,5	1,09 ± 0,10	2,17
L14	16,8 ± 0,6	0,651 ± 0,005	21,7 ± 0,8	18,6 ± 4,8	6,8 ± 0,4	29,6 ± 3,2	39,5 ± 4,0	0,45 ± 0,04	69,1 ± 5,3	1,33 ± 0,12	1,76
L15	15,4 ± 0,6	0,117 ± 0,001	12,8 ± 0,5	20,7 ± 5,4	5,6 ± 0,4	30,1 ± 3,2	35,0 ± 3,6	0,24 ± 0,02	65,1 ± 5,0	1,16 ± 0,10	1,95
L16	15,6 ± 0,6	0,297 ± 0,002	5,5 ± 0,2	17,4 ± 4,5	3,0 ± 0,2	32,7 ± 3,5	39,2 ± 4,0	0,06 ± 0,01	71,9 ± 5,5	1,20 ± 0,11	2,10
L17	17,8 ± 0,6	0,795 ± 0,006	7,2 ± 0,4	17,8 ± 4,6	0,5 ± 0,1	33,4 ± 3,6	36,0 ± 3,7	0,47 ± 0,04	69,4 ± 5,3	1,08 ± 0,10	1,88
L18	15,8 ± 0,6	0,734 ± 0,006	14,3 ± 0,6	13,1 ± 3,4	4,4 ± 0,3	33,9 ± 3,6	35,9 ± 3,6	0,50 ± 0,04	69,8 ± 5,4	1,06 ± 0,09	2,15
<i>Helianthus annuus</i>											
S1	17,7 ± 0,6	0,321 ± 0,003	18,0 ± 0,9	25,5 ± 6,7	5,2 ± 0,4	30,6 ± 3,3	36,0 ± 3,7	0,22 ± 0,02	66,6 ± 5,1	1,18 ± 0,10	1,73
S2	15,4 ± 0,6	0,280 ± 0,002	18,1 ± 0,9	25,1 ± 6,6	7,0 ± 0,5	33,8 ± 3,6	35,5 ± 3,6	0,00 ± 0,00	69,3 ± 5,3	1,05 ± 0,09	2,19
S3	16,9 ± 0,6	0,712 ± 0,006	16,1 ± 0,8	19,1 ± 5,0	7,8 ± 0,5	31,4 ± 3,4	39,1 ± 4,0	1,27 ± 0,10	70,5 ± 5,4	1,24 ± 0,11	1,86

Prilog 1. Nastavak

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
S4	15,8 ± 0,6	0,351 ± 0,003	25,0 ± 0,9	17,2 ± 4,5	0,3 ± 0,1	36,1 ± 3,9	39,7 ± 4,0	0,05 ± 0,01	75,9 ± 5,8	1,10 ± 0,09	2,29
S5	16,1 ± 0,6	0,298 ± 0,002	25,6 ± 1,0	13,4 ± 3,5	5,2 ± 0,4	38,7 ± 3,4	40,2 ± 4,1	0,05 ± 0,01	79,0 ± 6,1	1,04 ± 0,09	2,40
S6	17,8 ± 0,6	0,265 ± 0,002	18,2 ± 0,9	12,7 ± 3,3	11,4 ± 0,7	31,4 ± 3,3	39,4 ± 4,0	0,05 ± 0,01	70,8 ± 5,4	1,25 ± 0,11	1,76
S7	16,9 ± 0,6	0,358 ± 0,006	29,1 ± 1,1	28,7 ± 7,4	2,9 ± 0,2	34,3 ± 3,7	36,1 ± 3,7	0,11 ± 0,01	70,3 ± 5,4	1,05 ± 0,09	2,03
S8	13,0 ± 0,5	0,397 ± 0,003	22,8 ± 0,9	21,2 ± 5,5	4,6 ± 0,3	32,6 ± 3,5	35,4 ± 3,6	0,12 ± 0,01	68,0 ± 5,2	1,08 ± 0,10	2,51
S9	15,5 ± 0,6	0,429 ± 0,003	19,8 ± 0,9	17,8 ± 4,6	1,0 ± 0,1	37,2 ± 4,0	38,2 ± 3,9	0,38 ± 0,03	75,4 ± 5,8	1,03 ± 0,09	2,40
S10	16,2 ± 0,6	0,382 ± 0,003	22,9 ± 0,9	18,0 ± 4,7	6,6 ± 0,4	30,4 ± 3,2	36,4 ± 3,7	0,23 ± 0,02	66,8 ± 5,1	1,19 ± 0,11	1,88
<i>Brassica napus</i>											
R1	16,4 ± 0,6	0,205 ± 0,002	13,2 ± 0,6	21,8 ± 5,7	7,6 ± 0,5	30,8 ± 3,3	35,3 ± 3,6	0,73 ± 0,06	66,1 ± 5,1	1,15 ± 0,10	1,88
R2	19,2 ± 0,7	0,125 ± 0,001	7,6 ± 0,4	19,9 ± 5,2	5,4 ± 0,4	33,3 ± 3,6	34,0 ± 3,5	0,14 ± 0,01	67,3 ± 5,2	1,02 ± 0,09	1,74
R3	17,1 ± 0,6	0,202 ± 0,002	10,2 ± 0,4	13,2 ± 3,4	5,2 ± 0,4	39,0 ± 4,2	39,2 ± 4,0	0,05 ± 0,01	78,2 ± 6,0	1,01 ± 0,09	2,28
R4	16,9 ± 0,6	0,193 ± 0,002	9,8 ± 0,4	17,7 ± 4,6	5,8 ± 0,4	38,8 ± 4,1	39,6 ± 4,0	0,05 ± 0,01	78,4 ± 6,0	1,02 ± 0,09	2,30
R5	18,0 ± 0,6	0,106 ± 0,001	8,9 ± 0,4	19,2 ± 5,0	1,8 ± 0,2	34,7 ± 3,7	35,1 ± 3,6	0,05 ± 0,01	69,8 ± 5,4	1,01 ± 0,09	1,92
R6	17,0 ± 0,6	0,227 ± 0,002	11,4 ± 0,5	15,5 ± 4,0	0,3 ± 0,1	36,3 ± 3,9	36,8 ± 3,7	0,05 ± 0,01	73,2 ± 5,6	1,01 ± 0,09	2,14
R7	17,2 ± 0,6	0,210 ± 0,002	13,7 ± 0,5	18,8 ± 4,9	1,8 ± 0,2	32,9 ± 3,5	35,0 ± 3,6	0,23 ± 0,02	67,9 ± 5,2	1,06 ± 0,09	1,91
R8	17,8 ± 0,6	0,125 ± 0,001	8,1 ± 0,4	22,1 ± 5,7	2,1 ± 0,2	37,4 ± 4,0	38,0 ± 3,9	0,05 ± 0,01	75,4 ± 5,8	1,02 ± 0,09	2,10
R9	17,1 ± 0,6	0,187 ± 0,002	13,7 ± 0,5	13,0 ± 3,4	3,0 ± 0,2	31,5 ± 3,4	33,8 ± 3,4	0,20 ± 0,02	65,3 ± 5,0	1,07 ± 0,10	1,84
R10	16,9 ± 0,6	0,254 ± 0,002	12,4 ± 0,5	20,4 ± 5,3	3,1 ± 0,2	30,1 ± 3,2	32,9 ± 3,3	0,18 ± 0,01	63,0 ± 4,9	1,09 ± 0,10	1,78
<i>Honeydew</i>											
M1	16,6 ± 0,6	1,320 ± 0,011	22,7 ± 0,9	16,8 ± 4,4	4,8 ± 0,3	25,8 ± 2,7	32,7 ± 3,3	0,20 ± 0,02	58,5 ± 4,5	1,27 ± 0,11	1,55
M2	16,4 ± 0,6	1,160 ± 0,010	30,0 ± 1,4	21,3 ± 5,6	26,1 ± 1,6	25,8 ± 2,7	33,2 ± 3,4	0,17 ± 0,01	59,0 ± 4,5	1,29 ± 0,11	1,58
M3	16,9 ± 0,6	1,523 ± 0,012	25,7 ± 1,0	12,2 ± 3,2	4,6 ± 0,3	22,8 ± 2,4	35,2 ± 3,6	0,16 ± 0,01	58,1 ± 4,5	1,54 ± 0,14	1,35
M4	15,2 ± 0,6	2,110 ± 0,017	49,4 ± 1,8	12,5 ± 3,2	0,7 ± 0,1	20,6 ± 2,2	29,1 ± 3,0	1,44 ± 0,11	49,8 ± 3,8	1,41 ± 0,13	1,36
M5	15,4 ± 0,6	1,517 ± 0,012	37,6 ± 1,4	39,8 ± 10,3	1,3 ± 0,1	25,3 ± 2,7	34,5 ± 3,5	0,83 ± 0,06	59,8 ± 4,6	1,37 ± 0,12	1,64
M6	13,8 ± 0,5	0,132 ± 0,001	12,3 ± 0,5	19,3 ± 5,0	6,3 ± 0,4	18,9 ± 2,0	19,8 ± 2,0	0,26 ± 0,02	38,8 ± 3,0	1,05 ± 0,09	1,37

Prilog 1. Nastavak

Uzorak	Sadržaj vode (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Aktivnost dijastaze (DN)	HMF (mg/kg)	Glukoza (g/100 g)	Fruktoza (g/100 g)	Saharoza (g/100 g)	Glukoza + Fruktoza (g/100 g)	Fruktoza / Glukoza	Glukoza / Voda
M7	15,6 ± 0,6	1,134 ± 0,009	24,5 ± 0,3	14,3 ± 3,7	3,7 ± 0,3	22,4 ± 2,4	32,4 ± 3,3	1,24 ± 0,10	54,8 ± 4,2	1,44 ± 0,13	1,44
M8	15,8 ± 0,6	1,049 ± 0,008	32,9 ± 1,2	12,7 ± 3,3	6,7 ± 0,4	26,2 ± 2,8	31,8 ± 3,2	0,93 ± 0,07	58,0 ± 4,5	1,22 ± 0,11	1,66
M9	16,2 ± 0,5	1,030 ± 0,010	41,2 ± 1,9	28,2 ± 7,4	1,0 ± 0,1	26,5 ± 2,8	36,5 ± 3,7	0,00 ± 0,00	63,0 ± 4,8	1,38 ± 0,12	1,64
M10	16,1 ± 0,5	0,681 ± 0,006	30,0 ± 1,4	30,7 ± 8,0	3,4 ± 0,2	27,0 ± 2,9	34,7 ± 3,5	0,07 ± 0,01	61,7 ± 4,8	1,29 ± 0,11	1,68
M11	15,0 ± 0,5	1,250 ± 0,010	31,5 ± 1,5	27,3 ± 7,1	1,1 ± 0,1	22,4 ± 2,4	30,5 ± 3,1	0,00 ± 0,00	52,9 ± 4,1	1,36 ± 0,12	1,49
M12	16,7 ± 0,5	1,030 ± 0,010	53,5 ± 2,5	36,0 ± 9,4	1,0 ± 0,1	25,4 ± 2,7	33,7 ± 3,4	0,05 ± 0,01	59,1 ± 4,5	1,33 ± 0,12	1,52
M13	15,8 ± 0,5	1,110 ± 0,010	34,9 ± 1,6	29,1 ± 7,6	3,1 ± 0,2	24,9 ± 2,7	36,9 ± 3,8	0,06 ± 0,01	61,8 ± 4,8	1,48 ± 0,13	1,58
M14	16,9 ± 0,5	1,201 ± 0,010	35,0 ± 1,6	33,0 ± 8,6	1,3 ± 0,1	30,0 ± 3,2	40,0 ± 4,1	0,00 ± 0,00	70,0 ± 5,4	1,33 ± 0,12	1,77
M15	16,8 ± 0,5	1,380 ± 0,010	31,2 ± 1,5	33,2 ± 8,7	1,4 ± 0,1	25,8 ± 2,8	35,2 ± 3,6	0,05 ± 0,01	61,0 ± 4,7	1,36 ± 0,12	1,53
M16	17,8 ± 0,5	0,857 ± 0,007	27,9 ± 1,3	33,1 ± 8,6	1,8 ± 0,2	28,5 ± 3,0	38,0 ± 3,9	0,00 ± 0,00	66,5 ± 5,1	1,33 ± 0,12	1,60
M17	17,7 ± 0,5	0,901 ± 0,007	42,7 ± 2,0	39,1 ± 10,2	7,1 ± 0,5	26,4 ± 2,8	34,8 ± 3,5	0,00 ± 0,00	61,2 ± 4,7	1,32 ± 0,12	1,49
M18	17,1 ± 0,5	1,290 ± 0,010	32,3 ± 1,5	31,5 ± 8,2	2,9 ± 0,2	24,9 ± 2,7	36,0 ± 3,7	0,00 ± 0,00	60,9 ± 4,7	1,44 ± 0,13	1,46
M19	16,8 ± 0,5	0,656 ± 0,005	35,7 ± 1,7	16,5 ± 4,3	37,8 ± 2,3	24,5 ± 2,6	29,6 ± 3,0	0,14 ± 0,01	54,1 ± 4,2	1,21 ± 0,11	1,50
M20	16,4 ± 0,5	0,646 ± 0,005	29,2 ± 1,4	12,0 ± 3,1	42,7 ± 2,6	32,3 ± 3,4	40,0 ± 4,1	0,06 ± 0,01	72,3 ± 5,6	1,24 ± 0,11	1,98
M21	15,3 ± 0,5	0,826 ± 0,007	31,8 ± 2,4	23,5 ± 6,1	2,2 ± 0,2	24,3 ± 2,6	31,5 ± 3,2	0,24 ± 0,02	55,8 ± 4,3	1,30 ± 0,12	1,59
M22	15,3 ± 0,5	1,100 ± 0,010	32,9 ± 2,5	23,8 ± 6,2	0,6 ± 0,1	19,3 ± 2,1	29,8 ± 3,0	1,51 ± 0,12	49,1 ± 3,8	1,55 ± 0,14	1,26
M23	15,2 ± 0,5	0,527 ± 0,004	27,3 ± 2,1	21,6 ± 5,7	4,4 ± 0,3	20,8 ± 2,2	36,5 ± 3,7	1,42 ± 0,11	57,3 ± 4,4	1,76 ± 0,16	1,36
M24	15,0 ± 0,5	0,861 ± 0,007	32,0 ± 2,4	24,8 ± 6,5	1,2 ± 0,1	22,0 ± 2,3	33,7 ± 3,4	0,17 ± 0,01	55,6 ± 4,3	1,53 ± 0,14	1,46
M25	16,8 ± 0,5	0,956 ± 0,008	33,6 ± 2,5	30,4 ± 7,9	1,0 ± 0,1	23,7 ± 2,5	34,6 ± 3,5	0,16 ± 0,01	58,3 ± 4,5	1,46 ± 0,13	1,41
M26	17,1 ± 0,5	0,815 ± 0,007	29,3 ± 2,2	14,3 ± 3,8	1,8 ± 0,2	26,6 ± 2,8	37,5 ± 3,8	0,00 ± 0,00	64,1 ± 4,9	1,41 ± 0,13	1,56

Prilog 2. Studija stabilnosti slobodne kislosti tokom godinu dana na primeru autentičnih uzoraka bagremovog meda

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Povećanja	Δ 9 meseci	% Povećanja	Δ 12 meseci	% Povećanja
B1	9,46	9,79	11,71	1,92	19,6	0,33	0,4	2,25	23,8
B2	8,89	9,68	9,81	0,12	1,3	0,79	0,9	0,92	10,3
B3	9,07	10,31	10,73	0,42	4,0	1,24	1,4	1,66	18,3
B4	8,13	8,95	9,09	0,14	1,6	0,82	1,0	0,96	11,8
B5	7,71	8,50	8,72	0,22	2,6	0,79	1,0	1,01	13,1
B6	8,01	8,53	9,77	1,24	14,6	0,52	0,6	1,76	22,0
B7	7,84	8,45	8,79	0,34	4,1	0,61	0,8	0,95	12,1
B8	7,80	8,47	8,60	0,13	1,6	0,67	0,9	0,80	10,3
B9	7,07	7,27	7,34	0,07	1,0	0,20	0,3	0,27	3,8
B10	7,59	8,03	8,16	0,13	1,6	0,44	0,6	0,57	7,5
B11	10,73	11,11	11,30	0,19	1,7	0,38	0,4	0,57	5,3
B12	7,63	8,06	8,24	0,18	2,2	0,43	0,6	0,61	8,0
B13	7,52	7,98	8,08	0,10	1,2	0,46	0,6	0,56	7,4
B14	10,08	11,33	10,39	-0,94	-8,3	1,25	1,2	0,31	3,1
B15	7,26	7,45	7,49	0,04	0,5	0,19	0,3	0,23	3,2
B16	7,08	7,56	7,68	0,12	1,6	0,48	0,7	0,60	8,5
B17	7,41	7,66	7,73	0,07	0,9	0,25	0,3	0,32	4,3
B18	7,28	7,33	7,35	0,02	0,3	0,05	0,1	0,07	1,0
B19	9,97	10,00	10,02	0,02	0,2	0,03	0,1	0,05	0,5
B20	9,70	9,78	9,81	0,03	0,3	0,08	0,1	0,11	1,1
B21	8,25	8,36	8,39	0,03	0,3	0,11	0,1	0,14	1,6
B22	10,21	10,36	10,42	0,06	0,6	0,15	0,2	0,21	2,1
B23	8,42	8,43	8,70	0,27	3,2	0,01	0,1	0,28	3,4
B24	7,94	7,97	10,16	2,19	27,5	0,03	0,1	2,22	28,0
B25	8,17	8,27	8,34	0,07	0,8	0,10	0,1	0,17	2,1
B26	7,69	7,81	7,87	0,06	0,8	0,12	0,2	0,18	2,3

