

^1H NMR metabolomska analiza meda

Obad, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:926376>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

KARLA OBAD
0125161708

^1H NMR METABOLOMSKA ANALIZA MEDA
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

¹H NMR METABOLOMSKA ANALIZA MEDA

Karla Obad, 0125161708

Sažetak: Metabolomika je nova znanstvena disciplina koja proučava kemijske i biokemijske procese koji se tiču cjelokupnog staničnog metaboloma. Spregnuta sa spektroskopijom NMR predstavlja dobru alternativu brojnim analitičkim metodama korištenima u analitici prehrambenih proizvoda. Med je izrazito vrijedna i cijenjena namirnica u cijelom svijetu. Zbog svojih vrijednih svojstava sve je češće predmet krivotvorenja i lažnog deklariranja botaničkog i geografskog porijekla. Analizom uzoraka meda iz različitih zemalja (Novi Zeland, Brazil, Finska i Kina) spektroskopijom NMR utvrđeni su specifični biomarkeri svih analiziranih botaničkih vrsta. Pomoću tih markera uspješno je utvrđeno botaničko porijeklo analiziranih medova koristeći se statističkom obradom podataka.

Ključne riječi: NMR, metabolomika, med

Rad sadrži: 29 stranica, 16 slika, 2 tablice, 16 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Datum obrane: 16. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University Undergraduate Study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

¹H NMR metabolomic analysis of honey
Karla Obad, 0125161708

Metabolomics is a new scientific discipline that studies chemical and biochemical processes related to whole cell metabolism. In combination with NMR spectroscopy, it provides a good alternative to a number of analytical methods used in food analysis. Due to its valuable properties, honey is increasingly subject of counterfeiting and false claims of botanical and geographical origin. By analyzing honey samples from different parts of the world (New Zealand, Brazil, Finland and China) using NMR spectroscopy, it was possible to determine specific biomarkers of all botanical species were studied. Based on these markers, the botanical origin of the analyzed honeys could be successfully distinguished using statistical data processing.

Keywords: NMR, metabolomics, honey

Thesis contains: 29 pages, 16 figures, 2 tables, 16 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Lidija Barišić PhD, Full Professor

Thesis defended: September 16th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. SPEKTROSKOPIJA NMR U METABOLOMICI	2
2.2. NMR METABOLOMSKA ANALIZA PREHRAMBENIH PROIZVODA	5
2.3. NMR METABOLOMSKA ANALIZA MEDA	8
2.3.1. Utvrđivanje botaničkog porijekla meda novozelandskog čajevca	8
2.3.2. Utvrđivanje botaničkog porijekla brazilskih medova	14
2.3.3. Utvrđivanje botaničkog porijekla finških medova	18
2.3.4. Utvrđivanje botaničkog porijekla kineskih medova	23
3. ZAKLJUČCI	26
4. LITERATURA	28

1. UVOD

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR, eng. *Nuclear Magnetic Resonance*) najmoćnija je metoda za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva te je izvediva s vrlo malom količinom uzorka kojeg pritom ne oštećuje. Svoju primjenu pronalazi u različitim znanstvenim područjima temeljenima na organskoj kemiji, pa tako i u području prehrambene tehnologije prilikom analize hrane.

Spektroskopija NMR koristi različite jezgre s neparnim atomskim brojem (najčešće ^1H i ^{13}C atome) te se temelji na njihovim magnetskim svojstvima. Naime, jezgre atoma s neparnim atomskim brojem odlikuju se nuklearnim spinom nasumične orijentacije koji generira magnetsko polje. Umetanjem atomske jezgre u polje većeg vanjskog magneta dolazi do usmjeravanja spina paralelno (stabilniji α -spin) ili antiparalelno (manje stabilan β -spin) u odnosu na vanjsko polje. Kada se jezgra usmjerena u pravcu vanjskog magnetskog polja izloži djelovanju dodatnog elektromagnetskog zračenja čija je frekvencija jednaka energetskej razlici između α - i β -spina, dolazi do izvrtanja jezgre iz α - u β -spin nakon čega slijedi relaksacija i ponovno usmjeravanje jezgre paralelno s vanjskim magnetskim poljem. Navedena pojava naziva se rezonancijom te rezultira emitiranjem elektromagnetskog signala kojeg na poslijetku bilježi NMR-spektrometar. Promatrane jezgre u organskim molekulama nisu ogoljeni protoni, već su okružene elektronima koji svojim gibanjem generiraju mala lokalna magnetska polja orijentirana suprotno u odnosu na vanjsko magnetsko polje. Time djelomično zaklanjaju jezgru od utjecaja magnetskog polja zbog čega jezgra „osjeća“ slabije efektivno vanjsko magnetsko polje. Na temelju toga jezgre atoma iz različitih molekula, ovisno o lokalnim magnetskim poljima, rezoniraju pri različitim frekvencijama elektromagnetskog zračenja što nam omogućuje razlikovanje kemijski neekvivalentnih jezgri, odnosno strukturnu identifikaciju molekule.