Prilog 2. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Povećanja	Δ 9 meseci	% Povećanja	Δ 12 meseci	% Povećanja
B27	8,76	9,10	9,20	0,10	1,1	0,34	0,4	0,44	5,0
B28	7,45	7,66	7,71	0,05	0,6	0,21	0,3	0,26	3,5
B29	6,91	7,00	7,05	0,05	0,7	0,09	0,1	0,14	2,0
B30	6,50	6,52	6,52	0,00	0,1	0,02	0,1	0,02	0,4
B31	8,16	8,25	8,26	0,01	0,2	0,09	0,1	0,10	1,2
B32	8,81	8,90	8,95	0,05	0,6	0,09	0,1	0,14	1,5
B33	9,42	9,51	9,56	0,05	0,5	0,09	0,1	0,14	1,5
B34	8,87	9,02	9,16	0,14	1,5	0,15	0,2	0,29	3,3
B35	8,07	8,35	8,41	0,06	0,7	0,28	0,4	0,34	4,2
B36	8,50	8,67	9,03	0,36	4,1	0,17	0,2	0,53	6,2
B37	8,39	9,39	9,66	0,27	2,9	1,00	1,2	1,27	15,1
B38	9,16	9,31	9,70	0,40	4,2	0,15	0,2	0,54	5,9
B39	9,22	9,28	9,31	0,03	0,3	0,06	0,1	0,09	1,0
B40	7,38	7,59	7,60	0,02	0,2	0,21	0,3	0,22	3,0
B41	7,87	8,18	8,27	0,09	1,1	0,31	0,4	0,40	5,1
B42	7,77	8,29	8,40	0,11	1,4	0,52	0,7	0,63	8,1
B43	7,37	7,65	7,77	0,12	1,6	0,28	0,4	0,40	5,4
B44	7,42	8,14	8,25	0,11	1,4	0,72	1,0	0,83	11,2
B45	7,41	7,57	7,66	0,09	1,2	0,16	0,2	0,25	3,4
B46	7,21	7,43	7,49	0,06	0,8	0,22	0,3	0,28	3,9
B47	7,70	7,87	7,92	0,05	0,7	0,17	0,2	0,22	2,9
B48	10,33	10,50	10,59	0,09	0,9	0,17	0,2	0,26	2,5
B49	7,89	8,08	8,16	0,08	1,0	0,19	0,2	0,27	3,4
B50	9,40	9,88	10,02	0,14	1,5	0,48	0,5	0,62	6,6
B51	7,03	7,44	7,64	0,20	2,8	0,41	0,6	0,61	8,7
B52	7,51	8,04	8,16	0,12	1,5	0,53	0,7	0,65	8,7

Prilog 2. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Povećanja	Δ 9 meseci	% Povećanja	Δ 12 meseci	% Povećanja
B53	8,70	8,89	8,92	0,03	0,3	0,19	0,2	0,22	2,6
B54	9,10	9,20	9,23	0,03	0,3	0,10	0,1	0,13	1,4
B55	7,35	7,50	7,56	0,06	0,8	0,15	0,2	0,21	2,9
B56	6,57	7,00	7,12	0,12	1,8	0,43	0,6	0,55	8,4
B57	7,39	7,53	7,58	0,05	0,7	0,14	0,2	0,19	2,6
B58	7,82	8,03	8,10	0,07	0,9	0,21	0,3	0,28	3,6
B59	7,72	7,73	7,74	0,01	0,1	0,01	0,1	0,02	0,3

Prilog 3. Studija stabilnosti pH–vrednosti vodenog rastvora tokom godinu dana na primeru autentičnih uzoraka bagremovog meda

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Smanjenja	Δ 9 meseci	% Smanjenja	Δ 12 meseci	% Smanjenja
B1	4,24	4,16	4,01	0,15	3,6	0,08	0,2	0,23	5,4
B2	4,19	4,09	4,05	0,04	1,0	0,10	0,2	0,14	3,3
B3	4,00	3,91	3,91	0,00	0,0	0,09	0,2	0,09	2,2
B4	4,20	4,11	4,07	0,04	1,0	0,09	0,2	0,13	3,1
B5	4,24	4,16	4,15	0,01	0,2	0,08	0,2	0,09	2,1
B6	4,29	4,21	4,14	0,07	1,7	0,08	0,2	0,15	3,5
B7	4,29	4,20	4,15	0,05	1,2	0,09	0,2	0,14	3,3
B8	4,13	4,06	4,04	0,02	0,5	0,07	0,2	0,09	2,2
B9	4,19	4,14	4,13	0,01	0,2	0,05	0,1	0,06	1,4
B10	4,20	4,15	4,13	0,02	0,5	0,05	0,1	0,07	1,7
B11	4,17	4,12	4,09	0,03	0,7	0,05	0,1	0,08	1,9
B12	4,19	4,17	4,15	0,02	0,5	0,02	0,1	0,04	1,0
B13	4,23	4,19	4,12	0,07	1,7	0,04	0,1	0,11	2,6
B14	4,18	4,11	4,09	0,02	0,5	0,07	0,2	0,09	2,2
B15	4,42	4,37	4,28	0,09	2,1	0,05	0,1	0,14	3,2
B16	4,28	4,24	4,22	0,02	0,5	0,04	0,1	0,06	1,4
B17	4,41	4,36	4,35	0,01	0,2	0,05	0,1	0,06	1,4
B18	4,20	4,16	4,12	0,04	1,0	0,04	0,1	0,08	1,9
B19	4,22	4,19	4,13	0,06	1,4	0,03	0,1	0,09	2,1
B20	4,19	4,16	4,11	0,05	1,2	0,03	0,1	0,08	1,9
B21	4,16	4,14	4,10	0,04	1,0	0,02	0,1	0,06	1,4
B22	4,19	4,17	4,12	0,05	1,2	0,02	0,1	0,07	1,7
B23	4,30	4,27	4,22	0,05	1,2	0,03	0,1	0,08	1,9
B24	4,36	4,32	4,30	0,02	0,5	0,04	0,1	0,06	1,4
B25	4,12	4,12	4,14	-0,02	-0,5	0,00	0,0	-0,02	-0,5
B26	4,19	4,18	4,14	0,04	1,0	0,01	0,0	0,05	1,2

Prilog 3. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Smanjenja	Δ 9 meseci	% Smanjenja	Δ 12 meseci	% Smanjenja
B27	4,15	4,13	4,10	0,03	0,7	0,02	0,1	0,05	1,2
B28	4,21	4,20	4,17	0,03	0,7	0,01	0,1	0,04	1,0
B29	4,18	4,18	4,11	0,07	1,7	0,00	0,0	0,07	1,8
B30	4,17	4,18	4,16	0,02	0,5	-0,01	-0,1	0,01	0,2
B31	4,27	4,27	4,23	0,04	0,9	0,00	0,0	0,04	0,9
B32	4,13	4,14	4,10	0,04	1,0	-0,01	-0,1	0,03	0,7
B33	4,06	4,04	4,01	0,03	0,7	0,02	0,1	0,05	1,2
B34	4,07	4,04	3,99	0,05	1,2	0,03	0,1	0,08	2,0
B35	4,15	4,12	4,08	0,04	1,0	0,03	0,1	0,07	1,7
B36	4,08	4,06	4,01	0,05	1,2	0,02	0,1	0,07	1,7
B37	4,22	4,17	4,10	0,07	1,7	0,05	0,1	0,12	2,8
B38	4,23	4,19	4,15	0,04	1,0	0,04	0,1	0,08	1,9
B39	4,26	4,21	4,19	0,02	0,5	0,05	0,1	0,07	1,6
B40	4,30	4,27	4,23	0,04	0,9	0,03	0,1	0,07	1,6
B41	4,40	4,34	4,28	0,06	1,4	0,06	0,1	0,12	2,7
B42	4,42	4,35	4,30	0,05	1,2	0,07	0,2	0,12	2,7
B43	4,25	4,20	4,18	0,02	0,5	0,05	0,1	0,07	1,6
B44	4,32	4,22	4,19	0,03	0,7	0,10	0,2	0,13	3,0
B45	4,23	4,18	4,14	0,04	1,0	0,05	0,1	0,09	2,1
B46	4,24	4,20	4,16	0,04	1,0	0,04	0,1	0,08	1,9
B47	4,21	4,16	4,12	0,04	1,0	0,05	0,1	0,09	2,1
B48	4,23	4,18	4,17	0,01	0,2	0,05	0,1	0,06	1,4
B49	4,33	4,30	4,28	0,02	0,5	0,03	0,1	0,05	1,2
B50	4,21	4,16	4,15	0,01	0,2	0,05	0,1	0,06	1,4
B51	4,36	4,30	4,25	0,05	1,2	0,06	0,1	0,11	2,5
B52	4,16	4,14	4,12	0,02	0,5	0,02	0,1	0,04	1,0

Prilog 3. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Smanjenja	Δ 9 meseci	% Smanjenja	Δ 12 meseci	% Smanjenja
B53	4,07	4,06	4,04	0,02	0,5	0,01	0,1	0,03	0,7
B54	4,30	4,15	4,11	0,04	1,0	0,15	0,4	0,19	4,4
B55	4,19	4,20	4,16	0,04	1,0	-0,01	-0,1	0,03	0,7
B56	4,27	4,24	4,22	0,02	0,5	0,03	0,1	0,05	1,2
B57	4,41	4,37	4,35	0,02	0,5	0,04	0,1	0,06	1,4
B58	4,29	4,27	4,24	0,03	0,7	0,02	0,1	0,05	1,2
B59	4,24	4,22	4,22	0,00	0,0	0,02	0,1	0,02	0,5

Prilog 4. Studija stabilnosti sadržaja HMF–a tokom godinu dana na primeru autentičnih uzoraka bagremovog meda

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	Δ 9 meseci	Δ 12 meseci
B1	n.k.	4,37	5,16	0,79	4,37	5,16
B2	n.k.	3,59	4,78	1,19	3,59	4,78
B3	n.k.	2,43	4,53	2,10	2,43	4,53
B4	0,68	3,50	4,32	0,83	2,82	3,64
B5	0,69	2,50	4,54	2,04	1,82	3,85
B6	0,51	2,39	3,92	1,54	1,88	3,41
B7	0,79	3,02	4,78	1,76	2,24	3,99
B8	0,67	3,08	5,44	2,36	2,42	4,78
B9	0,30	2,22	4,63	2,41	1,93	4,34
B10	0,37	1,99	4,63	2,64	1,63	4,27
B11	1,47	4,92	6,16	1,24	3,46	4,69
B12	1,02	3,13	4,25	1,12	2,11	3,23
B13	0,50	2,87	4,20	1,33	2,37	3,70
B14	1,37	3,73	5,27	1,55	2,36	3,90
B15	0,89	2,60	3,73	1,13	1,72	2,84
B16	0,51	2,19	3,42	1,23	1,68	2,91
B17	0,77	2,25	3,43	1,18	1,49	2,67
B18	n.k.	2,53	4,10	1,58	2,53	4,10
B19	0,50	3,59	5,58	1,99	3,10	5,09
B20	0,74	3,37	5,24	1,88	2,63	4,51
B21	0,53	3,01	4,11	1,10	2,48	3,58
B22	1,59	3,68	5,60	1,92	2,09	4,01
B23	0,50	2,11	3,33	1,22	1,62	2,83
B24	0,83	2,26	3,68	1,42	1,43	2,85
B25	0,14	2,79	3,96	1,18	2,65	3,83
B26	0,23	2,47	3,72	1,25	2,24	3,49

Prilog 4. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	Δ 9 meseci	Δ 12 meseci
B27	0,36	2,58	4,01	1,43	2,22	3,65
B28	0,70	2,89	4,15	1,26	2,20	3,45
B29	0,02	2,13	2,99	0,86	2,11	2,97
B30	n.k.	2,01	3,17	1,17	2,01	3,17
B31	0,33	2,70	3,98	1,28	2,38	3,66
B32	0,21	3,29	4,63	1,34	3,08	4,42
B33	n.k.	2,55	3,89	1,35	2,55	3,89
B34	n.k.	2,60	3,03	0,43	2,60	3,03
B35	0,61	3,18	4,92	1,74	2,58	4,32
B36	0,58	3,08	4,59	1,51	2,51	4,02
B37	0,69	2,37	3,39	1,02	1,68	2,70
B38	0,83	2,58	4,48	1,90	1,75	3,65
B39	0,46	2,43	3,50	1,07	1,97	3,04
B40	0,91	3,48	4,94	1,46	2,57	4,03
B41	0,64	2,86	4,25	1,40	2,22	3,61
B42	0,23	2,26	2,85	0,59	2,03	2,62
B43	0,71	2,81	3,77	0,96	2,10	3,06
B44	0,18	2,09	2,97	0,88	1,91	2,79
B45	0,39	2,34	3,22	0,89	1,95	2,83
B46	0,26	2,46	3,56	1,10	2,20	3,30
B47	0,72	2,36	3,19	0,83	1,64	2,47
B48	0,22	2,49	3,29	0,80	2,27	3,07
B49	0,34	2,48	4,06	1,58	2,14	3,72
B50	0,36	2,03	4,17	2,14	1,67	3,81
B51	0,65	2,50	4,12	1,63	1,85	3,48
B52	0,81	2,60	4,66	2,06	1,79	3,85

Prilog 4. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	Δ 9 meseci	Δ 12 meseci
B53	0,55	3,25	4,78	1,54	2,70	4,24
B54	0,63	2,32	4,38	2,07	1,69	3,76
B55	2,01	2,13	3,72	1,60	0,12	1,72
B56	2,38	2,86	4,21	1,35	0,48	1,83
B57	1,36	1,77	3,58	1,81	0,42	2,22
B58	1,22	2,11	3,65	1,54	0,90	2,43
B59	1,54	2,46	3,56	1,11	0,92	2,03

n.k. – nije kvantifikovan

Prilog 5. Studija stabilnosti aktivnosti diastaze tokom godinu dana na primeru autentičnih uzoraka bagremovog meda

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Smanjenja	Δ 9 meseci	% Smanjenja	Δ 12 meseci	% Smanjenja
B1	20,4	16,4	15,6	0,8	4,9	4,0	2,0	4,8	23,5
B2	24,0	19,7	16,9	2,8	14,2	4,3	1,8	7,1	29,6
B3	16,4	13,9	11,5	2,4	17,3	2,5	1,5	4,9	29,9
B4	16,8	14,5	12,7	1,8	12,4	2,3	1,4	4,1	24,4
B5	16,3	13,3	12,4	0,9	6,8	3,0	1,8	3,9	23,9
B6	12,9	10,6	9,6	1,0	9,4	2,3	1,8	3,3	25,6
B7	19,4	16,8	14,9	1,9	11,3	2,6	1,3	4,5	23,2
B8	16,3	13,9	13,0	0,9	6,5	2,4	1,5	3,3	20,2
B9	17,0	12,1	10,0	2,1	17,4	4,9	2,9	7,0	41,2
B10	11,6	9,1	8,0	1,1	12,1	2,5	2,2	3,6	31,0
B11	21,1	17,2	15,0	2,2	12,8	3,9	1,8	6,1	28,9
B12	16,8	14,3	12,6	1,7	11,9	2,5	1,5	4,2	25,0
B13	18,9	16,3	14,6	1,7	10,4	2,6	1,4	4,3	22,8
B14	22,5	18,7	16,6	2,1	11,2	3,8	1,7	5,9	26,2
B15	14,7	14,2	13,8	0,4	2,8	0,5	0,3	0,9	6,1
B16	17,2	13,6	12,2	1,4	10,3	3,6	2,1	5,0	29,1
B17	14,9	12,8	11,9	0,9	7,0	2,1	1,4	3,0	20,1
B18	12,9	10,7	9,9	0,8	7,5	2,2	1,7	3,0	23,3
B19	21,2	17,9	16,2	1,7	9,5	3,3	1,6	5,0	23,6
B20	24,7	21,0	20,2	0,8	3,8	3,7	1,5	4,5	18,2
B21	20,2	18,4	16,6	1,8	9,8	1,8	0,9	3,6	17,8
B22	22,5	18,0	15,9	2,1	11,7	4,5	2,0	6,6	29,3
B23	11,5	9,1	8,4	0,7	7,7	2,4	2,1	3,1	27,0
B24	18,8	16,2	15,5	0,7	4,3	2,6	1,4	3,3	17,6
B25	17,2	13,2	11,5	1,7	12,9	4,0	2,3	5,7	33,1
B26	16,1	13,1	11,3	1,8	13,7	3,0	1,9	4,8	29,8