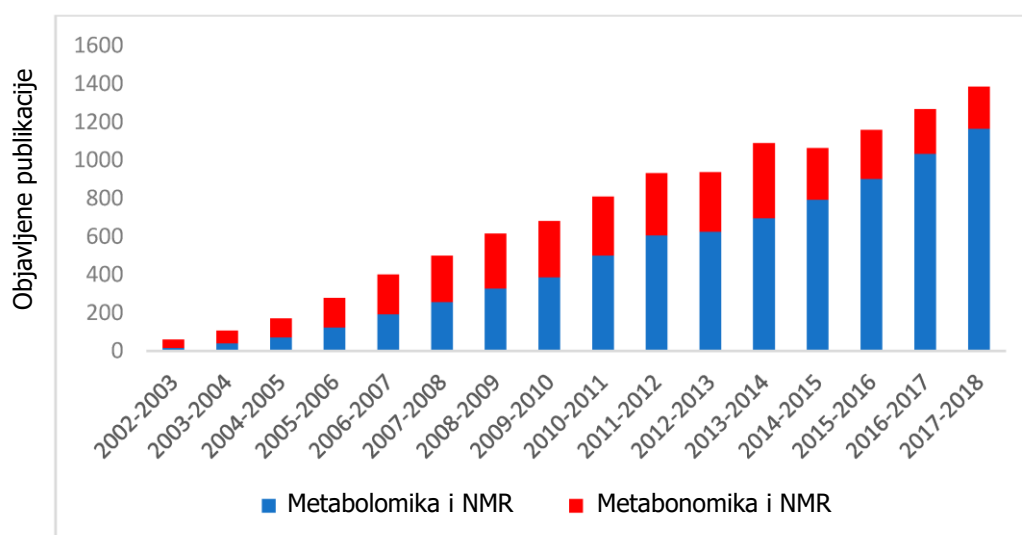
Metabolomika je nova znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem biokemijskih promjena u metaboličkom setu stanica, tkiva, organa i organizama te predstavlja moćan i koristan alat za izučavanje metabolizma i fiziologije živih organizama. Zadnjih se godina primjenjuje za proučavanje utjecaja hrane na nutritivni status i zdravlje, a uključuje sve procese u proizvodnji hrane, od farme do krajnjeg konzumenta (Kim i sur., 2016).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SPEKTROSKOPIJA NMR U METABOLOMICI

Pojam metabolom odnosi se na skup malih molekula u biološkom uzorku koje se ujedno nazivaju metabolitima. Metaboliti u stanici mogu biti primarni i sekundarni. Primarni metaboliti izravno su uključeni u razvoj stanice i imaju ključnu ulogu u održavanju njezinih fizioloških funkcija. Za razliku od primarnih metabolita, sekundarne metabolite proizvode stanice biljaka, gljiva i bakterija s ciljem obrane organizma od drugih vrsta. Takve metabolite koristimo kao lijekove, arome, pigmente i sl.

Metabolomika se definira kao nova znanstvena disciplina koja proučava sve kemijske i biokemijske procese u cjelokupnom staničnom metabolomu. Instrumentalne metode primijenjene u metabolomici većinom uključuju tekućinsku (LC, eng. *Liquid Chromatography*) ili plinsku (GC, eng. *Gass Chromatography*) kromatografiju spregnutu s masenom spektrometrijom (MS, eng. *Mass Spectrometry*), te u novije vrijeme spektroskopiju NMR. Navedene metode imaju svoje prednosti, ali i nedostatke poput cijene, učinkovitosti, selektivnosti, itd., koji su ključni prilikom odabira metode. Od ukupnog broja objavljenih znanstvenih publikacija, više od 80% odnosi se na LC-MS i GC-MS metode u metabolomici, no zabilježen je i povećani interes za spektroskopiju NMR u područjima metabolomike i metabonomike (slika 1.) (Emwas i sur., 2019).



Slika 1. Prikaz dinamike publiciranja znanstvenih radova iz područja metabolomike/metabonomike baziranih na spektroskopiji NMR (Emwas i sur., 2019).

Takav trend posljedica je potencijalnih prednosti NMR u usporedbi sa LC-MS i GC-MS metodama, primjerice nedestruktivnost i reproducibilnost. Nadalje, spektroskopijom NMR moguće je detektirati i karakterizirati spojeve koje prethodno navedene metode ne mogu, poput šećera, organskih kiselina, alkohola, poliola i drugih polarnih molekula.

Velika je prednost NMR-a u tome da izravno može analizirati krute i polukrute uzorke metodama ssNMR (engl. *solid state* NMR – spektroskopija NMR u čvrstom stanju) i MAS-NMR (engl. *magic-angle sample spinning* – vrtnja pri magičnom kutu). Nadalje, spektroskopijom NMR omogućena je simultana analiza različitih metabolita mjerenjem spektara jezgara atoma s neparnim atomskim brojem kao što su ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P . Povezanost spektara dviju ili čak triju jezgara može se izmjeriti korištenjem multidimenzijskih NMR metoda.

Metoda jednodimenzijske (1D) ^1H NMR spektroskopije posebno je korisna za metabolomska istraživanja. Vrlo je pouzdana, brza i visoko automatizirana što uvelike ubrzava samu analizu. 1D NMR spektre moguće je dalje analizirati raznim softverskim alatima koji ga uspoređuju s podacima u bazama podataka. Takvi alati u mogućnosti su ujedno i identificirati i kvantificirati prisutne metabolite u uzorku (Emwas i sur., 2019).

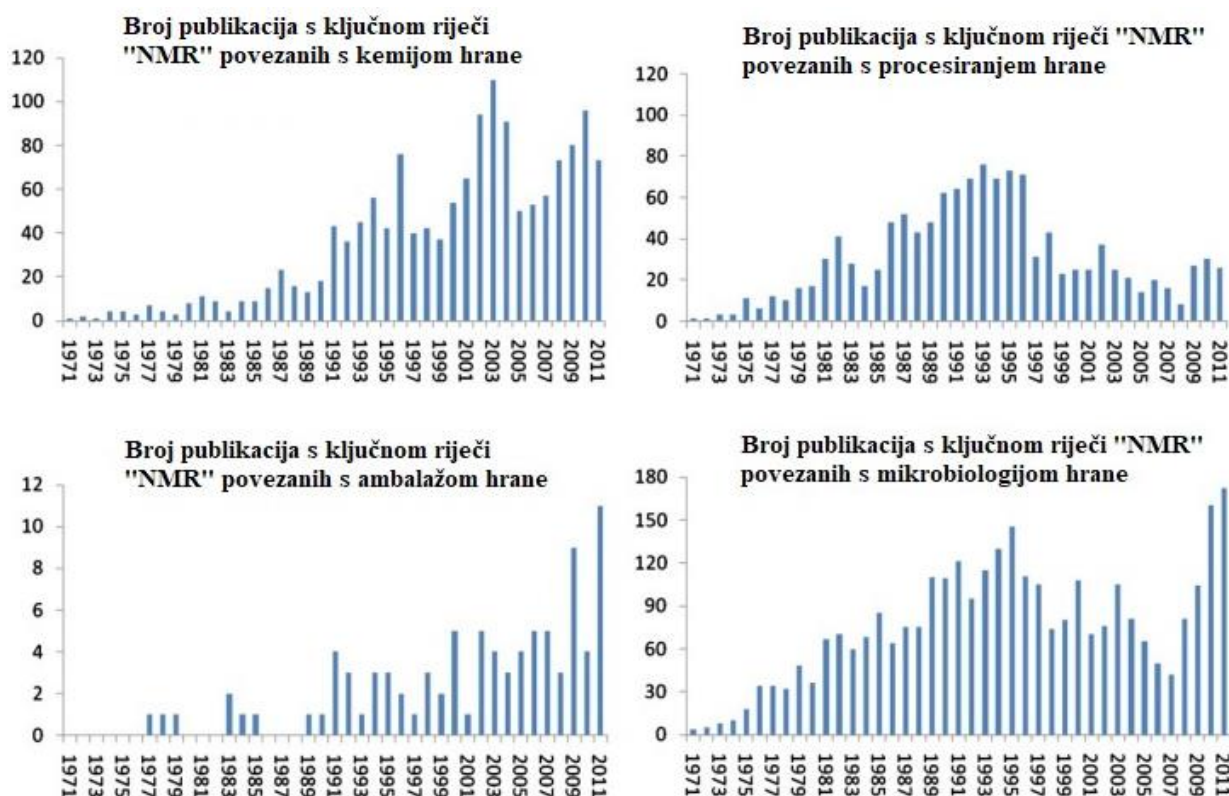
Unatoč nabrojanim prednostima, kemijske informacije sadržane u dobivenom spektru uzorka dovoljne su za identifikaciju samo 50-100 metabolita odjednom što je znatno manje nego kod primjerice LC-MS metode koja i pri manjim koncentracijama uzorka može identificirati više od 1000 metabolita. Iz toga se može zaključiti da je veliki nedostatak spektroskopije NMR naspram masene spektroskopije u njenoj slabojoj osjetljivosti (tablica 1.).

Tablica 1. Komparativne prednosti i nedostaci NMR i MS (Emwas i sur., 2019).

	Spektroskopija NMR	Masena spektroskopija
Reproducibilnost	Visoka reproducibilnost (glavna prednost metode).	Niska reproducibilnost.
Selektivnost	Uglavnom korištena za neselektivne analize.	Selektivna metoda, iako sprega s kromatografijom predstavlja moćniji alat za ciljane analize.
Osjetljivost	Niska osjetljivost, ali se može poboljšati nekim modifikacijama metode.	Visoka osjetljivost (glavna prednost metode).
Provođenje mjerenja	Odgovarajućom koncentracijom uzorka daje rezultat u jednom mjerenju što je čini relativno brzom metodom.	Različite metode ionizacije potrebne su za povećanje broja detektiranih metabolita.
Priprema uzorka	Jednostavna priprema uzorka.	Zahtjevna priprema uzorka.
Destruktivnost	Nedestruktivna metoda (ne oštećuje uzorak koji se stoga može podvrgnuti drugim analizama).	Destruktivna metoda, ali potrebne male količine uzorka.
Kvantitativna analiza	Kvantitativna metoda jer je intenzitet signala izravno proporcionalan koncentraciji metabolita i broju atomskih jezgri.	Intenzitet signala nije u vezi s koncentracijom.
Broj detektiranih metabolita	Ovisno o rezoluciji metode, identificira i detektira manje od 200 metabolita u uzorku.	Pri niskim koncentracijama detektira tisuće metabolita.

2.2. NMR METABOLOMSKA ANALIZA PREHRAMBENIH PROIZVODA

Spektroskopija NMR je jedna od najviše korištenih metoda za određivanje molekulske strukture spojeva kao i praćenje tijeka kemijskih i biokemijskih reakcija. Razvojem metode i instrumentarija krajem 20. stoljeća započela je njena sve veća primjena u kvantifikaciji fizikalno-kemijskih svojstava hrane (slika 2.). Širok spektar istraživanja obuhvaća razna područja, kao npr. znanost o hrani, procesiranje namirnica, prehrambeno inženjerstvo, odabir odgovarajuće ambalaže te kemiju i mikrobiologiju namirnica (Marcone i sur., 2013).



Slika 2. Distribucija znanstvenih publikacija s obzirom na primjenu spektroskopije NMR u području znanosti o hrani i prehrambene tehnologije u periodu od 1971. do 2011. (Marcone i sur., 2013).