Prilog 5. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Smanjenja	Δ 9 meseci	% Smanjenja	Δ 12 meseci	% Smanjenja
B27	17,6	9,0	6,5	2,5	27,8	8,6	4,9	11,1	63,1
B28	10,8	10,5	10,3	0,2	1,9	0,3	0,3	0,5	4,6
B29	12,5	10,5	9,8	0,7	6,7	2,0	1,6	2,7	21,6
B30	11,9	10,4	10,0	0,4	3,8	1,5	1,3	1,9	16,0
B31	19,1	17,3	16,8	0,5	2,9	1,8	0,9	2,3	12,0
B32	16,3	14,8	14,0	0,8	5,4	1,5	0,9	2,3	14,1
B33	16,4	14,0	13,1	0,9	6,4	2,4	1,5	3,3	20,1
B34	12,9	10,2	9,1	1,1	10,8	2,7	2,1	3,8	29,5
B35	11,9	10,3	9,7	0,6	5,8	1,6	1,3	2,2	18,5
B36	15,6	13,1	11,8	1,3	9,9	2,5	1,6	3,8	24,4
B37	18,2	16,3	15,2	1,1	6,8	1,9	1,0	3,0	16,5
B38	18,6	16,0	15,4	0,6	3,8	2,6	1,4	3,2	17,2
B39	20,2	18,5	16,4	2,1	11,4	1,7	0,8	3,8	18,8
B40	16,9	13,7	12,9	0,8	5,8	3,2	1,9	4,0	23,7
B41	20,5	16,9	15,6	1,3	7,7	3,6	1,8	4,9	23,9
B42	11,2	10,1	8,8	1,3	12,9	1,1	1,0	2,4	21,4
B43	17,0	14,2	12,4	1,8	12,7	2,8	1,7	4,6	27,1
B44	17,1	14,5	12,6	1,9	13,1	2,6	1,5	4,5	26,3
B45	19,2	16,8	15,0	1,8	10,7	2,4	1,2	4,2	21,9
B46	19,1	16,1	14,6	1,5	9,3	3,0	1,6	4,5	23,6
B47	18,8	15,3	13,2	2,1	13,7	3,5	1,9	5,6	29,8
B48	23,7	20,7	18,8	1,9	9,2	3,0	1,3	4,9	20,7
B49	24,9	19,4	18,7	0,7	3,6	5,5	2,2	6,2	24,9
B50	22,1	19,3	17,1	2,2	11,4	2,8	1,3	5,0	22,6
B51	18,9	16,8	16,3	0,5	3,0	2,1	1,1	2,6	13,8
B52	18,6	17,0	16,7	0,3	1,8	1,6	0,9	1,9	10,2

Prilog 5. Nastavak

Uzorak	Jul 2022.	April 2023.	Jul 2023.	Δ 3 meseca	% Smanjenja	Δ 9 meseci	% Smanjenja	Δ 12 meseci	% Smanjenja
B53	17,5	16,1	14,7	1,4	8,7	1,4	0,8	2,8	16,0
B54	19,2	16,1	14,9	1,2	7,4	3,1	1,6	4,3	22,4
B55	16,4	15,2	14,7	0,5	3,3	1,2	0,7	1,7	10,4
B56	17,0	15,2	14,9	0,3	2,0	1,8	1,1	2,1	12,4
B57	15,6	14,9	14,6	0,3	2,0	0,7	0,4	1,0	6,4
B58	14,8	14,4	14,3	0,1	0,7	0,4	0,3	0,5	3,4
B59	16,3	15,7	15,1	0,6	3,8	0,6	0,4	1,2	7,4

Prilog 6. Odnosi stabilnih izotopa ugljenika analiziranih uzoraka meda

Uzorak	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (protein - med) (‰)	Sadržaj šećera C4 biljaka (%)
<i>Robinia pseudoacacia</i>				
B1	-26,0 ± 0,7	-26,2 ± 0,6	-0,16	-0,9 ± 0,1
B2	-26,1 ± 0,7	-26,0 ± 0,6	0,10	0,6 ± 0,1
B3	-24,8 ± 1,1	-25,0 ± 1,3	-0,23	-1,5 ± 0,1
B4	-26,4 ± 1,2	-26,1 ± 1,4	0,26	1,6 ± 0,2
B5	-26,3 ± 1,2	-26,1 ± 1,4	0,20	1,2 ± 0,1
B6	-25,7 ± 1,1	-25,9 ± 1,4	-0,18	-1,1 ± 0,1
B7	-26,1 ± 1,2	-25,8 ± 1,4	0,32	2,0 ± 0,2
B8	-24,8 ± 1,1	-25,0 ± 1,3	-0,15	-1,0 ± 0,1
B9	-24,8 ± 1,1	-24,6 ± 1,3	0,25	1,7 ± 0,2
B10	-26,2 ± 1,2	-25,9 ± 1,4	0,32	2,0 ± 0,2
B11	-25,6 ± 1,1	-25,8 ± 1,4	-0,20	-1,2 ± 0,1
B12	-25,6 ± 0,7	-25,2 ± 0,6	0,35	2,3 ± 0,1
B13	-26,4 ± 0,7	-26,5 ± 0,6	-0,10	-0,6 ± 0,1
B14	-23,8 ± 1,1	-24,2 ± 1,3	-0,42	-2,9 ± 0,2
B15	-25,5 ± 1,1	-25,3 ± 1,3	0,23	1,4 ± 0,1
B16	-25,0 ± 1,1	-25,3 ± 1,3	-0,28	-1,8 ± 0,2
B17	-23,9 ± 1,1	-24,5 ± 1,3	-0,60	-4,0 ± 0,3
B18	-24,9 ± 1,1	-24,5 ± 1,3	0,30	2,0 ± 0,2
B19	-24,0 ± 1,1	-24,4 ± 1,3	-0,45	-3,1 ± 0,3
B20	-24,2 ± 1,1	-23,7 ± 1,3	0,50	3,6 ± 0,3
B21	-25,2 ± 1,1	-25,3 ± 1,3	-0,15	-1,0 ± 0,1
B22	-24,7 ± 1,1	-25,2 ± 1,3	-0,47	-3,0 ± 0,2
B23	-25,5 ± 0,7	-24,7 ± 0,6	0,83	5,5 ± 0,2
B24	-25,5 ± 0,7	-25,3 ± 0,6	0,17	1,1 ± 0,1
B25	-26,2 ± 1,2	-25,7 ± 1,4	0,54	3,4 ± 0,3

Prilog 6. Nastavak

Uzorak	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (protein - med) (‰)	Sadržaj šećera C4 biljaka (%)
B26	-26,5 ± 1,2	-26,0 ± 1,4	0,50	3,0 ± 0,2
B27	-25,5 ± 1,1	-25,7 ± 1,4	-0,22	-1,4 ± 0,1
B28	-25,4 ± 1,1	-24,7 ± 1,3	0,62	4,1 ± 0,3
B29	-25,4 ± 1,1	-24,7 ± 1,3	0,72	4,8 ± 0,4
B30	-25,1 ± 1,1	-24,4 ± 1,3	0,66	4,5 ± 0,3
B31	-26,2 ± 1,2	-25,6 ± 1,4	0,58	3,6 ± 0,3
B32	-24,9 ± 1,1	-24,1 ± 1,3	0,76	5,3 ± 0,4
B33	-24,9 ± 1,1	-24,6 ± 1,3	0,25	1,7 ± 0,2
B34	-24,8 ± 0,7	-25,2 ± 0,6	-0,44	-2,9 ± 0,1
B35	-26,1 ± 0,7	-25,5 ± 0,6	0,55	3,5 ± 0,2
B36	-24,7 ± 1,1	-24,3 ± 1,3	0,46	3,2 ± 0,3
B37	-23,9 ± 1,1	-24,5 ± 1,3	-0,64	-4,3 ± 0,3
B38	-24,8 ± 1,1	-24,3 ± 1,3	0,49	3,4 ± 0,3
B39	-25,2 ± 1,1	-24,6 ± 1,3	0,55	3,7 ± 0,3
B40	-25,9 ± 1,2	-25,6 ± 1,4	0,31	2,0 ± 0,2
B41	-23,8 ± 1,1	-24,5 ± 1,3	-0,66	-4,5 ± 0,3
B42	-24,1 ± 1,1	-23,7 ± 1,3	0,44	3,2 ± 0,3
B43	-24,2 ± 1,1	-24,4 ± 1,3	-0,13	-0,9 ± 0,1
B44	-25,5 ± 1,1	-25,2 ± 1,3	0,24	1,6 ± 0,1
B45	-25,4 ± 0,7	-25,0 ± 0,6	0,41	2,7 ± 0,1
B46	-24,5 ± 0,7	-24,2 ± 0,6	0,25	1,8 ± 0,1
B47	-25,6 ± 1,1	-25,0 ± 1,3	0,59	3,9 ± 0,3
B48	-23,8 ± 1,1	-24,2 ± 1,3	-0,34	-2,4 ± 0,2
B49	-24,8 ± 1,1	-24,6 ± 1,3	0,18	1,2 ± 0,1
B50	-25,7 ± 1,1	-25,8 ± 1,4	-0,12	-0,8 ± 0,1
B51	-24,2 ± 1,1	-24,3 ± 1,3	-0,14	-1,0 ± 0,1

Prilog 6. Nastavak

Uzorak	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (protein - med) (‰)	Sadržaj šećera C4 biljaka (%)
B52	-26,3 ± 1,1	-25,9 ± 1,4	0,40	2,5 ± 0,2
B53	-25,7 ± 1,1	-26,1 ± 1,4	-0,39	-2,4 ± 0,2
B54	-24,1 ± 1,1	-24,5 ± 1,3	-0,36	-2,4 ± 0,2
B55	-25,3 ± 1,1	-24,9 ± 1,3	0,42	2,8 ± 0,2
B56	-24,5 ± 0,7	-25,1 ± 0,6	-0,56	-3,7 ± 0,2
B57	-26,5 ± 0,7	-25,9 ± 0,6	0,61	3,8 ± 0,2
B58	-26,2 ± 1,2	-25,7 ± 1,4	0,52	3,3 ± 0,3
B59	-26,4 ± 1,2	-26,4 ± 1,4	-0,06	-0,4 ± 0,1
B60	-23,8 ± 1,1	-24,4 ± 1,3	-0,61	-4,2 ± 0,3
B61	-24,9 ± 1,1	-25,5 ± 1,3	0,66	4,2 ± 0,3
B62	-25,9 ± 1,2	-25,3 ± 1,3	-0,63	-4,0 ± 0,3
B63	-25,3 ± 1,1	-24,7 ± 1,3	-0,60	-4,0 ± 0,3
B64	-24,8 ± 1,1	-24,4 ± 1,3	-0,42	-2,8 ± 0,2
B65	-25,4 ± 1,1	-24,8 ± 1,3	-0,65	-4,3 ± 0,3
B66	-25,6 ± 1,1	-25,0 ± 1,3	-0,68	-4,5 ± 0,3
B67	-23,9 ± 1,0	-24,6 ± 1,3	0,68	4,6 ± 0,4
B68	-24,9 ± 1,1	-25,8 ± 1,4	0,89	5,5 ± 0,4
B69	-24,3 ± 1,0	-23,8 ± 1,2	-0,49	-3,5 ± 0,3
B70	-25,7 ± 1,1	-24,0 ± 1,2	-1,65	-11,5 ± 0,8
B71	-27,3 ± 1,2	-26,7 ± 1,4	-0,55	-3,2 ± 0,3
B72	-22,2 ± 1,0	n.i.	n.i.	n.k.
B73	-25,5 ± 1,1	-25,6 ± 1,3	0,05	0,3 ± 0,1
B74	-25,0 ± 1,1	-25,2 ± 1,3	0,18	1,1 ± 0,1
<i>Tilia cordata</i>				
L1	-26,0 ± 0,7	-26,8 ± 0,6	-0,81	-4,8 ± 0,2
L2	-26,6 ± 0,7	-27,2 ± 0,6	-0,58	-3,3 ± 0,2

Prilog 6. Nastavak

Uzorak	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (protein - med) (‰)	Sadržaj šećera C4 biljaka (%)
L3	$-26,1 \pm 1,2$	$-27,7 \pm 1,5$	-1,59	$-8,9 \pm 0,6$
L4	$-26,0 \pm 1,2$	$-27,0 \pm 1,4$	-0,93	$-5,4 \pm 0,4$
L5	$-26,9 \pm 1,2$	$-26,4 \pm 1,4$	0,43	$2,6 \pm 0,2$
L6	$-26,0 \pm 1,2$	$-25,4 \pm 1,3$	-0,64	$-4,1 \pm 0,3$
L7	$-26,0 \pm 1,2$	$-25,5 \pm 1,3$	-0,48	$-3,0 \pm 0,2$
L8	$-25,0 \pm 1,1$	$-25,4 \pm 1,3$	0,42	$2,6 \pm 0,2$
L9	$-26,8 \pm 1,2$	$-27,3 \pm 1,4$	-0,58	$-3,3 \pm 0,3$
L10	$-26,3 \pm 1,2$	$-27,0 \pm 1,4$	-0,70	$-4,0 \pm 0,3$
L11	$-26,5 \pm 1,2$	$-25,9 \pm 1,4$	-0,53	$-2,8 \pm 0,2$
L12	$-25,4 \pm 1,1$	$-26,0 \pm 1,4$	0,60	$3,7 \pm 0,3$
L13	$-25,2 \pm 1,1$	$-25,5 \pm 1,3$	0,29	$1,8 \pm 0,2$
L14	$-27,1 \pm 1,2$	$-27,3 \pm 1,4$	-0,21	$-1,2 \pm 0,1$
L15	$-27,0 \pm 1,2$	n.i.	n.i.	n.k.
L16	$-27,1 \pm 1,2$	$-27,9 \pm 1,5$	-0,8	$-4,4 \pm 0,3$
L17	$-27,2 \pm 1,2$	$-26,5 \pm 1,4$	0,73	$4,4 \pm 0,3$
L18	$-26,1 \pm 1,2$	$-27,0 \pm 1,4$	-0,87	$-5,0 \pm 0,4$
<i>Helianthus annuus</i>				
S1	$-28,1 \pm 0,8$	$-27,4 \pm 0,6$	0,67	$3,8 \pm 0,2$
S2	$-27,3 \pm 0,8$	$-26,3 \pm 0,6$	1,03	$6,2 \pm 0,3$
S3	$-26,3 \pm 1,2$	$-27,0 \pm 1,4$	-0,66	$-3,8 \pm 0,3$
S4	$-28,2 \pm 1,2$	$-27,0 \pm 1,4$	1,16	$6,7 \pm 0,5$
S5	$-28,0 \pm 1,2$	$-26,9 \pm 1,4$	1,07	$6,2 \pm 0,5$
S6	$-27,7 \pm 1,2$	$-27,8 \pm 1,5$	-0,20	$-1,1 \pm 0,1$
S7	$-27,6 \pm 0,8$	$-27,4 \pm 0,6$	0,24	$1,4 \pm 0,1$
S8	$-28,3 \pm 0,8$	$-26,4 \pm 0,6$	1,94	$11,6 \pm 0,4$
S9	$-27,6 \pm 1,2$	$-27,0 \pm 1,4$	0,58	$3,4 \pm 0,3$

Prilog 6. Nastavak

Uzorak	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (protein - med) (‰)	Sadržaj šećera C4 biljaka (%)
S10	$-26,4 \pm 1,2$	$-25,9 \pm 1,4$	0,43	$2,7 \pm 0,2$
<i>Brassica napus</i>				
R1	$-26,6 \pm 1,2$	$-26,7 \pm 1,4$	-0,10	$-0,6 \pm 0,1$
R2	$-28,5 \pm 1,3$	$-28,4 \pm 1,5$	0,14	$0,8 \pm 0,1$
R3	$-29,9 \pm 1,3$	$-28,4 \pm 1,5$	1,45	$7,7 \pm 0,6$
R4	$-28,4 \pm 1,2$	$-28,0 \pm 1,5$	0,32	$1,8 \pm 0,2$
R5	$-28,8 \pm 1,3$	$-27,2 \pm 1,4$	1,57	$9,0 \pm 0,6$
R6	$-28,2 \pm 1,2$	$-28,3 \pm 1,5$	-0,17	$-0,9 \pm 0,1$
R7	$-28,8 \pm 1,3$	$-28,4 \pm 1,5$	0,35	$1,8 \pm 0,2$
R8	$-29,1 \pm 1,3$	$-29,0 \pm 1,5$	0,14	$0,7 \pm 0,1$
R9	$-29,9 \pm 1,3$	$-28,7 \pm 1,5$	1,21	$6,4 \pm 0,4$
R10	$-29,0 \pm 1,3$	$-29,6 \pm 1,6$	-0,67	$-3,4 \pm 0,2$
<i>Honeydew</i>				
M1	$-28,3 \pm 1,3$	$-27,7 \pm 1,4$	0,55	$3,1 \pm 0,2$
M2	$-27,4 \pm 1,2$	$-25,1 \pm 1,3$	2,34	$15,2 \pm 1,0$
M3	$-27,2 \pm 1,2$	$-25,2 \pm 1,3$	2,05	$13,2 \pm 0,9$
M4	$-27,3 \pm 1,2$	$-24,1 \pm 1,3$	3,22	$22,3 \pm 1,5$
M5	$-27,3 \pm 0,8$	$-25,5 \pm 0,6$	1,83	$11,6 \pm 0,4$
M6	$-27,4 \pm 0,8$	n.i.	n.i.	n.k.
M7	$-26,0 \pm 0,7$	$-27,0 \pm 0,6$	-0,96	$-5,5 \pm 0,2$
M8	$-27,0 \pm 1,2$	$-26,5 \pm 1,4$	0,48	$2,8 \pm 0,2$
M9	$-26,1 \pm 1,0$	$-26,3 \pm 0,5$	-0,21	$-1,2 \pm 0,1$
M10	$-26,1 \pm 1,0$	$-26,7 \pm 0,5$	-0,63	$-3,7 \pm 0,2$
M11	$-26,8 \pm 1,0$	$-26,7 \pm 0,5$	0,04	$0,2 \pm 0,1$
M12	$-25,5 \pm 0,9$	$-25,8 \pm 0,5$	-0,28	$-1,7 \pm 0,1$
M13	$-26,3 \pm 1,0$	$-26,9 \pm 0,5$	-0,55	$-3,2 \pm 0,2$

Prilog 6. Nastavak

Uzorak	$\delta^{13}\text{C}$ Med (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ Protein (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (protein - med) (‰)	Sadržaj šećera - C4 biljaka (%)
M14	$-26,3 \pm 1,0$	$-26,5 \pm 0,5$	-0,19	$-1,1 \pm 0,1$
M15	$-25,9 \pm 1,0$	$-26,5 \pm 0,5$	-0,58	$-3,5 \pm 0,2$
M16	$-25,5 \pm 0,7$	$-25,1 \pm 0,6$	0,44	$2,8 \pm 0,1$
M17	$-26,5 \pm 0,7$	$-26,1 \pm 0,6$	0,46	$2,8 \pm 0,1$
M18	$-25,7 \pm 0,7$	$-25,3 \pm 0,6$	0,39	$2,4 \pm 0,1$
M19	$-25,9 \pm 1,2$	$-25,3 \pm 1,3$	0,61	$3,9 \pm 0,3$
M20	$-25,4 \pm 1,0$	$-25,4 \pm 1,3$	-0,05	$-0,3 \pm 0,1$
M21	$-26,3 \pm 1,0$	$-25,6 \pm 0,5$	0,71	$4,5 \pm 0,2$
M22	$-26,0 \pm 1,0$	$-25,6 \pm 0,5$	0,42	$2,8 \pm 0,2$
M23	$-25,9 \pm 1,0$	$-25,4 \pm 0,5$	0,43	$2,7 \pm 0,2$
M24	$-26,0 \pm 1,0$	$-25,8 \pm 0,5$	0,19	$1,1 \pm 0,1$
M25	$-26,0 \pm 1,0$	$-26,0 \pm 0,5$	0,07	$0,4 \pm 0,1$
M26	$-26,1 \pm 1,0$	$-26,0 \pm 0,5$	0,09	$0,5 \pm 0,1$

n.i. – nije izolovan, n.k. – nije kvantifikovan

Prilog 7. Sadržaj pojedinačnih pečera (g/100 g) – validacija metode

Uzorak	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza	Suma
CS 1	0,0057 ± 0,0003	0,022 ± 0,002	0,43 ± 0,02	1,01 ± 0,06	0,018 ± 0,003	0,60 ± 0,03	0,100 ± 0,004	2,2 ± 0,2
CS 1	0,0063 ± 0,0003	0,017 ± 0,002	0,43 ± 0,02	0,99 ± 0,06	0,017 ± 0,003	0,57 ± 0,02	0,105 ± 0,004	2,1 ± 0,2
CS 1	0,0065 ± 0,0003	0,023 ± 0,002	0,44 ± 0,02	1,07 ± 0,06	0,018 ± 0,003	0,62 ± 0,03	0,101 ± 0,004	2,3 ± 0,2
CS 1	0,0061 ± 0,0003	0,026 ± 0,002	0,45 ± 0,03	1,09 ± 0,06	0,019 ± 0,004	0,62 ± 0,03	0,104 ± 0,004	2,3 ± 0,2
CS 1	0,0063 ± 0,0003	0,025 ± 0,002	0,46 ± 0,03	1,12 ± 0,07	0,020 ± 0,004	0,65 ± 0,03	0,105 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 1	0,0063 ± 0,0003	0,023 ± 0,002	0,46 ± 0,02	1,13 ± 0,07	0,022 ± 0,004	0,63 ± 0,03	0,097 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 2	0,0064 ± 0,0003	0,024 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,10 ± 0,06	0,017 ± 0,003	0,64 ± 0,03	0,105 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 2	0,0061 ± 0,0003	0,026 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,08 ± 0,06	0,010 ± 0,002	0,65 ± 0,03	0,109 ± 0,004	2,3 ± 0,2
CS 2	0,0064 ± 0,0003	0,025 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,13 ± 0,07	0,020 ± 0,004	0,64 ± 0,03	0,104 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 2	0,0064 ± 0,0003	0,025 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,13 ± 0,07	0,022 ± 0,004	0,65 ± 0,03	0,100 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 2	0,0066 ± 0,0003	0,024 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,14 ± 0,07	0,021 ± 0,004	0,66 ± 0,03	0,101 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 2	0,0064 ± 0,0003	0,026 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,11 ± 0,07	0,022 ± 0,004	0,65 ± 0,03	0,099 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS 3	0,0068 ± 0,0003	0,025 ± 0,002	0,48 ± 0,03	1,21 ± 0,07	0,023 ± 0,004	0,66 ± 0,03	0,102 ± 0,004	2,5 ± 0,2
CS 3	0,0069 ± 0,0004	0,026 ± 0,002	0,49 ± 0,03	1,21 ± 0,07	0,025 ± 0,005	0,67 ± 0,03	0,092 ± 0,004	2,5 ± 0,2
CS 3	0,0067 ± 0,0003	0,025 ± 0,002	0,49 ± 0,03	1,19 ± 0,07	0,026 ± 0,005	0,66 ± 0,03	0,095 ± 0,004	2,5 ± 0,2
CS 3	0,0070 ± 0,0004	0,027 ± 0,002	0,49 ± 0,03	1,22 ± 0,07	0,026 ± 0,005	0,66 ± 0,03	0,098 ± 0,004	2,5 ± 0,2
CS 3	0,0068 ± 0,0003	0,026 ± 0,002	0,49 ± 0,03	1,20 ± 0,07	0,024 ± 0,004	0,67 ± 0,03	0,101 ± 0,004	2,5 ± 0,2
CS 3	0,0070 ± 0,0004	0,026 ± 0,002	0,50 ± 0,03	1,19 ± 0,07	0,021 ± 0,004	0,67 ± 0,03	0,098 ± 0,004	2,5 ± 0,2
$\bar{x}$	0,0065 ± 0,0003	0,025 ± 0,002	0,47 ± 0,03	1,13 ± 0,07	0,021 ± 0,004	0,64 ± 0,03	0,101 ± 0,004	2,4 ± 0,2
CS S 75%	0,0116 ± 0,0006	0,043 ± 0,004	0,80 ± 0,04	1,93 ± 0,11	0,033 ± 0,006	1,13 ± 0,05	0,114 ± 0,005	4,1 ± 0,3
CS S 75%	0,0115 ± 0,0006	0,044 ± 0,004	0,82 ± 0,04	2,00 ± 0,12	0,041 ± 0,007	1,13 ± 0,05	0,113 ± 0,005	4,2 ± 0,3
CS S 75%	0,0115 ± 0,0006	0,041 ± 0,004	0,82 ± 0,04	1,98 ± 0,12	0,033 ± 0,005	1,12 ± 0,05	0,122 ± 0,005	4,1 ± 0,3
CS S 75%	0,0116 ± 0,0006	0,043 ± 0,004	0,83 ± 0,04	2,00 ± 0,12	0,040 ± 0,007	1,13 ± 0,05	0,124 ± 0,005	4,2 ± 0,3
CS S 75%	0,0112 ± 0,0006	0,043 ± 0,004	0,83 ± 0,04	1,99 ± 0,12	0,034 ± 0,006	1,12 ± 0,05	0,117 ± 0,005	4,1 ± 0,3
CS S 75%	0,0106 ± 0,0006	0,042 ± 0,004	0,83 ± 0,04	1,95 ± 0,11	0,034 ± 0,006	1,13 ± 0,05	0,125 ± 0,005	4,1 ± 0,3
$\bar{x}$	0,0113 ± 0,0006	0,043 ± 0,004	0,82 ± 0,04	1,97 ± 0,12	0,036 ± 0,006	1,12 ± 0,05	0,119 ± 0,005	4,1 ± 0,3

Prilog 7. Nastavak

Uzorak	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza	Suma
CS S 100%	0,0130 ± 0,0007	0,050 ± 0,005	0,94 ± 0,04	2,20 ± 0,13	0,045 ± 0,007	1,29 ± 0,05	0,150 ± 0,006	4,7 ± 0,4
CS S 100%	0,0127 ± 0,0006	0,045 ± 0,004	0,94 ± 0,04	2,26 ± 0,13	0,045 ± 0,007	1,30 ± 0,05	0,147 ± 0,006	4,8 ± 0,4
CS S 100%	0,0132 ± 0,0007	0,052 ± 0,005	0,93 ± 0,04	2,28 ± 0,13	0,032 ± 0,005	1,29 ± 0,05	0,143 ± 0,006	4,7 ± 0,4
CS S 100%	0,0129 ± 0,0007	0,049 ± 0,004	0,94 ± 0,04	2,25 ± 0,13	0,042 ± 0,007	1,27 ± 0,05	0,149 ± 0,006	4,7 ± 0,4
CS S 100%	0,0131 ± 0,0007	0,050 ± 0,005	0,94 ± 0,04	2,26 ± 0,13	0,043 ± 0,007	1,28 ± 0,05	0,140 ± 0,006	4,7 ± 0,4
CS S 100%	0,0129 ± 0,0007	0,051 ± 0,005	0,94 ± 0,04	2,26 ± 0,13	0,043 ± 0,007	1,28 ± 0,05	0,143 ± 0,006	4,7 ± 0,4
$\bar{x}$	0,0130 ± 0,0007	0,049 ± 0,004	0,94 ± 0,04	2,26 ± 0,13	0,042 ± 0,007	1,28 ± 0,05	0,146 ± 0,006	4,7 ± 0,4
CS S 125%	0,0163 ± 0,0008	0,061 ± 0,006	1,13 ± 0,05	2,67 ± 0,16	0,042 ± 0,007	1,53 ± 0,06	0,184 ± 0,008	5,6 ± 0,4
CS S 125%	0,0155 ± 0,0008	0,061 ± 0,005	1,13 ± 0,05	2,69 ± 0,16	0,051 ± 0,009	1,54 ± 0,06	0,186 ± 0,008	5,7 ± 0,4
CS S 125%	0,0153 ± 0,0008	0,061 ± 0,006	1,12 ± 0,05	2,69 ± 0,16	0,050 ± 0,008	1,54 ± 0,06	0,187 ± 0,008	5,7 ± 0,4
CS S 125%	0,0158 ± 0,0008	0,060 ± 0,005	1,12 ± 0,05	2,74 ± 0,16	0,050 ± 0,008	1,55 ± 0,06	0,184 ± 0,008	5,7 ± 0,5
CS S 125%	0,0158 ± 0,0008	0,058 ± 0,005	1,13 ± 0,05	2,77 ± 0,16	0,051 ± 0,009	1,55 ± 0,07	0,183 ± 0,007	5,8 ± 0,5
CS S 125%	0,0157 ± 0,0008	0,053 ± 0,005	1,14 ± 0,05	2,72 ± 0,16	0,053 ± 0,009	1,56 ± 0,07	0,196 ± 0,008	5,7 ± 0,5
$\bar{x}$	0,0157 ± 0,0008	0,059 ± 0,005	1,13 ± 0,05	2,72 ± 0,16	0,050 ± 0,008	1,55 ± 0,06	0,187 ± 0,008	5,7 ± 0,4

CS – zbirni uzorak (eng. Collective Sample, CS), S – procenat obogaćivanja uzorka

Prilog 8. Sadržaj šećera (g/100 g) ispitivanih uzoraka meda

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
<i>Robinia pseudoacacia</i>									
B1	26,5 ± 2,8	42,1 ± 4,3	0,0033 ± 0,0001	0,018 ± 0,002	0,50 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,70 ± 0,03	0,27 ± 0,01
B2	27,4 ± 2,9	42,7 ± 4,3	0,0018 ± 0,0001	0,016 ± 0,001	0,48 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,003 ± 0,001	0,55 ± 0,02	0,14 ± 0,01
B3	26,5 ± 2,8	41,4 ± 4,2	0,0017 ± 0,0001	0,006 ± 0,001	0,32 ± 0,01	0,48 ± 0,03	0,0003 ± 0,001	0,53 ± 0,02	0,14 ± 0,01
B4	27,9 ± 3,0	42,8 ± 4,4	0,0014 ± 0,0001	0,016 ± 0,001	0,50 ± 0,02	0,62 ± 0,04	0,011 ± 0,002	0,64 ± 0,03	0,19 ± 0,01
B5	27,1 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,0028 ± 0,0001	0,020 ± 0,002	0,54 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,015 ± 0,003	0,68 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B6	26,4 ± 2,8	41,7 ± 4,2	0,0027 ± 0,0001	0,017 ± 0,001	0,48 ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,013 ± 0,002	0,62 ± 0,03	0,21 ± 0,01
B7	26,4 ± 2,8	42,1 ± 4,3	0,0082 ± 0,0004	0,018 ± 0,002	0,48 ± 0,02	0,68 ± 0,04	0,013 ± 0,002	0,67 ± 0,03	0,22 ± 0,01
B8	26,2 ± 2,8	41,3 ± 4,2	0,0005 ± 0,0001	0,016 ± 0,001	0,49 ± 0,02	0,72 ± 0,04	0,013 ± 0,002	0,71 ± 0,03	0,26 ± 0,01
B9	27,5 ± 2,9	42,7 ± 4,3	0,0026 ± 0,0001	0,017 ± 0,002	0,49 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,015 ± 0,003	0,72 ± 0,03	0,28 ± 0,01
B10	25,2 ± 2,7	41,1 ± 4,2	0,0037 ± 0,0002	0,012 ± 0,001	0,46 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,011 ± 0,002	0,82 ± 0,03	0,31 ± 0,01
B11	26,6 ± 2,8	42,1 ± 4,3	0,0059 ± 0,0003	0,014 ± 0,001	0,44 ± 0,02	0,64 ± 0,04	0,011 ± 0,002	0,77 ± 0,03	0,26 ± 0,01
B12	26,5 ± 2,8	41,3 ± 4,2	0,0017 ± 0,0001	0,014 ± 0,001	0,49 ± 0,02	0,76 ± 0,04	0,012 ± 0,002	0,74 ± 0,03	0,33 ± 0,01
B13	26,3 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,0014 ± 0,0001	0,017 ± 0,002	0,54 ± 0,02	0,74 ± 0,04	0,013 ± 0,002	0,58 ± 0,02	0,22 ± 0,01
B14	26,4 ± 2,8	42,7 ± 4,3	0,0046 ± 0,0001	0,014 ± 0,001	0,47 ± 0,02	0,66 ± 0,04	0,009 ± 0,002	0,68 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B15	26,2 ± 2,8	41,9 ± 4,3	0,0014 ± 0,0001	0,018 ± 0,002	0,55 ± 0,03	0,79 ± 0,05	0,014 ± 0,002	0,74 ± 0,03	0,37 ± 0,02
B16	27,6 ± 2,9	42,4 ± 4,3	0,0017 ± 0,0001	0,016 ± 0,001	0,52 ± 0,02	0,76 ± 0,04	0,012 ± 0,002	0,74 ± 0,03	0,36 ± 0,01
B17	26,4 ± 2,8	42,7 ± 4,3	0,0017 ± 0,0001	0,023 ± 0,002	0,59 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,014 ± 0,002	0,80 ± 0,03	0,44 ± 0,02
B18	27,9 ± 3,0	43,0 ± 4,4	0,0030 ± 0,0002	0,014 ± 0,001	0,46 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,011 ± 0,002	0,90 ± 0,04	0,47 ± 0,02
B19	26,8 ± 2,9	42,1 ± 4,3	0,0031 ± 0,0002	0,010 ± 0,001	0,45 ± 0,02	0,68 ± 0,04	0,006 ± 0,001	0,67 ± 0,03	0,30 ± 0,01
B20	26,2 ± 2,8	41,3 ± 4,2	0,0016 ± 0,0001	0,011 ± 0,001	0,46 ± 0,02	0,66 ± 0,04	0,008 ± 0,001	0,68 ± 0,03	0,27 ± 0,01
B21	26,7 ± 2,9	41,7 ± 4,2	0,0016 ± 0,0001	0,016 ± 0,001	0,48 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,008 ± 0,001	0,79 ± 0,03	0,30 ± 0,01
B22	26,5 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,0061 ± 0,0003	0,015 ± 0,001	0,49 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,77 ± 0,03	0,27 ± 0,01
B23	26,2 ± 2,8	42,2 ± 4,3	0,0106 ± 0,0005	0,017 ± 0,002	0,48 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,0100 ± 0,002	0,63 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B24	25,8 ± 2,8	41,7 ± 4,2	0,0023 ± 0,0001	0,015 ± 0,001	0,48 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,011 ± 0,002	0,69 ± 0,03	0,27 ± 0,01
B25	26,5 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,0054 ± 0,0003	0,010 ± 0,001	0,41 ± 0,02	0,63 ± 0,04	0,0030 ± 0,0004	0,81 ± 0,03	0,29 ± 0,01