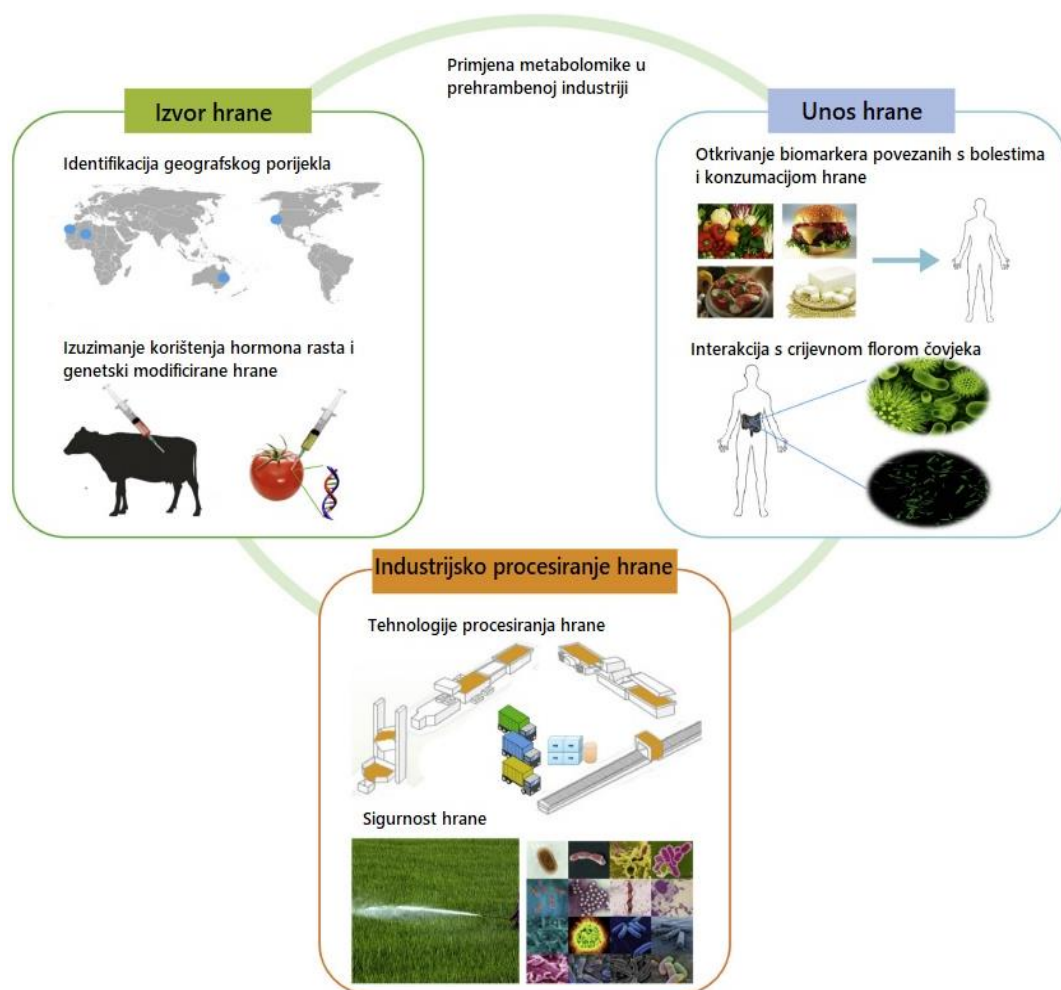
Najčešće promatrani parametri NMR-spektra su kemijski pomak, konstanta sprege i površina ispod signala. Kemijski pomak određuje položaj signala na NMR-spektru i pruža informacije o kemijskoj okolini u kojoj se jezgra nalazi. Jezgre zasjenjene gustim elektronskim oblacima rezoniraju pri nižim kemijskim pomacima, dok jezgre u blizini elektron-odvlačećih elektronegativnih atoma (npr. kisika) „osjećaju“ manji utjecaj elektrona i rezoniraju pri višim frekvencijama. Skalarna sprega nastaje interakcijom spinova protona na susjednim atomima i

rezultira cijepanjem signala NMR-spektra. Tako dobiveni signali složeniji su i ovise o udaljenosti i orijentaciji jezgara zbog čega su od velike važnosti prilikom strukturne karakterizacije. Visina pika signala, odnosno površina ispod signala proporcionalna je broju jezgara.

Hrana je heterogeni i izrazito kompleksan materijal sačinjen od različitih molekula poput vode, lipida, ugljikohidrata, proteina te velikog broja mikronutrijenata. S obzirom da je spektroskopija NMR kvantitativna metoda, dajući vezu između broja prisutnih neekvivalentnih atomskih jezgara i zabilježenih signala spektra, pogodna je za analizu namirnica i njihovih komponenti. Dobiveni spektri daju nam vrijedne informacije o nutritivnoj vrijednosti namirnica što je bitno i za potrošača, ali i za daljnje unaprjeđenje kvalitete istih. Nadalje, upoznaje nas поближе s fizikalno-kemijskim svojstvima namirnice koja treba uzeti u obzir prilikom procesiranja, skladištenja i transporta. Uz pomoć NMR-spektara u mogućnosti smo klasificirati i razumjeti molekulske mehanizme i interakcije spojeva prisutnih u hrani. Praćenje kvalitete prehrambenih proizvoda od iznimne je važnosti za zdravstvenu ispravnost namirnica. U nekim slučajevima se, u svrhu poboljšanja prinosa zbog otežanog kontroliranja okoline uzgoja, koriste hormoni rasta (testosteron, progesteron, auksin i giberelin) i genetska modifikacija. Neki od pritom korištenih hormona danas su zabranjeni zbog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Za njihovu se detekciju i kontrolu korištenja odnedavno koristi NMR-metabolomska analiza (Kim i sur., 2016). Povećanjem proizvodnje i potražnje hrane na svjetskoj razini važnost se pridaje ispravnom navođenju geografskog porijekla i starosti te praćenju mogućeg patvorenja, što vrlo često nadilazi službene analitičke metode temeljene na istraživanju jednog određenog spoja. NMR spektroskopija pruža alternativu tradicionalnim analitičkim metodama zbog svoje moći detektiranja više vrsta kemijskih spojeva istovremeno. Spregnuta s metabolomikom stvara moćno oružje za primjenu u ciljanim analizama (istraživanju specifičnih kemijskih spojeva) ili neciljanim analizama, pritom dajući pregled metabolita prehrambenog proizvoda koji se ispituje. Upravo iz tog razloga, NMR-metabolomika u svrhu određivanja kvalitete igra važnu ulogu pri autentifikaciji prehrambenih proizvoda (Consonni i Cagliani, 2018).