Prilog 8. Nastavak

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
B26	27,4 ± 2,9	42,6 ± 4,3	0,0030 ± 0,0002	0,013 ± 0,001	0,45 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,009 ± 0,001	0,79 ± 0,03	0,30 ± 0,01
B27	26,6 ± 2,8	42,4 ± 4,3	0,0053 ± 0,0003	0,014 ± 0,001	0,43 ± 0,02	0,63 ± 0,04	0,009 ± 0,002	0,78 ± 0,03	0,28 ± 0,01
B28	27,7 ± 3,0	42,8 ± 4,4	0,0023 ± 0,0001	0,015 ± 0,001	0,48 ± 0,02	0,74 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,90 ± 0,04	0,39 ± 0,02
B29	26,8 ± 2,9	42,3 ± 4,3	0,0014 ± 0,0001	0,017 ± 0,002	0,46 ± 0,02	0,73 ± 0,04	0,011 ± 0,002	0,78 ± 0,03	0,31 ± 0,01
B30	25,8 ± 2,7	42,4 ± 4,3	0,0009 ± 0,0001	0,013 ± 0,001	0,48 ± 0,02	0,74 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,85 ± 0,04	0,33 ± 0,01
B31	26,5 ± 2,8	42,7 ± 4,3	0,0014 ± 0,0001	0,017 ± 0,002	0,05 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,017 ± 0,003	0,73 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B32	26,8 ± 2,9	41,9 ± 4,3	0,0032 ± 0,0002	0,013 ± 0,001	0,43 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,013 ± 0,002	0,75 ± 0,03	0,23 ± 0,01
B33	26,8 ± 2,9	42,6 ± 4,3	0,0030 ± 0,0002	0,008 ± 0,001	0,33 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,009 ± 0,001	0,74 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B34	26,8 ± 2,9	41,7 ± 4,2	0,0028 ± 0,0001	0,006 ± 0,001	0,27 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,005 ± 0,001	0,87 ± 0,04	0,26 ± 0,01
B35	26,8 ± 2,9	42,0 ± 4,3	0,0017 ± 0,0001	0,015 ± 0,001	0,45 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,013 ± 0,002	0,73 ± 0,03	0,21 ± 0,01
B36	26,6 ± 2,8	42,6 ± 4,3	0,0020 ± 0,0001	0,006 ± 0,001	0,35 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,007 ± 0,001	0,79 ± 0,03	0,24 ± 0,01
B37	27,2 ± 2,9	42,9 ± 4,4	0,0019 ± 0,0001	0,012 ± 0,001	0,43 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,72 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B38	25,9 ± 2,8	41,8 ± 4,2	0,0020 ± 0,0001	0,011 ± 0,001	0,44 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,62 ± 0,03	0,26 ± 0,01
B39	25,7 ± 2,7	41,7 ± 4,2	0,0029 ± 0,0001	0,021 ± 0,002	0,55 ± 0,03	0,89 ± 0,05	0,011 ± 0,002	0,82 ± 0,03	0,49 ± 0,02
B40	26,3 ± 2,8	41,8 ± 4,2	0,0033 ± 0,0002	0,011 ± 0,001	0,40 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,007 ± 0,001	0,70 ± 0,03	0,35 ± 0,01
B41	28,3 ± 3,0	43,2 ± 4,4	0,0105 ± 0,0005	0,020 ± 0,002	0,56 ± 0,03	0,88 ± 0,05	0,022 ± 0,004	0,82 ± 0,03	0,44 ± 0,02
B42	26,7 ± 2,8	42,4 ± 4,3	0,0037 ± 0,0002	0,014 ± 0,001	0,44 ± 0,02	0,73 ± 0,04	0,015 ± 0,003	0,73 ± 0,03	0,37 ± 0,01
B43	27,0 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,0016 ± 0,0001	0,017 ± 0,002	0,50 ± 0,02	0,83 ± 0,05	0,017 ± 0,003	0,84 ± 0,04	0,44 ± 0,02
B44	27,3 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,0047 ± 0,0002	0,014 ± 0,001	0,43 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,012 ± 0,002	0,64 ± 0,03	0,34 ± 0,01
B45	26,9 ± 2,9	41,9 ± 4,3	0,0047 ± 0,0002	0,016 ± 0,001	0,50 ± 0,02	0,77 ± 0,05	0,010 ± 0,002	0,72 ± 0,03	0,29 ± 0,01
B46	27,5 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,0045 ± 0,0002	0,016 ± 0,001	0,50 ± 0,02	0,78 ± 0,05	0,016 ± 0,003	0,72 ± 0,03	0,33 ± 0,01
B47	26,5 ± 2,8	41,8 ± 4,2	0,0015 ± 0,0001	0,018 ± 0,002	0,48 ± 0,02	0,83 ± 0,05	0,016 ± 0,003	0,81 ± 0,03	0,41 ± 0,02
B48	26,7 ± 2,8	42,8 ± 4,3	0,0063 ± 0,0003	0,018 ± 0,002	0,46 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,016 ± 0,003	0,66 ± 0,03	0,26 ± 0,01
B49	26,4 ± 2,8	42,6 ± 4,3	0,0052 ± 0,0003	0,020 ± 0,002	0,55 ± 0,03	0,82 ± 0,05	0,018 ± 0,003	0,81 ± 0,03	0,56 ± 0,02
B50	26,8 ± 2,9	42,0 ± 4,3	0,0023 ± 0,0001	0,017 ± 0,001	0,44 ± 0,02	0,74 ± 0,04	0,016 ± 0,003	0,78 ± 0,03	0,45 ± 0,02
B51	26,8 ± 2,9	42,5 ± 4,3	0,0019 ± 0,0001	0,021 ± 0,002	0,53 ± 0,02	0,81 ± 0,05	0,020 ± 0,003	0,72 ± 0,03	0,30 ± 0,01
B52	26,1 ± 2,8	41,6 ± 4,2	0,0020 ± 0,0001	0,018 ± 0,002	0,52 ± 0,02	0,82 ± 0,05	0,015 ± 0,003	0,75 ± 0,03	0,35 ± 0,01

Prilog 8. Nastavak

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
B53	26,8 ± 2,9	42,8 ± 4,3	0,0025 ± 0,0001	0,012 ± 0,001	0,41 ± 0,02	0,68 ± 0,04	0,010 ± 0,002	0,66 ± 0,03	0,25 ± 0,01
B54	26,8 ± 2,9	42,4 ± 4,3	0,0121 ± 0,0006	0,018 ± 0,002	0,51 ± 0,02	0,75 ± 0,04	0,016 ± 0,003	0,63 ± 0,03	0,32 ± 0,01
B55	26,4 ± 2,8	42,6 ± 4,3	0,0010 ± 0,0001	0,016 ± 0,001	0,50 ± 0,02	0,76 ± 0,04	0,015 ± 0,002	0,69 ± 0,03	0,38 ± 0,02
B56	27,2 ± 2,9	42,9 ± 4,4	0,0016 ± 0,0001	0,019 ± 0,002	0,53 ± 0,02	0,81 ± 0,05	0,016 ± 0,003	0,71 ± 0,03	0,34 ± 0,01,
B57	26,8 ± 2,9	41,8 ± 4,2	0,0030 ± 0,0002	0,019 ± 0,002	0,54 ± 0,02	0,77 ± 0,05	0,018 ± 0,003	0,62 ± 0,03	0,37 ± 0,02
B58	27,1 ± 2,9	42,8 ± 4,3	0,0031 ± 0,0002	0,019 ± 0,002	0,51 ± 0,02	0,81 ± 0,05	0,014 ± 0,002	0,72 ± 0,03	0,33 ± 0,01
B59	27,5 ± 2,9	42,6 ± 4,3	0,0019 ± 0,0001	0,019 ± 0,002	0,52 ± 0,02	0,84 ± 0,05	0,017 ± 0,003	0,83 ± 0,03	0,38 ± 0,02
B60	26,4 ± 2,8	40,9 ± 4,2	0,0075 ± 0,0004	0,021 ± 0,002	0,51 ± 0,02	0,81 ± 0,05	0,024 ± 0,004	0,72 ± 0,03	0,46 ± 0,02
B61	29,1 ± 3,1	40,2 ± 4,1	0,0041 ± 0,0002	0,013 ± 0,001	0,46 ± 0,04	0,70 ± 0,04	0,015 ± 0,002	0,43 ± 0,02	0,20 ± 0,01
B62	30,4 ± 3,2	40,1 ± 4,1	0,0012 ± 0,0001	0,007 ± 0,001	0,30 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,015 ± 0,002	0,87 ± 0,04	0,72 ± 0,03
B63	27,9 ± 3,0	39,1 ± 4,0	0,023 ± 0,002	0,0010 ± 0,0001	0,08 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,0005 ± 0,0001	0,69 ± 0,03	0,40 ± 0,02
B64	33,3 ± 3,6	34,3 ± 3,5	0,0033 ± 0,0002	0,011 ± 0,001	0,41 ± 0,03	0,68 ± 0,04	0,017 ± 0,003	0,73 ± 0,03	0,33 ± 0,01
B65	32,0 ± 3,4	38,3 ± 3,9	0,027 ± 0,002	0,020 ± 0,002	0,53 ± 0,04	0,77 ± 0,05	0,023 ± 0,004	0,65 ± 0,03	0,43 ± 0,02
B66	30,5 ± 3,3	37,5 ± 3,8	0,020 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,35 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,013 ± 0,002	0,69 ± 0,03	0,54 ± 0,02
B67	28,8 ± 3,1	38,1 ± 3,9	0,0002 ± 0,0001	0,0026 ± 0,0002	0,02 ± 0,01	0,025 ± 0,001	0,0007 ± 0,0001	1,04 ± 0,04	0,0102 ± 0,0004
B68	31,5 ± 3,4	40,7 ± 4,1	0,0034 ± 0,0002	0,012 ± 0,001	0,42 ± 0,03	0,68 ± 0,04	0,022 ± 0,004	0,87 ± 0,04	0,43 ± 0,02
B69	30,6 ± 3,3	38,2 ± 3,9	0,0015 ± 0,0001	0,0032 ± 0,0003	0,16 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,011 ± 0,002	1,24 ± 0,05	0,33 ± 0,01
B70	35,7 ± 3,8	39,1 ± 4,0	0,0032 ± 0,0002	0,0038 ± 0,0003	0,25 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,010 ± 0,002	0,37 ± 0,02	0,35 ± 0,01
B71	32,3 ± 3,4	40,2 ± 4,1	0,0035 ± 0,0002	0,012 ± 0,001	0,36 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,018 ± 0,003	0,62 ± 0,03	0,47 ± 0,02
B72	29,4 ± 3,1	39,1 ± 4,0	0,0012 ± 0,0001	0,006 ± 0,001	0,39 ± 0,03	0,70 ± 0,04	0,008 ± 0,001	1,04 ± 0,04	0,63 ± 0,03
B73	34,8 ± 3,7	40,3 ± 4,1	0,0002 ± 0,0001	0,0045 ± 0,0004	0,27 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,013 ± 0,002	0,94 ± 0,04	0,54 ± 0,02
B74	35,3 ± 3,8	37,4 ± 3,8	0,0033 ± 0,0002	0,029 ± 0,003	0,66 ± 0,05	0,83 ± 0,05	0,030 ± 0,005	0,46 ± 0,02	0,54 ± 0,02
<i>Tilia cordata</i>									
L1	31,5 ± 3,4	37,2 ± 3,8	0,009 ± 0,001	0,014 ± 0,001	1,45 ± 0,11	0,45 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,054 ± 0,002
L2	29,9 ± 3,2	35,4 ± 3,6	0,036 ± 0,002	0,001 ± 0,001	1,06 ± 0,08	0,32 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,055 ± 0,002
L3	29,2 ± 3,1	38,5 ± 3,6	0,014 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,017 ± 0,003	0,42 ± 0,02	0,058 ± 0,002
L4	34,3 ± 3,7	40,5 ± 4,1	0,014 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,008 ± 0,001	0,44 ± 0,02	0,030 ± 0,001

Prilog 8. Nastavak

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
L5	27,3 ± 2,9	37,6 ± 3,8	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,021 ± 0,003	0,32 ± 0,01	0,049 ± 0,002
L6	35,6 ± 3,8	36,8 ± 3,7	0,010 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,000 ± 0,000	0,42 ± 0,02	0,021 ± 0,001
L7	31,2 ± 3,3	36,4 ± 3,7	0,007 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,013 ± 0,002	0,35 ± 0,01	0,032 ± 0,001
L8	30,6 ± 3,3	34,9 ± 3,5	0,021 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,000 ± 0,000	0,54 ± 0,02	0,061 ± 0,002
L9	28,1 ± 3,0	36,8 ± 3,7	0,024 ± 0,001	0,037 ± 0,003	0,64 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,012 ± 0,002	0,19 ± 0,01	0,048 ± 0,002
L10	33,1 ± 3,5	34,5 ± 3,5	0,028 ± 0,001	0,020 ± 0,002	0,61 ± 0,05	0,43 ± 0,03	0,010 ± 0,002	0,56 ± 0,02	0,035 ± 0,001
L11	35,6 ± 3,8	39,7 ± 4,0	0,070 ± 0,004	0,005 ± 0,001	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,021 ± 0,004	0,41 ± 0,02	0,121 ± 0,005
L12	32,1 ± 3,4	38,3 ± 3,9	0,042 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,42 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,018 ± 0,003	0,19 ± 0,01	0,066 ± 0,003
L13	33,9 ± 3,6	37,1 ± 3,8	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,50 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,019 ± 0,003	0,54 ± 0,02	0,091 ± 0,004
L14	29,6 ± 3,2	39,5 ± 4,0	0,026 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,45 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,016 ± 0,003	0,20 ± 0,01	0,096 ± 0,004
L15	30,1 ± 3,2	35,0 ± 3,6	0,018 ± 0,001	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,003 ± 0,001	1,48 ± 0,06	0,006 ± 0,001
L16	32,7 ± 3,5	39,2 ± 4,0	0,027 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,004 ± 0,001	0,61 ± 0,03	0,013 ± 0,001
L17	33,4 ± 3,6	36,0 ± 3,7	0,015 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,47 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,020 ± 0,003	0,21 ± 0,01	0,084 ± 0,003
L18	33,9 ± 3,6	35,9 ± 3,6	0,070 ± 0,004	0,012 ± 0,001	0,50 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0,027 ± 0,004	0,20 ± 0,01	0,075 ± 0,003
<i>Helianthus annuus</i>									
S1	30,6 ± 3,3	36,0 ± 3,7	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,22 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,003 ± 0,001	0,31 ± 0,01	0,041 ± 0,002
S2	33,8 ± 3,6	35,5 ± 3,6	0,013 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,014 ± 0,002	0,33 ± 0,01	0,055 ± 0,002
S3	31,4 ± 3,4	39,1 ± 4,0	0,022 ± 0,001	0,006 ± 0,001	1,27 ± 0,10	0,26 ± 0,02	0,006 ± 0,001	0,33 ± 0,01	0,075 ± 0,003
S4	36,1 ± 3,9	39,7 ± 4,0	0,012 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,002 ± 0,001	0,04 ± 0,02	0,079 ± 0,003
S5	38,7 ± 3,4	40,2 ± 4,1	0,012 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,000 ± 0,000	0,30 ± 0,01	0,082 ± 0,003
S6	31,4 ± 3,3	39,4 ± 4,0	0,013 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,001 ± 0,001	0,36 ± 0,01	0,087 ± 0,004
S7	34,3 ± 3,7	36,1 ± 3,7	0,015 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,001 ± 0,001	0,33 ± 0,01	0,13 ± 0,01
S8	32,6 ± 3,5	35,4 ± 3,6	0,020 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,000 ± 0,000	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01
S9	37,2 ± 4,0	38,2 ± 3,9	0,010 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,38 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,003 ± 0,001	0,22 ± 0,01	0,109 ± 0,004
S10	30,4 ± 3,2	36,4 ± 3,7	0,009 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,012 ± 0,001	0,21 ± 0,01	0,090 ± 0,004
<i>Brassica napus</i>									
R1	30,8 ± 3,3	35,3 ± 3,6	0,002 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,73 ± 0,06	0,33 ± 0,02	0,010 ± 0,002	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01