Metabolom sadržan u hrani određuje nutritivnu vrijednost i različita fizikalno-kemijska svojstva hrane (teksturu, okus, obojenje, itd.) koja se mogu bitno promijeniti tijekom procesiranja, skladištenja i transporta. Učinke konvencionalnih procesa na navedena svojstva, odnosno metabolički profil hrane moguće je pratiti i evaluirati metabolomikom. Isto tako, u svrhu kontrole zdravstvene ispravnosti namirnica metabolomska analiza omogućuje detekciju kemijskih onečišćenja i patogena nastalih kvarenjem. Brza i pouzdana analiza kemijskih

onečišćenja u hrani ključna je za sprječavanje kratkoročnih i dugoročnih zdravstvenih prijetnji nastalih zaostatkom kemikalija korištenih u proizvodnji hrane (npr. pesticida). Biofilmovi prirodno prisutnih patogenih bakterija u hrani poput *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* i *Listeria*, predstavljaju veliku opasnost i problem pri procesiranju. Kako bismo bolje razumjeli metaboličke procese iza stvaranja biofilмова možemo ih izučavati primjenom NMR-metabolomske analize, a dobiveni podaci služe za prevenciju stvaranja samih biofilмова te razvoj lijekova i terapija za bolesti povezane s trovanjem hranom (Kim i sur., 2016). Nadalje, metabolomska analiza pomaže u procjeni pozitivnog i negativnog učinka određene hrane ili dijete identifikacijom novih biomarkera ovisnih o prehrani (slika 3.).



Slika 3. Tri glavne primjene metabolomike u prehranbenoj industriji, od farme do čovjeka: proizvodnja izvora hrane, industrijsko procesiranje hrane i prehrana (Kim i sur., 2016).

Rezultati mnogih istraživanja pokazali su da specifična hrana i način prehrane imaju velik utjecaj na metabolizam aminokiselina i lipida povezan sa ljudskim zdravljem te da je

metabolomika učinkovit i koristan alat za otkrivanje metaboličkih promjena uzrokovanih prehranom i analizu obrazaca prehrane za nutricionistička epidemiološka istraživanja (Kim i sur., 2016).

2.3. NMR METABOLOMSKA ANALIZA MEDA

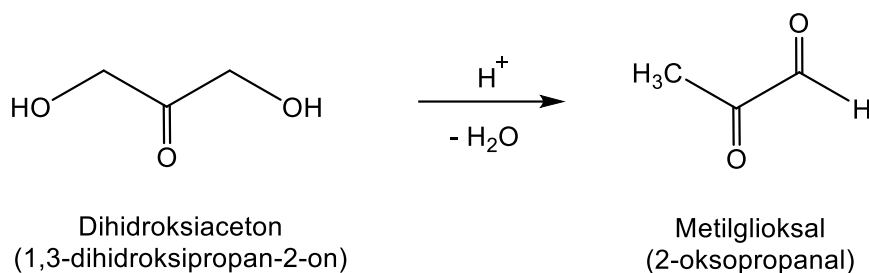
Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda, med je prirodno sladak proizvod kojeg medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (NN53/2015: Pravilnik o medu). Jedini je zaslađivač kojeg je moguće koristiti bez prethodnog procesiranja i izrazito je vrijedan i cijenjen proizvod širom svijeta zbog svog vrijednog nutritivnog sastava, okusa i arome te antibakterijskog i antioksidacijskog djelovanja (primjerice, pomaže u liječenju ozljeda, opekline i infekcija). Bogat je ugljikohidratima, proteinima, aminokiselinama, organskim kiselinama, flavonoidima, vitaminima, mineralima i hlapljivim spojevima. Kemijski gledano, med je složena smjesa više od 70 različitih spojeva od kojih najviše prevladavaju glukoza i fruktoza čineći ~ 99% meda. Unatoč ubrzanom razvoju analitičkih metoda, potpuni sastav meda nije sasvim razjašnjen, no nepoznavanje sastava otežava vještačku industrijsku proizvodnju i patvorenje proizvoda (Šarić i sur., 2020).

U posljednjih nekoliko godina patvorenje meda postalo je negativna praksa prvenstveno izvedena razjeđivanjem vodom, dodatkom drugih jeftinih zaslađivača (šećer šećerne trske i repe, fruktozni i maltozni sirupi) i namjernim pogrešnim deklariranjem botaničkog i geografskog porijekla. Utvrđivanje geografskog porijekla uglavnom se provodi analizom polena što u praksi ima svoja ograničenja koja leže u osposobljavanju visoko specijaliziranih analitičara s ujednačenim znanjem o morfologiji polena. Za točnu procjenu botaničkog porijekla meda potrebno je pratiti senzorska i fizikalno-kemijska svojstva meda poput boje, pH i ukupne kiselosti, okusa, vlažnosti, sastava ugljikohidrata, udjela prolina, aktivnosti invertaze i diastaze, električne vodljivosti i optičke aktivnosti (Consonni i Cagliani, 2018).

2.3.1. Utvrđivanje botaničkog porijekla meda novozelandskog čajevca

U posljednjih nekoliko godina, med novozelandskog čajevca (lat. *Leptospermum scoparium* L.) ili manuka med, dobiven iz nektara autohtone biljke s Novog Zelanda i nekih

predjela Australije, izazvao je velik interes ne samo znanstvenika već i potrošača širom svijeta zbog svoje iznimne antimikrobne aktivnosti. Spoj odgovoran za ovakvu aktivnost je metilglioksal (MGO), prirodni karbonilni spoj nastao kiselo-kataliziranom dehidracijom dihidroksiacetona (DHA) tijekom sazrijevanja meda (slika 4.). MGO posjeduje tzv. neperoksidnu aktivnost (eng. *nonperoxide activity*, NPA) koja određuje tržišnu vrijednost meda (Chernyshev i Braggins, 2020). Povećana potražnja potrošača za manuka medom dovela je do povećanja njegove cijene, uslijed čega se bilježi sve učestalije patvorenje.