Prilog 8. Nastavak

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
R2	33,3 ± 3,6	34,0 ± 3,5	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,002 ± 0,001	0,18 ± 0,01	0,072 ± 0,003
R3	39,0 ± 4,2	39,2 ± 4,0	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,001 ± 0,001	0,19 ± 0,01	0,114 ± 0,005
R4	38,8 ± 4,1	39,6 ± 4,0	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,002 ± 0,001	0,73 ± 0,03	0,14 ± 0,01
R5	34,7 ± 3,7	35,1 ± 3,6	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,000 ± 0,000	0,20 ± 0,01	0,069 ± 0,003
R6	36,3 ± 3,9	36,8 ± 3,7	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,017 ± 0,003	0,21 ± 0,01	0,084 ± 0,003
R7	32,9 ± 3,5	35,0 ± 3,6	0,001 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,011 ± 0,002	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
R8	37,4 ± 4,0	38,0 ± 3,9	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,002 ± 0,001	0,19 ± 0,01	0,14 ± 0,01
R9	31,5 ± 3,4	33,8 ± 3,4	0,000 ± 0,000	0,007 ± 0,001	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,011 ± 0,002	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
R10	30,1 ± 3,2	32,9 ± 3,3	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,010 ± 0,002	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01
<i>Honeydew</i>									
M1	25,8 ± 2,7	32,7 ± 3,3	0,17 ± 0,01	0,024 ± 0,002	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,077 ± 0,003
M2	25,8 ± 2,7	33,2 ± 3,4	0,067 ± 0,003	0,020 ± 0,002	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,026 ± 0,004	0,38 ± 0,02	0,046 ± 0,002
M3	22,8 ± 2,4	35,2 ± 3,6	0,023 ± 0,001	0,023 ± 0,002	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,024 ± 0,004	0,26 ± 0,01	0,070 ± 0,003
M4	20,6 ± 2,2	29,1 ± 3,0	0,078 ± 0,004	0,07 ± 0,01	1,44 ± 0,11	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,105 ± 0,004
M5	25,3 ± 2,7	34,5 ± 3,5	0,007 ± 0,001	0,037 ± 0,003	0,83 ± 0,06	0,37 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,065 ± 0,003
M6	18,9 ± 2,0	19,8 ± 2,0	0,004 ± 0,001	0,10 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,0004 ± 0,0001	1,53 ± 0,06	0,015 ± 0,001
M7	22,4 ± 2,4	32,4 ± 3,3	0,022 ± 0,001	0,13 ± 0,01	1,24 ± 0,10	0,48 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,042 ± 0,002
M8	26,2 ± 2,8	31,8 ± 3,2	0,33 ± 0,02	0,040 ± 0,004	0,93 ± 0,07	0,42 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,059 ± 0,002
M9	26,5 ± 2,8	36,5 ± 3,7	0,32 ± 0,02	0,015 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,86 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,24 ± 0,01	0,039 ± 0,002
M10	27,0 ± 2,9	34,7 ± 3,5	0,22 ± 0,01	0,018 ± 0,002	0,07 ± 0,01	0,72 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,028 ± 0,001
M11	22,4 ± 2,4	30,5 ± 3,1	0,57 ± 0,03	0,010 ± 0,001	0,00 ± 0,00	1,21 ± 0,07	0,25 ± 0,04	0,23 ± 0,01	0,037 ± 0,002
M12	25,4 ± 2,7	33,7 ± 3,4	0,28 ± 0,01	0,019 ± 0,002	0,05 ± 0,01	0,88 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,058 ± 0,002
M13	24,9 ± 2,7	36,9 ± 3,8	0,51 ± 0,03	0,006 ± 0,001	0,06 ± 0,01	1,19 ± 0,07	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,01	0,027 ± 0,001
M14	30,0 ± 3,2	40,0 ± 4,1	0,72 ± 0,04	0,012 ± 0,001	0,00 ± 0,00	1,21 ± 0,07	0,32 ± 0,05	0,77 ± 0,03	0,047 ± 0,002
M15	25,8 ± 2,8	35,2 ± 3,6	0,66 ± 0,03	0,013 ± 0,001	0,05 ± 0,01	0,72 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,047 ± 0,002
M16	28,5 ± 3,0	38,0 ± 3,9	0,32 ± 0,02	0,020 ± 0,002	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,06	0,34 ± 0,06	0,74 ± 0,03	0,049 ± 0,002
M17	26,4 ± 2,8	34,8 ± 3,5	0,37 ± 0,02	0,009 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,97 ± 0,06	0,26 ± 0,04	0,74 ± 0,03	0,064 ± 0,003

Prilog 8. Nastavak

Uzorak	Glukoza	Fruktoza	Trehaloza	Melibioza	Saharoza	Izomaltoza	Rafinoza	Maltoza	Erloza
M18	24,9 ± 2,7	36,0 ± 3,7	0,61 ± 0,03	0,012 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,96 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,035 ± 0,001
M19	24,5 ± 2,6	29,6 ± 3,0	0,13 ± 0,01	0,006 ± 0,001	0,14 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,043 ± 0,002
M20	32,3 ± 3,4	40,0 ± 4,1	0,11 ± 0,01	0,015 ± 0,001	0,06 ± 0,01	0,97 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,67 ± 0,03	0,037 ± 0,002
M21	24,3 ± 2,6	31,5 ± 3,2	0,38 ± 0,02	0,013 ± 0,001	0,24 ± 0,02	0,93 ± 0,05	0,37 ± 0,06	0,82 ± 0,03	0,031 ± 0,001
M22	19,3 ± 2,1	29,8 ± 3,0	0,57 ± 0,03	0,013 ± 0,001	1,51 ± 0,12	0,93 ± 0,06	0,35 ± 0,06	0,63 ± 0,03	0,025 ± 0,001
M23	20,8 ± 2,2	36,5 ± 3,7	0,19 ± 0,01	0,008 ± 0,001	1,42 ± 0,11	0,85 ± 0,05	0,45 ± 0,07	0,85 ± 0,04	0,039 ± 0,002
M24	22,0 ± 2,3	33,7 ± 3,4	0,45 ± 0,02	0,011 ± 0,001	0,17 ± 0,01	0,88 ± 0,05	0,42 ± 0,07	0,79 ± 0,03	0,030 ± 0,001
M25	23,7 ± 2,5	34,6 ± 3,5	0,41 ± 0,02	0,011 ± 0,001	0,16 ± 0,01	0,85 ± 0,05	0,39 ± 0,07	0,61 ± 0,03	0,032 ± 0,001
M26	26,6 ± 2,8	37,5 ± 3,8	0,40 ± 0,02	0,009 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,72 ± 0,04	0,34 ± 0,06	0,66 ± 0,03	0,038 ± 0,002

Prilog 9. Sadržaj pojedinačnih organskih kiselina (mg/kg) – validacija metode

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina	Ukupne kiseline
CS 1	1830 ± 100	350 ± 30	3,8 ± 0,4	4,4 ± 0,7	43 ± 2	43 ± 6	12 ± 3	78 ± 2	n.d.	2360 ± 140
CS 1	1760 ± 100	370 ± 30	4,6 ± 0,5	4,1 ± 0,6	43 ± 2	41 ± 5	12 ± 3	77 ± 2	n.d.	2310 ± 130
CS 1	1880 ± 110	380 ± 30	4,6 ± 0,5	4,0 ± 0,6	42 ± 2	38 ± 5	9 ± 2	76 ± 2	n.d.	2430 ± 140
CS 1	1670 ± 100	370 ± 30	5,3 ± 0,6	4,6 ± 0,7	43 ± 2	35 ± 5	11 ± 2	75 ± 2	n.d.	2220 ± 130
CS 1	1750 ± 100	370 ± 30	4,8 ± 0,5	3,1 ± 0,5	42 ± 2	34 ± 5	11 ± 2	76 ± 2	n.d.	2300 ± 130
CS 1	1710 ± 100	390 ± 30	4,9 ± 0,5	4,0 ± 0,6	44 ± 2	35 ± 5	10 ± 2	75 ± 2	n.d.	2270 ± 130
CS 2	1920 ± 110	390 ± 30	3,8 ± 0,4	4,1 ± 0,6	43 ± 2	37 ± 5	10 ± 2	73 ± 2	n.d.	2480 ± 140
CS 2	1870 ± 110	350 ± 30	4,7 ± 0,5	3,6 ± 0,6	44 ± 2	36 ± 5	12 ± 3	75 ± 2	n.d.	2390 ± 140
CS 2	1890 ± 110	370 ± 30	4,9 ± 0,5	4,5 ± 0,7	43 ± 2	35 ± 5	11 ± 3	75 ± 2	n.d.	2440 ± 140
CS 2	1980 ± 110	370 ± 30	4,9 ± 0,5	4,3 ± 0,7	42 ± 2	34 ± 5	11 ± 2	75 ± 2	n.d.	2520 ± 140
CS 2	1980 ± 110	390 ± 30	5,1 ± 0,5	4,4 ± 0,7	42 ± 2	34 ± 5	11 ± 3	76 ± 2	n.d.	2540 ± 150
CS 3	1850 ± 100	440 ± 30	4,2 ± 0,4	3,8 ± 0,6	45 ± 2	55 ± 8	20 ± 4	77 ± 2	n.d.	2490 ± 140
CS 3	1960 ± 110	440 ± 30	4,5 ± 0,5	2,9 ± 0,5	45 ± 2	41 ± 6	11 ± 3	77 ± 2	n.d.	2580 ± 150
CS 3	2020 ± 110	420 ± 30	4,9 ± 0,5	5,3 ± 0,8	47 ± 2	40 ± 6	12 ± 3	77 ± 2	n.d.	2630 ± 150
CS 3	1820 ± 100	410 ± 30	5,5 ± 0,6	3,4 ± 0,5	45 ± 2	39 ± 6	12 ± 3	78 ± 2	n.d.	2410 ± 140
CS 3	1980 ± 110	410 ± 30	5,4 ± 0,6	4,3 ± 0,7	46 ± 2	41 ± 6	13 ± 3	80 ± 2	n.d.	2580 ± 150
CS 3	1890 ± 110	410 ± 30	5,4 ± 0,6	3,1 ± 0,5	45 ± 2	39 ± 6	12 ± 3	80 ± 2	n.d.	2480 ± 140
$\bar{x}$	1870 ± 110	390 ± 30	4,8 ± 0,5	4,0 ± 0,6	44 ± 2	39 ± 6	12 ± 3	76 ± 2	n.d.	2440 ± 140
CS S 75%	3270 ± 180	680 ± 50	7,1 ± 0,8	6,0 ± 0,9	72 ± 3	68 ± 9	20 ± 4	135 ± 4	n.d.	4260 ± 240
CS S 75%	3260 ± 180	680 ± 50	7,8 ± 0,8	6,4 ± 1,0	73 ± 3	68 ± 9	20 ± 4	136 ± 4	n.d.	4250 ± 240
CS S 75%	3270 ± 180	680 ± 50	8,6 ± 0,9	6,6 ± 1,0	73 ± 3	68 ± 9	21 ± 4	139 ± 4	n.d.	4270 ± 240
CS S 75%	3270 ± 180	680 ± 50	8,6 ± 0,9	6,1 ± 1,0	74 ± 3	68 ± 9	20 ± 4	142 ± 4	n.d.	4270 ± 240
CS S 75%	3270 ± 180	680 ± 50	8,1 ± 0,9	6,3 ± 1,0	73 ± 3	68 ± 9	21 ± 4	135 ± 4	n.d.	4260 ± 240
CS S 75%	3270 ± 180	680 ± 50	8,4 ± 0,9	5,9 ± 0,9	74 ± 3	68 ± 9	20 ± 4	135 ± 4	n.d.	4260 ± 240
$\bar{x}$	3270 ± 180	680 ± 50	8,1 ± 0,9	6,2 ± 1,0	73 ± 3	68 ± 9	20 ± 4	137 ± 4	n.d.	4260 ± 240

Prilog 9. Nastavak

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina	Ukupne kiseline
CS S 100%	3740 ± 210	780 ± 60	7,9 ± 0,8	7,3 ± 1,0	77 ± 3	80 ± 10	23 ± 5	153 ± 4	n.d.	4860 ± 270
CS S 100%	3730 ± 210	780 ± 60	9,1 ± 1,0	6,6 ± 1,0	77 ± 3	80 ± 10	23 ± 5	155 ± 4	n.d.	4860 ± 270
CS S 100%	3730 ± 210	780 ± 60	8,7 ± 0,9	7,1 ± 1,0	77 ± 3	80 ± 10	24 ± 5	154 ± 4	n.d.	4860 ± 270
CS S 100%	3740 ± 210	780 ± 60	9,3 ± 1,0	7,1 ± 1,0	78 ± 3	80 ± 10	23 ± 5	159 ± 4	n.d.	4870 ± 270
CS S 100%	3740 ± 210	780 ± 60	9,1 ± 1,0	8,4 ± 1,0	78 ± 3	80 ± 10	23 ± 5	159 ± 4	n.d.	4880 ± 270
CS S 100%	3740 ± 210	780 ± 60	9,3 ± 1,0	7,2 ± 1,0	77 ± 3	80 ± 10	23 ± 5	154 ± 4	n.d.	4800 ± 270
$\bar{x}$	3740 ± 210	780 ± 60	8,9 ± 0,9	7,3 ± 1,0	77 ± 3	80 ± 10	23 ± 5	155 ± 5	n.d.	4860 ± 270
CS S 125%	4200 ± 230	880 ± 70	8,6 ± 0,9	9,0 ± 1,0	85 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	173 ± 5	n.d.	5470 ± 310
CS S 125%	4200 ± 230	870 ± 70	10,1 ± 1,0	9,1 ± 1,0	85 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	171 ± 5	n.d.	5460 ± 310
CS S 125%	4210 ± 230	880 ± 70	9,4 ± 1,0	9,1 ± 1,0	78 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	145 ± 5	n.d.	5450 ± 310
CS S 125%	4190 ± 230	880 ± 70	8,9 ± 0,9	9,0 ± 1,0	85 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	169 ± 5	n.d.	5450 ± 310
CS S 125%	4200 ± 230	870 ± 70	9,4 ± 1,0	8,8 ± 0,9	83 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	170 ± 5	n.d.	5460 ± 310
CS S 125%	4200 ± 230	880 ± 70	9,6 ± 1,0	9,0 ± 1,0	83 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	166 ± 5	n.d.	5450 ± 310
$\bar{x}$	4200 ± 230	880 ± 70	9,3 ± 1,0	9,0 ± 1,0	83 ± 3	90 ± 20	26 ± 5	169 ± 5	n.d.	5460 ± 310

CS – zbirni uzorak (eng. Collective Sample, CS), S – procenat obogaćivanja uzorka, n.d. – nije detektovana

Prilog 10. Sadržaj limunske kiseline (mg/kg) u autentičnom i krivotvorenom uzorku bagremovog meda invertnim sirupom

Uzorak	Limunska kiselina (mg/kg)
B1	60 ± 2
B1	59 ± 2
B1	60 ± 2
B1	62 ± 2
B1	58 ± 2
B1	58 ± 2
$\bar{x}$	60 ± 2
IS	1300 ± 40
IS	1290 ± 40
IS	1300 ± 40
IS	1270 ± 40
IS	1280 ± 40
IS	1280 ± 40
$\bar{x}$	1290 ± 40
B1 + IS 10%	227 ± 6
B1 + IS 10%	224 ± 6
B1 + IS 10%	222 ± 6
B1 + IS 10%	228 ± 6
B1 + IS 10%	221 ± 6
B1 + IS 10%	230 ± 6
$\bar{x}$	225 ± 6
B1 + IS 20%	302 ± 8
B1 + IS 20%	300 ± 8
B1 + IS 20%	302 ± 8
B1 + IS 20%	304 ± 8
B1 + IS 20%	297 ± 8
B1 + IS 20%	284 ± 8
$\bar{x}$	298 ± 8
B1 + IS 30%	420 ± 10
B1 + IS 30%	410 ± 10
B1 + IS 30%	430 ± 10
B1 + IS 30%	430 ± 10
B1 + IS 30%	430 ± 10
B1 + IS 30%	420 ± 10
$\bar{x}$	420 ± 10

Prilog 11. Sadržaj organskih kiselina (mg/kg) ispitivanih uzoraka meda

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
<i>Robinia pseudoacacia</i>									
B1	2320 ± 130	490 ± 40	4,7 ± 0,5	5,6 ± 0,9	33 ± 2	13 ± 2	9 ± 2	60 ± 2	n.d.
B2	2790 ± 160	390 ± 30	3,9 ± 0,4	1,7 ± 0,3	21,3 ± 0,7	2,2 ± 0,3	5,0 ± 0,9	40 ± 1	n.d.
B3	1890 ± 110	360 ± 30	6,2 ± 0,7	3,0 ± 0,5	18,4 ± 0,6	4,7 ± 0,6	5 ± 1	38 ± 1	n.d.
B4	2300 ± 130	720 ± 60	5,4 ± 0,6	3,5 ± 0,5	27 ± 1	12 ± 2	8 ± 2	51 ± 2	n.d.
B5	2090 ± 120	510 ± 40	5,2 ± 0,6	3,0 ± 0,5	20,4 ± 0,7	8 ± 2	7 ± 2	53 ± 2	n.d.
B6	1930 ± 110	440 ± 40	4,4 ± 0,5	3,6 ± 0,6	29 ± 1	16 ± 3	10 ± 2	49 ± 2	n.d.
B7	2410 ± 140	520 ± 40	4,8 ± 0,5	3,8 ± 0,6	24,7 ± 0,9	10 ± 2	13 ± 3	51 ± 2	n.d.
B8	1970 ± 110	640 ± 50	5,0 ± 0,5	2,5 ± 0,4	15,7 ± 0,6	8 ± 1	7 ± 2	38 ± 1	n.d.
B9	1360 ± 80	450 ± 40	3,9 ± 0,4	2,1 ± 0,3	13,1 ± 0,5	10 ± 2	7 ± 2	32 ± 1	n.d.
B10	1440 ± 80	430 ± 40	6,0 ± 0,6	6,1 ± 1,0	29 ± 1	18 ± 3	10 ± 2	51 ± 2	n.d.
B11	3480 ± 190	470 ± 40	5,7 ± 0,6	3,7 ± 0,6	36 ± 2	0,30 ± 0,04	19 ± 4	51 ± 2	n.d.
B12	1810 ± 100	390 ± 30	6,0 ± 0,6	3,0 ± 0,5	19,1 ± 0,7	16 ± 3	7 ± 2	47 ± 2	n.d.
B13	1610 ± 90	460 ± 40	5,7 ± 0,6	3,8 ± 0,6	21,7 ± 0,8	19 ± 3	11 ± 3	44 ± 2	n.d.
B14	2780 ± 160	500 ± 40	4,9 ± 0,5	3,5 ± 0,5	50 ± 2	15 ± 2	20 ± 4	50 ± 2	n.d.
B15	1570 ± 90	430 ± 40	6,3 ± 0,7	4,3 ± 0,7	29 ± 1	5,6 ± 0,7	8 ± 2	51 ± 2	n.d.
B16	1510 ± 90	530 ± 40	4,0 ± 0,4	3,1 ± 0,5	21,1 ± 0,7	9 ± 2	6 ± 2	44 ± 2	n.d.
B17	1950 ± 110	510 ± 40	6,4 ± 0,7	6,6 ± 1,0	25,4 ± 0,9	16 ± 3	7 ± 2	46 ± 2	n.d.
B18	1510 ± 90	520 ± 40	4,3 ± 0,5	2,4 ± 0,4	17,0 ± 0,6	10 ± 2	9 ± 2	38 ± 1	n.d.
B19	2540 ± 140	470 ± 50	5,8 ± 0,6	3,6 ± 0,6	36 ± 2	2,2 ± 0,3	12 ± 3	57 ± 2	n.d.
B20	2480 ± 140	470 ± 50	8,9 ± 0,9	6,8 ± 1,1	18,1 ± 0,6	1,3 ± 0,2	10 ± 2	45 ± 2	n.d.
B21	1820 ± 100	520 ± 40	5,6 ± 0,6	3,0 ± 0,5	18,0 ± 0,6	5,4 ± 0,7	6 ± 2	43 ± 2	n.d.
B22	2500 ± 140	520 ± 40	5,2 ± 0,6	2,7 ± 0,4	27 ± 1	1,7 ± 0,2	19 ± 4	48 ± 2	n.d.
B23	1920 ± 110	510 ± 40	6,8 ± 0,7	6,5 ± 1,0	39 ± 2	23 ± 3	9 ± 2	53 ± 2	n.d.

Prilog 11. Nastavak

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
B24	2160 ± 120	420 ± 30	7,9 ± 0,8	5,9 ± 0,9	25,6 ± 0,9	13 ± 2	9 ± 2	45 ± 2	n.d.
B25	1840 ± 100	580 ± 50	5,8 ± 0,6	3,4 ± 0,5	19,3 ± 0,7	5,6 ± 0,7	9 ± 2	37 ± 1	n.d.
B26	1690 ± 100	510 ± 40	4,6 ± 0,5	3,1 ± 0,5	21,1 ± 0,7	3,0 ± 0,4	9 ± 2	36 ± 1	n.d.
B27	2080 ± 120	490 ± 40	6,5 ± 0,7	3,5 ± 0,5	19,7 ± 0,7	3,0 ± 0,4	7 ± 2	38 ± 1	n.d.
B28	1530 ± 90	490 ± 40	5,3 ± 0,6	3,7 ± 0,6	23,8 ± 0,8	6,8 ± 0,9	10 ± 2	48 ± 2	n.d.
B29	1520 ± 90	540 ± 40	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,4	18,4 ± 0,6	19 ± 3	7 ± 2	48 ± 1	n.d.
B30	1030 ± 60	560 ± 40	3,6 ± 0,4	2,7 ± 0,4	16,7 ± 0,6	12 ± 2	8 ± 2	43 ± 2	n.d.
B31	1990 ± 110	590 ± 50	6,0 ± 0,6	4,4 ± 0,7	28 ± 1	11 ± 2	15 ± 3	50 ± 2	n.d.
B32	1930 ± 110	620 ± 50	5,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5	23,9 ± 0,8	16 ± 3	16 ± 3	48 ± 2	n.d.
B33	1850 ± 100	480 ± 40	8,2 ± 0,9	3,4 ± 0,5	21,5 ± 0,8	1,3 ± 0,2	8 ± 2	37 ± 1	n.d.
B34	1890 ± 110	470 ± 40	6,3 ± 0,7	3,2 ± 0,5	19,0 ± 0,7	6,4 ± 0,8	8 ± 2	40 ± 1	n.d.
B35	2330 ± 130	640 ± 50	5,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5	17,5 ± 0,6	5,5 ± 0,7	11 ± 2	41 ± 1	n.d.
B36	2090 ± 120	600 ± 50	5,9 ± 0,6	3,2 ± 0,5	18,3 ± 0,6	7 ± 1	9 ± 2	38 ± 1	n.d.
B37	1680 ± 100	520 ± 40	5,9 ± 0,6	3,9 ± 0,6	19,1 ± 0,7	2,3 ± 0,3	7 ± 2	41 ± 1	n.d.
B38	2460 ± 140	560 ± 40	8,7 ± 0,9	5,9 ± 0,9	35 ± 2	2,1 ± 0,3	13 ± 3	50 ± 2	n.d.
B39	2170 ± 120	520 ± 40	5,7 ± 0,6	4,2 ± 0,7	35 ± 2	5,8 ± 0,8	11 ± 2	51 ± 2	n.d.
B40	1670 ± 100	610 ± 50	5,4 ± 0,6	6,4 ± 1,0	26,0 ± 0,9	0,30 ± 0,04	7 ± 2	46 ± 2	n.d.
B41	2010 ± 110	540 ± 40	6,6 ± 0,7	4,7 ± 0,7	30 ± 1	6,1 ± 0,8	6 ± 2	51 ± 2	n.d.
B42	1630 ± 90	500 ± 40	4,5 ± 0,5	6,3 ± 1,0	38 ± 2	20 ± 3	12 ± 3	74 ± 2	n.d.
B43	1940 ± 110	560 ± 40	5,6 ± 0,6	6,4 ± 1,0	17,2 ± 0,6	7 ± 1	4,7 ± 0,9	54 ± 2	n.d.
B44	1950 ± 110	480 ± 40	6,1 ± 0,6	6,1 ± 1,0	34 ± 2	0,20 ± 0,03	10 ± 2	52 ± 2	n.d.
B45	1800 ± 100	600 ± 50	4,4 ± 0,5	3,6 ± 0,6	26,5 ± 0,9	10 ± 2	10 ± 2	42 ± 1	n.d.
B46	2000 ± 110	720 ± 60	3,7 ± 0,4	2,8 ± 0,4	28 ± 1	2,9 ± 0,4	8 ± 2	43 ± 2	n.d.
B47	2090 ± 120	500 ± 40	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,6	25,7 ± 0,9	27 ± 4	8 ± 2	42 ± 2	n.d.
B48	3500 ± 190	520 ± 40	6,2 ± 0,7	3,7 ± 0,6	40 ± 2	18 ± 3	15 ± 3	56 ± 2	n.d.

Prilog 11. Nastavak

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
B49	2320 ± 130	540 ± 40	5,3 ± 0,6	3,8 ± 0,6	25,0 ± 0,9	15 ± 2	20 ± 4	46 ± 2	n.d.
B50	2780 ± 150	520 ± 40	9,9 ± 1,1	4,1 ± 0,6	21,7 ± 0,8	10 ± 2	15 ± 3	40 ± 1	n.d.
B51	2360 ± 130	540 ± 40	6,1 ± 0,6	5,5 ± 0,9	24,5 ± 0,9	10 ± 2	6 ± 2	41 ± 1	n.d.
B52	1960 ± 110	540 ± 40	5,6 ± 0,6	6,1 ± 1,0	20,5 ± 0,7	8 ± 1	5 ± 1	44 ± 2	n.d.
B53	2690 ± 150	690 ± 50	5,6 ± 0,6	3,2 ± 0,5	20,3 ± 0,7	12 ± 2	8 ± 2	40 ± 1	n.d.
B54	2550 ± 140	520 ± 40	4,4 ± 0,5	4,9 ± 0,8	36 ± 2	14 ± 2	12 ± 3	65 ± 2	n.d.
B55	1830 ± 100	690 ± 50	5,3 ± 0,6	3,7 ± 0,6	17,8 ± 0,6	7 ± 1	7 ± 2	41 ± 1	n.d.
B56	1750 ± 100	630 ± 50	5,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5	20,2 ± 0,7	13 ± 2	7 ± 2	47 ± 2	n.d.
B57	1570 ± 90	560 ± 40	5,6 ± 0,6	7,9 ± 1,2	39 ± 2	5,9 ± 0,8	16 ± 3	54 ± 2	n.d.
B58	2190 ± 120	560 ± 40	6,5 ± 0,7	5,2 ± 0,8	26,3 ± 0,9	5,5 ± 0,7	11 ± 3	43 ± 2	n.d.
B59	2620 ± 150	610 ± 50	6,3 ± 0,7	2,8 ± 0,4	22,9 ± 0,8	9 ± 2	9 ± 2	39 ± 1	n.d.
B60	1620 ± 90	540 ± 40	1,2 ± 0,1	2,8 ± 0,4	26,5 ± 0,9	61 ± 8	6 ± 1	69 ± 2	n.d.
B61	2900 ± 160	740 ± 60	9,5 ± 1,0	9,6 ± 1,5	23,3 ± 0,8	66 ± 9	3,9 ± 0,7	74 ± 2	n.d.
B62	2080 ± 120	670 ± 50	3,0 ± 0,3	6,9 ± 0,1	15,7 ± 0,6	54 ± 8	3,1 ± 0,6	68 ± 2	7,9 ± 0,2
B63	2120 ± 120	680 ± 50	2,4 ± 0,3	2,9 ± 0,5	50 ± 2	58 ± 8	16 ± 4	81 ± 2	7,6 ± 0,2
B64	3650 ± 200	280 ± 20	5,1 ± 0,5	4,3 ± 0,7	41 ± 2	36 ± 5	8 ± 2	41 ± 1	8,7 ± 0,2
B65	2080 ± 120	500 ± 40	2,4 ± 0,3	7,4 ± 0,2	15,4 ± 0,5	47 ± 7	2,2 ± 0,4	41 ± 1	n.d.
B66	1700 ± 100	370 ± 30	1,2 ± 0,1	18,2 ± 0,8	15,7 ± 0,6	140 ± 20	n.d.	41 ± 1	n.d.
B67	1920 ± 110	560 ± 40	1,2 ± 0,1	8,1 ± 0,3	21,4 ± 0,8	41 ± 6	2,4 ± 0,5	88 ± 3	n.d.
B68	2110 ± 120	460 ± 40	4,9 ± 0,5	13,6 ± 0,1	20,4 ± 0,7	90 ± 20	10 ± 2	64 ± 2	n.d.
B69	1960 ± 110	650 ± 50	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,5	16,0 ± 0,6	60 ± 8	6 ± 2	32 ± 1	7,8 ± 0,2
B70	1620 ± 90	610 ± 50	0,7 ± 0,1	11,8 ± 0,8	25,6 ± 0,9	59 ± 8	3,4 ± 0,6	329 ± 9	7,9 ± 0,2
B71	3940 ± 220	370 ± 30	4,9 ± 0,5	8,6 ± 0,3	65 ± 3	31 ± 5	5 ± 1	296 ± 8	9,0 ± 0,2
B72	710 ± 40	370 ± 30	0,7 ± 0,1	7,8 ± 0,2	1,20 ± 0,04	24 ± 4	2,4 ± 0,5	109 ± 3	n.d.
B73	2030 ± 110	320 ± 30	1,8 ± 0,2	9,8 ± 0,5	15,4 ± 0,5	90 ± 20	11 ± 2	1050 ± 30	n.d.

Prilog 11. Nastavak

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
B74	1420 ± 80	260 ± 20	1,6 ± 0,2	5,7 ± 0,9	7,6 ± 0,3	70 ± 10	2,9 ± 0,5	1880 ± 50	9,6 ± 0,2
<i>Tilia cordata</i>									
L1	4490 ± 250	480 ± 40	7,7 ± 0,8	14,3 ± 2,2	56 ± 2	80 ± 20	12 ± 3	151 ± 4	n.d.
L2	6090 ± 330	720 ± 50	9,3 ± 1,0	6,4 ± 1,0	92 ± 4	80 ± 20	28 ± 6	107 ± 3	n.d.
L3	5460 ± 300	570 ± 40	11,7 ± 1,2	9,5 ± 1,5	59 ± 3	110 ± 20	16 ± 3	107 ± 3	n.d.
L4	5100 ± 280	560 ± 40	4,8 ± 0,5	47,2 ± 7,4	46 ± 2	90 ± 20	10 ± 2	199 ± 5	n.d.
L5	6480 ± 350	840 ± 60	9,4 ± 1,0	3,4 ± 0,5	61 ± 3	130 ± 20	16 ± 3	68 ± 2	n.d.
L6	2950 ± 160	230 ± 20	6,1 ± 0,6	16,2 ± 0,5	48 ± 2	4,6 ± 0,6	3,1 ± 0,6	317 ± 8	9,1 ± 0,2
L7	3800 ± 210	410 ± 30	4,3 ± 0,5	10,6 ± 0,7	56 ± 2	6,4 ± 0,8	5 ± 1	202 ± 6	8,7 ± 0,2
L8	5530 ± 300	440 ± 40	6,0 ± 0,6	9,2 ± 0,4	76 ± 1	18 ± 3	11 ± 3	256 ± 7	9,2 ± 0,2
L9	5580 ± 310	500 ± 40	7,3 ± 0,8	7,8 ± 0,2	66 ± 3	22 ± 3	12 ± 3	81 ± 2	7,1 ± 0,2
L10	4030 ± 220	480 ± 40	1,6 ± 0,2	9,8 ± 0,5	55 ± 2	8 ± 2	9 ± 2	132 ± 4	7,4 ± 0,2
L11	9340 ± 510	180 ± 20	23,1 ± 2,5	9,8 ± 2,5	95 ± 4	21 ± 3	23 ± 5	140 ± 4	9,5 ± 0,2
L12	5320 ± 290	490 ± 40	5,8 ± 0,6	4,7 ± 0,7	79 ± 3	14 ± 2	21 ± 4	96 ± 3	7,2 ± 0,2
L13	3810 ± 210	400 ± 30	2,8 ± 0,3	6,8 ± 0,1	41 ± 2	38 ± 5	10 ± 2	163 ± 5	n.d.
L14	7230 ± 400	630 ± 50	10,9 ± 1,2	13,3 ± 1,1	67 ± 3	38 ± 5	19 ± 4	76 ± 2	7,8 ± 0,2
L15	720 ± 40	310 ± 30	1,1 ± 0,1	8,2 ± 0,3	4,0 ± 0,1	29 ± 4	1,9 ± 0,4	600 ± 20	n.d.
L16	1980 ± 110	380 ± 30	0,7 ± 0,1	9,9 ± 0,5	7,7 ± 0,3	32 ± 5	4,6 ± 0,9	107 ± 3	n.d.
L17	7080 ± 390	710 ± 50	12,6 ± 1,3	1,5 ± 0,2	53 ± 2	160 ± 20	12 ± 3	77 ± 2	n.d.
L18	6560 ± 360	620 ± 50	11,9 ± 1,3	6,2 ± 1,0	116 ± 5	100 ± 20	35 ± 7	120 ± 3	n.d.
<i>Helianthus annuus</i>									
S1	5460 ± 300	300 ± 30	15,0 ± 1,6	1,6 ± 0,2	42 ± 2	100 ± 20	6 ± 1	283 ± 7	n.d.
S2	4170 ± 230	35 ± 3	10,8 ± 1,1	5,5 ± 0,9	43 ± 2	110 ± 20	3,5 ± 0,7	339 ± 9	n.d.
S3	5940 ± 330	640 ± 50	8,2 ± 0,9	26,9 ± 4,2	71 ± 3	80 ± 10	15 ± 3	194 ± 5	15,6 ± 0,4
S4	3240 ± 180	420 ± 30	8,5 ± 0,9	35,8 ± 5,6	63 ± 3	90 ± 20	9 ± 2	251 ± 7	16,7 ± 0,4