Slika 4. Pretvorba dihidroksiacetona (DHA) u metil-glioksal (MGO).

Kontrola kvalitete manuka meda vrši se kao i kod drugih vrsta meda, ali uz određene posebnosti. Prema AOAC 998.12 metodi (eng. *Association of Analytical Collaboration*), manuka med ne smije sadržavati više od 7% C4 šećera. Izraz „C4 šećeri“ odnosi se na C4 metabolizam kao jedan od tri poznata biokemijska puta za sintezu ugljikohidrata u biljkama, a koji je karakterističan za biljke u toplijim i tropskim područjima. Različiti biokemijski putevi sinteze ugljikohidrata rezultiraju i različitim frakcioniranjem ¹³C izotopa u nastalim šećerima. Osim šećera, u medu su prisutni i proteini (do 2%). Kako su šećeri prekursori u biosintezi aminokiselina i proteina u biljkama, izotopni sastav šećera i proteina vrlo je sličan. Međutim, ukoliko se u med doda C4 šećer radi patvorenja, doći će do pomaka signala ¹³C-atoma u šećernoj frakciji meda, dok će pomak ¹³C-atoma u proteinskoj frakciji ostati nepromijenjen. Prema tome, razlika u kemijskim pomacima ¹³C-atoma u medu i njegovim proteinima služi kao analitički marker za procjenu postotnog udjela C4 šećera u medu (Chernyshev i sur., 2020).

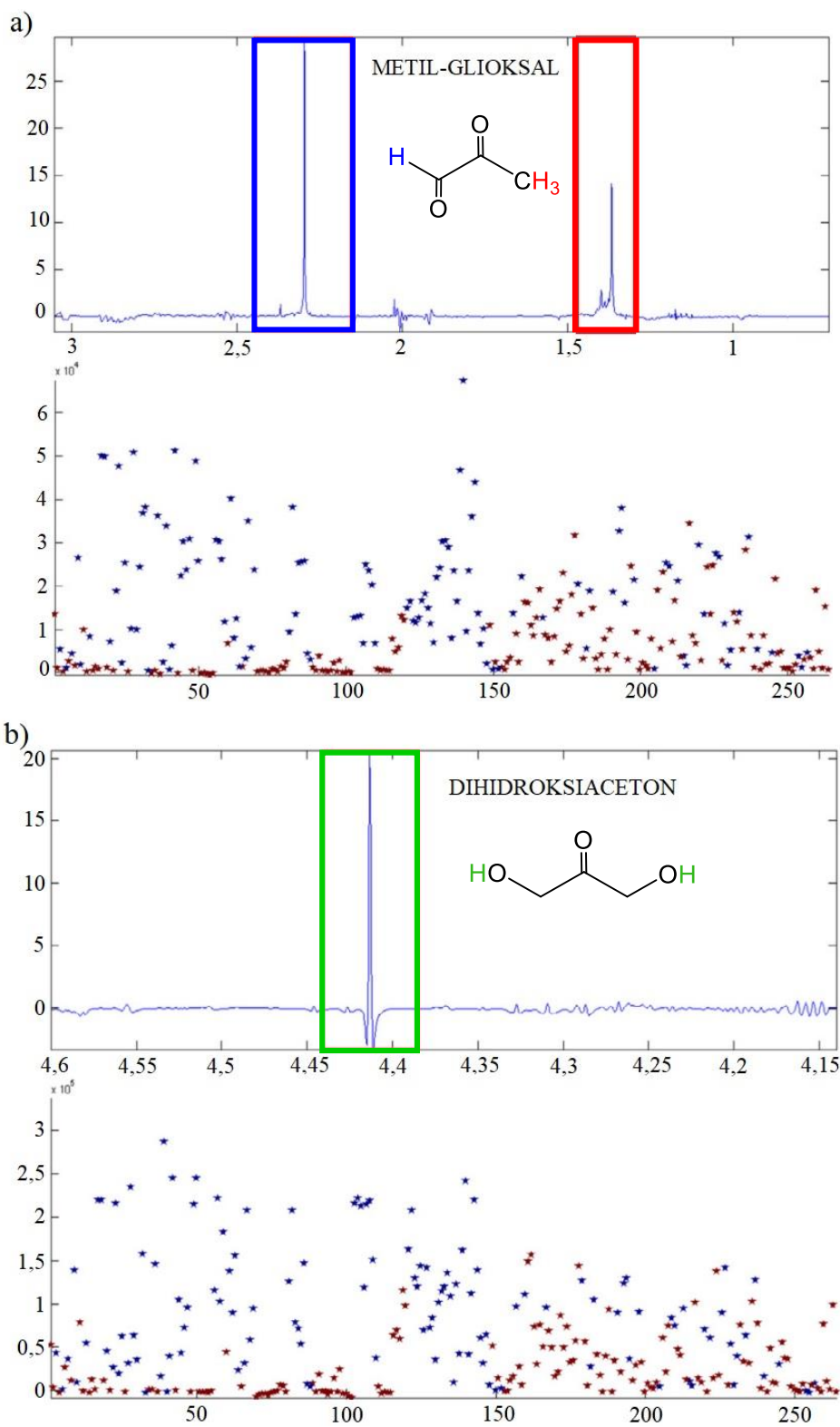
Međutim, pokazalo se da manuka med s udjelom MGO većim od 250 mg/kg, odnosno sazreli med, može dati lažno pozitivan rezultat u C4 testu. Osim toga, melisopalinologija ili peludna analiza kao glavna metoda za utvrđivanje botaničkog i zemljopisnog porijekla meda ne daje pouzdane rezultate zbog velike morfološke sličnosti peluda iz kojeg nastaje manuka

med i peluda biljke kanuka (lat. *Kunzea ericoides*) čiji nektar ne sadrži DHA kao ni MGO (Spiteri i sur., 2017).