Prilog 11. Nastavak

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
S5	3710 ± 200	300 ± 30	7,9 ± 0,8	19,4 ± 3,0	59 ± 3	56 ± 8	8 ± 2	390 ± 10	15,5 ± 0,4
S6	4480 ± 250	320 ± 30	10,7 ± 1,1	4,5 ± 0,7	53 ± 2	100 ± 20	3,5 ± 0,7	580 ± 20	16,0 ± 0,4
S7	6700 ± 370	94 ± 7	7,1 ± 0,8	14,7 ± 2,3	41 ± 2	30 ± 4	3,7 ± 0,7	410 ± 20	n.d.
S8	5780 ± 320	440 ± 40	3,3 ± 0,4	15,7 ± 2,4	49 ± 2	28 ± 4	4,6 ± 0,9	228 ± 6	n.d.
S9	4980 ± 270	450 ± 40	10,7 ± 1,1	39,8 ± 6,2	67 ± 3	68 ± 9	9 ± 2	400 ± 10	15,3 ± 0,4
S10	5290 ± 290	400 ± 30	7,3 ± 0,8	22,2 ± 3,5	94 ± 4	16 ± 3	33 ± 7	520 ± 20	17,8 ± 0,4
<i>Brassica napus</i>									
R1	4680 ± 260	310 ± 30	11,4 ± 1,2	1,1 ± 0,2	21,3 ± 0,7	150 ± 20	14 ± 3	123 ± 4	n.d.
R2	3210 ± 180	230 ± 20	6,6 ± 0,7	0,2 ± 0,1	26,8 ± 0,9	150 ± 20	15 ± 3	63 ± 2	n.d.
R3	3850 ± 210	370 ± 30	9,4 ± 1,0	0,1 ± 0,1	13,3 ± 0,5	160 ± 30	18 ± 4	84 ± 3	n.d.
R4	4220 ± 230	300 ± 30	8,6 ± 0,9	7,4 ± 1,2	17,5 ± 0,6	130 ± 20	30 ± 6	135 ± 4	n.d.
R5	2630 ± 150	400 ± 30	6,9 ± 0,7	1,4 ± 0,2	8,0 ± 0,3	120 ± 20	14 ± 3	83 ± 3	n.d.
R6	2260 ± 130	340 ± 30	9,8 ± 1,0	1,9 ± 0,3	10,6 ± 0,4	140 ± 20	13 ± 3	97 ± 3	n.d.
R7	2190 ± 120	460 ± 40	7,3 ± 0,8	6,7 ± 1,0	18,4 ± 0,6	45 ± 6	12 ± 3	51 ± 2	7,4 ± 0,2
R8	2580 ± 140	270 ± 20	7,8 ± 0,8	0,2 ± 0,1	9,4 ± 0,3	140 ± 20	17 ± 4	51 ± 2	n.d.
R9	2370 ± 130	360 ± 30	6,8 ± 0,7	0,5 ± 0,1	8,1 ± 0,3	38 ± 5	10 ± 2	69 ± 2	n.d.
R10	2340 ± 130	290 ± 20	7,1 ± 0,8	0,2 ± 0,1	6,4 ± 0,2	45 ± 6	11 ± 3	92 ± 3	n.d.
<i>Honeydew</i>									
M1	5540 ± 300	410 ± 30	10,3 ± 1,1	35 ± 6	248 ± 9	9 ± 2	100 ± 20	289 ± 8	18,2 ± 0,5
M2	7330 ± 400	580 ± 50	12,5 ± 1,3	190 ± 30	400 ± 20	890 ± 120	110 ± 30	530 ± 20	23,6 ± 0,6
M3	8460 ± 460	720 ± 60	14,6 ± 1,6	220 ± 40	440 ± 20	1170 ± 160	130 ± 30	640 ± 20	25,9 ± 0,6
M4	10690 ± 580	800 ± 60	16,6 ± 1,8	51,2 ± 8,0	42 ± 2	1790 ± 240	240 ± 50	670 ± 20	40,7 ± 0,9
M5	7760 ± 420	940 ± 70	8,4 ± 0,9	30,7 ± 4,8	400 ± 20	1200 ± 160	120 ± 30	480 ± 20	18,3 ± 0,5
M6	620 ± 40	220 ± 20	0,6 ± 0,1	10,1 ± 1,6	n.d.	1,8 ± 0,1	4,1 ± 0,8	610 ± 20	n.d.
M7	7230 ± 390	1300 ± 100	6,5 ± 0,7	80 ± 20	390 ± 20	210 ± 30	90 ± 20	400 ± 10	28,5 ± 0,7

Prilog 11. Nastavak

Uzorak	Kininska kiselina	Šikiminska kiselina	Galakturonska kiselina	Glukuronska kiselina	Jabučna kiselina	Ćilibarna kiselina	Maleinska kiselina	Limunska kiselina	Izolimunska kiselina
M8	6840 ± 370	690 ± 50	6,9 ± 0,7	80 ± 20	650 ± 30	560 ± 80	120 ± 30	530 ± 20	27,0 ± 0,7
M9	7720 ± 420	420 ± 30	8,8 ± 0,9	51,5 ± 8,0	520 ± 20	270 ± 40	130 ± 30	510 ± 20	27,7 ± 0,7
M10	5590 ± 310	350 ± 30	9,9 ± 1,1	2,8 ± 0,4	580 ± 20	190 ± 30	120 ± 30	390 ± 10	20,7 ± 0,5
M11	6940 ± 380	590 ± 50	8,4 ± 0,9	25,4 ± 4,0	960 ± 40	580 ± 80	190 ± 40	620 ± 20	30,9 ± 0,8
M12	8310 ± 450	420 ± 30	4,2 ± 0,4	130 ± 30	380 ± 20	260 ± 40	150 ± 30	470 ± 20	25,6 ± 0,6
M13	5800 ± 320	620 ± 50	9,8 ± 1,0	2,5 ± 0,4	870 ± 30	620 ± 90	350 ± 70	560 ± 20	29,1 ± 0,7
M14	6150 ± 340	680 ± 50	8,4 ± 0,9	0,2 ± 0,1	870 ± 30	760 ± 100	340 ± 70	580 ± 20	31,2 ± 0,8
M15	6220 ± 340	730 ± 60	8,9 ± 0,9	0,5 ± 0,1	1000 ± 40	1020 ± 140	520 ± 100	680 ± 20	36,0 ± 0,9
M16	6010 ± 330	330 ± 30	6,0 ± 0,6	0,5 ± 0,1	470 ± 20	280 ± 40	190 ± 40	360 ± 9	23,2 ± 0,6
M17	7460 ± 410	250 ± 20	10,2 ± 1,1	8,9 ± 1,4	480 ± 20	380 ± 50	180 ± 40	390 ± 10	23,2 ± 0,6
M18	6510 ± 360	770 ± 60	8,4 ± 0,9	0,9 ± 0,1	930 ± 40	980 ± 130	430 ± 90	660 ± 20	35,2 ± 0,9
M19	6080 ± 330	340 ± 30	3,4 ± 0,4	140 ± 30	201 ± 8	50 ± 7	50 ± 10	420 ± 10	17,2 ± 0,4
M20	5510 ± 300	430 ± 30	2,4 ± 0,3	145 ± 30	187 ± 7	280 ± 4	50 ± 10	320 ± 8	16,4 ± 0,4
M21	6180 ± 340	350 ± 30	12,6 ± 1,3	1,9 ± 0,3	730 ± 30	180 ± 30	150 ± 30	450 ± 20	23,3 ± 0,6
M22	6440 ± 350	580 ± 50	7,9 ± 0,8	0,7 ± 0,1	1200 ± 50	680 ± 90	320 ± 60	660 ± 20	24,8 ± 0,6
M23	4850 ± 370	290 ± 20	9,7 ± 1,0	2,6 ± 0,4	390 ± 20	56 ± 8	120 ± 30	370 ± 10	20,5 ± 0,5
M24	6010 ± 330	460 ± 40	10,0 ± 1,1	2,6 ± 0,4	730 ± 30	290 ± 40	190 ± 40	540 ± 20	26,5 ± 0,7
M25	6530 ± 360	300 ± 30	11,0 ± 1,2	2,7 ± 0,4	760 ± 30	330 ± 50	180 ± 40	550 ± 20	28,4 ± 0,7
M26	5770 ± 320	220 ± 20	8,3 ± 0,9	3,6 ± 0,6	530 ± 20	230 ± 40	170 ± 40	410 ± 10	22,8 ± 0,6

n.d. – nije detektovana

BIOGRAFIJA

Mihajlo V. Jakanovski rođen je 12. decembra 1996. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovnu školu „Ilija Birčanin” u Zemun Polju i Medicinsku školu na Zvezdari završio je sa odličnim uspehom. Osnovne akademske studije na studijskom programu Hemija na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2015/16. godine, a diplomirao je 2020. godine na Katedri za analitičku hemiju. Master akademske studije na istom fakultetu završio je 2021. godine, čime je stekao zvanje master hemičar.

Tokom master studija bio je zaposlen devet meseci u Centru za ispitivanje namirnica (CIN d.o.o., Beograd). Doktorske akademske studije na studijskom programu Hemija upisao je školske 2021/22. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pri Katedri za analitičku hemiju, pod mentorstvom dr Dušanke Milojković–Opsenice, redovnog profesora. Od maja 2022. godine zaposlen je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu d.o.o., najpre u zvanju istraživač–pripravnik, a od maja 2024. godine kao istraživač–saradnik. Tokom školskih godina 2022/23., 2023/24. i 2024/25. bio je angažovan kao saradnik u izvođenju laboratorijskih vežbi na predmetima Katedre za analitičku hemiju. U okviru svog istraživačkog rada bavi se analizom hrane, prirodnim proizvodima, visokoefikasnom tečnom hromatografijom i hemometrijom. Od novembra 2025. godine zaposlen je na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, pri Katedri za analitičku hemiju, u zvanju saradnik u nastavi.

Dobitnik je nagrada Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za doprinos razvoju fakulteta 2018. i 2023. godine. Član je Srpskog hemijskog društva i Kluba mladih hemičara Srbije, a od 2022. godine i član njihovih upravnih odbora. Od septembra 2025. godine predstavnik je u Evropskoj mreži mladih hemičara (EYCN).

NAUČNI RADOVI

Mihajlo Jakanovski je koautor dva naučna rada publikovana u vodećem međunarodnom časopisu kategorije M21a+, jednog naučnog rada publikovanog u vodećem međunarodnom časopisu kategorije M21a, tri naučna rada publikovana u vodećem međunarodnom časopisu M21, tri naučna rada publikovana u međunarodnom časopisu kategorije M22, sedam saopštenja sa međunarodnog skupa štampanih u izvodu (M34) i jedanaest saopštenja sa skupa od nacionalnog značaja štampanih u izvodu (M64). Od navedenog broja publikacija, rezultati ispitivanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije objavljeni su u dva naučna rada – jednom u kategoriji M21 i jednom u kategoriji M22 – kao i u obliku jednog saopštenja sa nacionalnog skupa štampanog u izvodu.

1. Maja Natić, Dragana Dabić Zagorac, Mihajlo V. Jakanovski, Anita Smailagić, Slavica Čolić, Mekjell Meland, Milica Fotirić Akšić (2024), *Fruit Quality Attributes of Organically Grown Norwegian Apples Are Affected by Cultivar and Location*, Plants 13, no. 1: 147.
<https://doi.org/10.3390/plants13010147> IF. 4.4; M21
2. Meland, Mekjell, Dragana Dabić Zagorac, Mihajlo V. Jakanovski, Milica Sredojević, Maja Natić, Marko Kitanović, Milica Fotirić Akšić, (2024), *Profiling of Metabolites in Organically Grown Plums from Norway: Does Location or Cultivar Matter?*, Antioxidants 13, no. 5: 526.
<https://doi.org/10.3390/antiox13050526> IF. 6.7; M21a+
3. Milica M. Fotirić Akšić, Mirjana B. Pešić, Ilinka Pećinar, Aleksandra Dramićanin, Danijel D. Milinčić, Aleksandar Ž. Kostić, Uroš Gašić, Mihajlo V. Jakanovski, Marko Kitanović, Mekjell Meland (2024), *Diversity and Chemical Characterization of Apple (Malus sp.) Pollen: High Antioxidant and Nutritional Values for Both Humans and Insects*, Antioxidants 13, no. 11: 1374.
<https://doi.org/10.3390/antiox13111374> IF. 6.7; M21a+
4. Mihajlo V. Jakanovski, Marko D. Jović, Mirjana D. Mosić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Sandra B. Šegan (2025), *Liquid chromatography in determination of pharmacokinetic properties of compounds in drug discovery process*, Journal of Chromatography B, Volume 1257, 124574.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2025.124574> IF. 2.8; M22
5. Slađana D. Savić, Filip Ž. Vlahović, Tamara D. Vasović, Mihajlo V. Jakanovski, Miloš R. Ognjanović, Dragan D. Manojlović, Goran M. Roglić, Dalibor M. Stanković (2025), *Efficient removal of propranolol from water using PbO₂-coated Ti/Sb-SnO₂ electrode: Mechanistic insights from experiments and DFT with ecotoxicological assessment*, Journal of Water Process Engineering, Volume 77, 108321.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.108321> IF. 6.7; M21a
6. Ivana Stojiljković, Đurđa Ivković, Jelena Stanojević, Jelena Zvezdanović, Jelena Beloica, Maja Krstić Ristivojević, Dalibor Stanković, Mihajlo Jakanovski, Petar Ristivojević (2025), *Anti-Aging Potential of Illyrian Iris Rhizome Extract: Comprehensive Chemical and Biological Profiling and Chemosensor Analysis via GC/MS and UHPLC-DAD-MS/MS combined with HPTLC Bioautography*, Chemosensors, 13(9), 319
<https://doi.org/10.3390/chemosensors13090319> IF. 3.8; M21
7. Nikola M. Horvacki, Mihajlo V. Jakanovski, Đurđa D. Krstić, Jelena M. Nedić, Aleksandra M. Dramićanin, Milica M. Fotirić-Akšić, Dušanka M. Milojković-Opsenica (2025), *Evaluation of sugar and organic acid composition of apple cultivars (Malus domestica Borkh.) grown in Serbia*, Processes 2025, 13(10), 3093.
<https://doi.org/10.3390/pr13103093> IF. 3.1; M22

8. Mihajlo V. Jakanovski, Nikola M. Horvacki, Aleksandra M. Dramićanin, Aleksandra D. Radoičić, Sandra B. Šegan, Dušanka M. Milojković-Opsenica (2025), *Organic acids as promising authenticity markers of Robinia pseudoacacia honey*, *Journal of Food Composition and Analysis* 2025, 148, 3, 2025, 108384
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108384> IF. 4.6; M21
9. Mila Č. Lazović, Mihajlo V. Jakanovski, Sandra B. Šegan, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Mirjana D. Mosić (2025), *Recent Progress in Green Sample Preparation for Improved Plant-Based Natural Product and Phenolic Compound Analysis*, *Journal of Separation Science*, Volume 48, Issue 12, November 2025, e70325.
<https://doi.org/10.1002/jssc.70325> IF. 2.7; M22
10. Milica M. Fotirić-Akšić, Mirjana Pešić, Ilinka Pećinar, Mihajlo V. Jakanovski, Danijel Milinčić, Aleksandar Kostić, Marko Kitanović, Uroš Gašić, Dragana Dabić Zagorac, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Mekjell Meland (2026), *Nectar – the fuel for the insects. Chemical fingerprint of floral nectar in apple (Malus sp.) cultivars grown in Norway*, *Antioxidants* 2026, Volume 15(1), 103
<https://doi.org/10.3390/antiox15010103> IF. 7.3; M21a+
11. Nevena N. Momirović, Mihajlo V. Jakanovski, Aleksandra M. Dramićanin, Mirjana D. Mosić, Dragan T. Nikolić, Nebojša M. Momirović, Dušanka M. Milojković-Opsenica (2026), *New promising strawberry cultivars with improved sugar and organic acid profiles and favorable sensory properties*, *Italian Journal of Food Science*, Volume 38 (2), 120–135.
<https://doi.org/10.15586/ijfs.v38i2.3377> IF. 1.8; M22
12. Mihajlo V. Jakanovski, Đurđa D. Krstić, Aleksandra V. Pavlović, Jelena Đ. Trifković, Petar M. Ristivojević, Dušanka M. Milojković-Opsenica (2026), *Tracing honey production authenticity: comparative performance evaluation of HPTLC, EA–IRMS, and HPAEC–PAD techniques*, *European Food Research and Technology* 252, 23
<https://doi.org/10.1007/s00217-026-05162-0> IF. 3.7; M22
13. Marija Atanaskovic, Mina Mandic, Mihajlo V. Jakanovski, Linda De Vooght, Paul Cos, Lidija Senerovic (2026), *A novel β -1,2-mannosidase GH130-BG31 from glycoside hydrolase family 130 targets healthcare-associated bacterial biofilms and potentiates antibiotic activity*, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 367, 152628.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2026.152628> IF. 8.7; M21a

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Михајло Јакановски**

Број индекса **ДХ01/2021**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Шећери и органске киселине као показатељи аутентичности меда

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

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Михајло Јакановски**

Број индекса **ДХ01/2021**

Студијски програм **Хемија**

Наслов рада **Шећери и органске киселине као показатељи аутентичности меда**

Ментори **др Душанка Милојковић–Опсеница и др Сандра Шеган**

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

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

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

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

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

Шећери и органске киселине као показатељи аутентичности меда

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

У Београду, _____

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.