Spektroskopija NMR pruža rješenje u analitici manuka meda, posebice u kvantifikaciji njegova dva specifična metabolita, DHA i MGO. U istraživanju provedenom 2017. godine na 264 uzorka meda sakupljena na Novom Zelandu i Australiji, prvotni cilj je bio pronaći glavne razlike manuka meda u odnosu na druge vrste, posebice kanuka med koji mu je po sastavu nasličniji. Za izdvajanje signala iz dobivenih spektara korištena je analiza nezavisnih komponenti (ICA, eng. *Independent Compound Analysis*) kako bi se odredio broj nezavisnih spojeva ključnih za razlikovanje uzoraka. Signal pri 2,30 ppm pripada vodikovom atomu iz aldehidne skupine, a signal pri 1,38 ppm pripada vodikovim atomima iz metilne skupine MGO-a (slika 5., a), dok se DHA detektira signalom pri 4,41 ppm kojeg daju protoni dviju hidroksilnih skupina (slika 5., b).

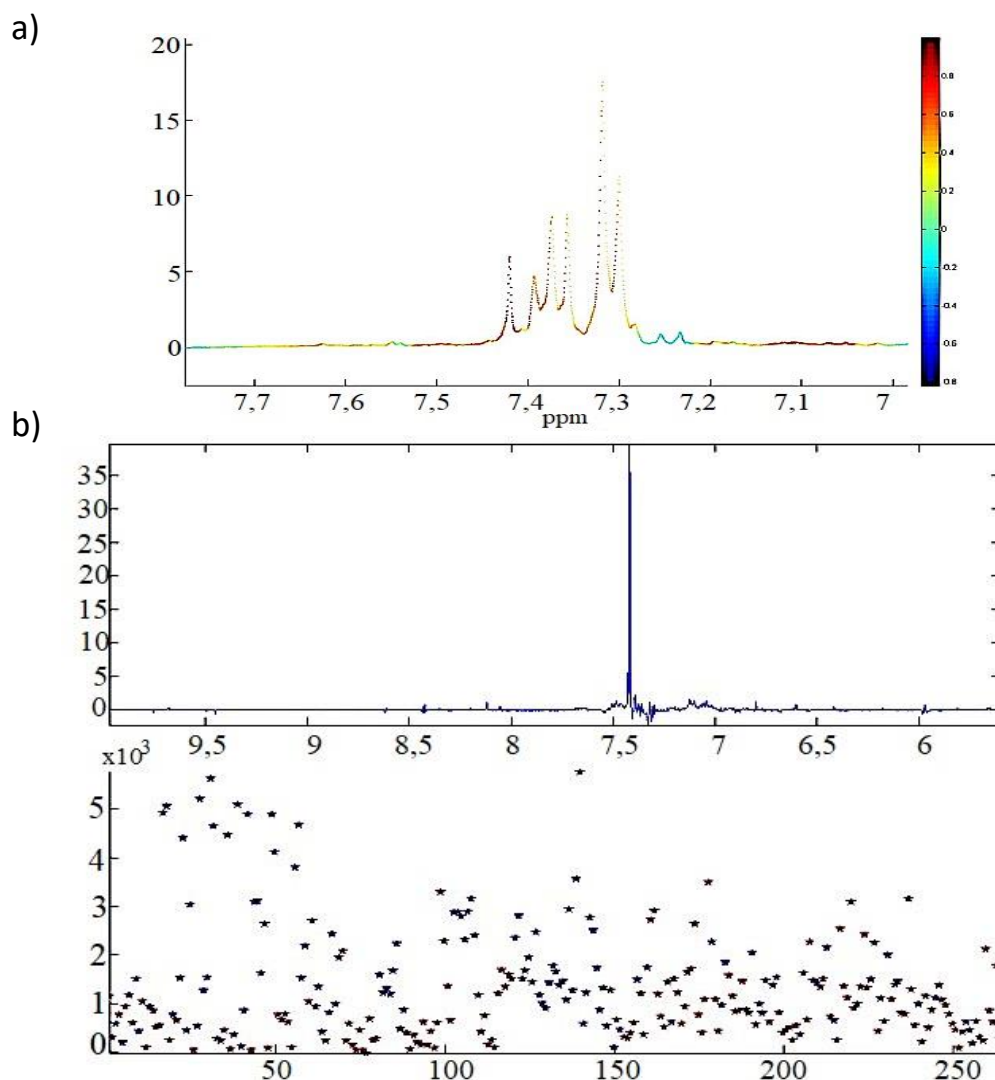
DHA je prekursor MGO, zbog čega visoka koncentracija DHA posljedično znači nisku koncentraciju MGO što je svojstveno svježem medu, a obrnuto ukazuje na zreli med u kojem je gotovo sav DHA pretvoren u MGO. Određeni omjer DHA i MGO pronađen je u višecvjetnim medovima koji mogu sadržavati dio manuka meda (Spiteri i sur., 2017).

Visoki kemijski pomaci vodikovih atoma vezanih na sp^2 -hibridizirane C-atome u aromatskim molekulama i alkenima objašnjeni su dijamagnetskom anizotropijom. Pod utjecajem vanjskog magnetskog polja π -elektroni generiraju struju π -elektrona iz aromatskog prstena inducirajući magnetsko polje i tako pojačavajući efektivno magnetsko polje. Zbog toga protoni aromatskih spojeva rezoniraju pri višim frekvencijama i imaju veći kemijski pomak koji se u NMR-spektru nalazi između 7 i 8 ppm.



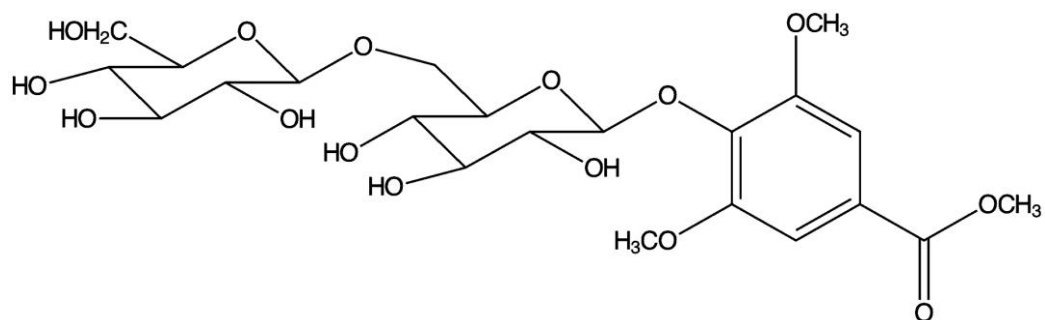
Slika 5. Signali a) metil-glioksala i b) dihidroksiacetona izdvojeni analizom nezavisnih komponenti: iznad su izdvojeni signali, a ispod omjer signala (plavi signali odgovaraju manuka medu, dok crveni signali odgovaraju ostalim medovima (Spiteri i sur., 2017).

Iz spektra na slici 6. vidljiv je singlet pri 7,42 ppm koji ukazuje na prisustvo aromatskog spoja u manuka medu. Njegovim uspoređivanjem s komercijalnim standardima poput 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline i metil-siringata nije utvrđena nikakva povezanost.



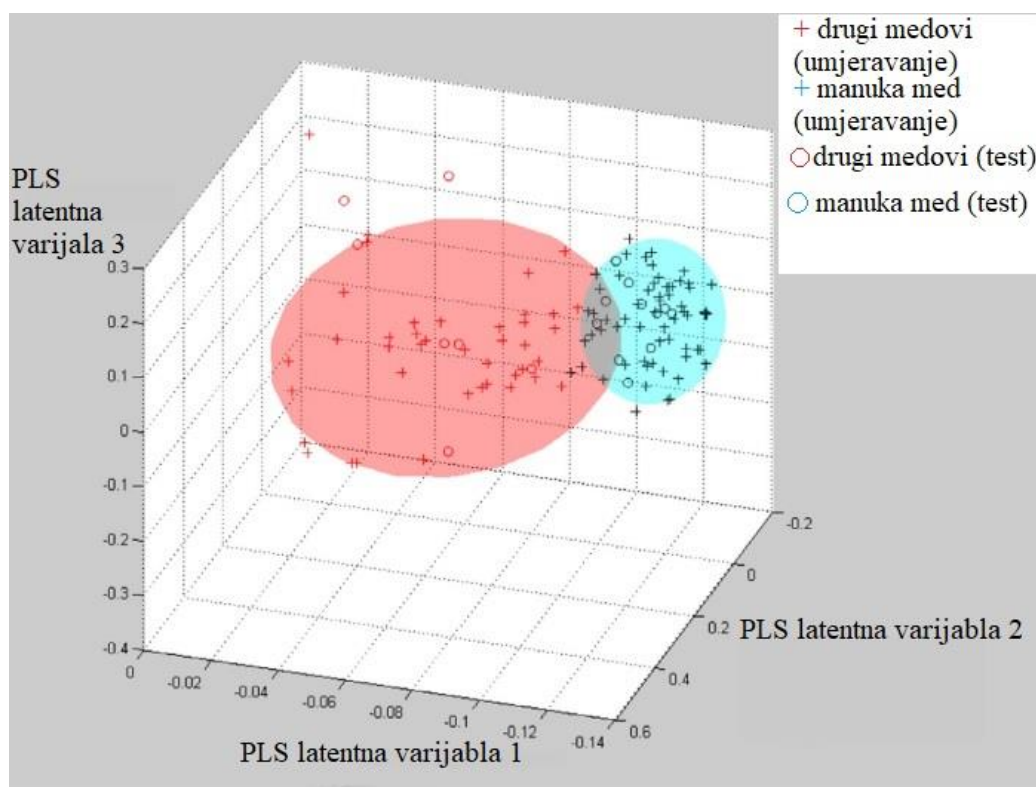
Slika 6. a) Bojanje regije raspona 7-7,8 ppm na temelju povezanosti s DHA: pik pri 7,42 ppm ukazuje na povezanost s DHA i b) Signal izdvojen analizom nezavisnih komponenti manuka meda: iznad je signal koji odgovara aromatskom spoju, a ispod omjeri signala u pojedinačnom uzorku. Manuka medovi označeni su plavom, a ostali crvenom bojom (Spiteri i sur., 2017).

Daljnjom analizom otopina manuka meda u vodi i metanolu dobiveni su singleti na 7,34 ppm iz kojih je zaključeno da nepoznati signal pripada leptosperinu (slika 7.) – bioaktivnoj molekuli izoliranoj iz manuka meda i identificiranoj 2012. godine (Spiteri i sur., 2017). Otkriće leptosperina uvelike pomaže analitičarima u suzbijanju krivotvorenja manuka meda, budući da se MGO i DHA mogu naknadno dodati u med s ciljem krivotvorenja rezultata analize.



Slika 7. Kemijska struktura leptosperina.

Regresija parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS-DA) predstavlja algoritam za modeliranje i selekciju varijabli. Metoda je posebno učinkovita za modeliranje višedimenzijjskih skupova podataka u analizi hrane, klasificiranju bolesti u medicinskoj dijagnostici te analizi dokaza u forenzici (Lee i sur., 2018). Korištenjem PLS-DA modela manuka med se može razlikovati od medova drugih botaničkih porijekla (slika 8.).



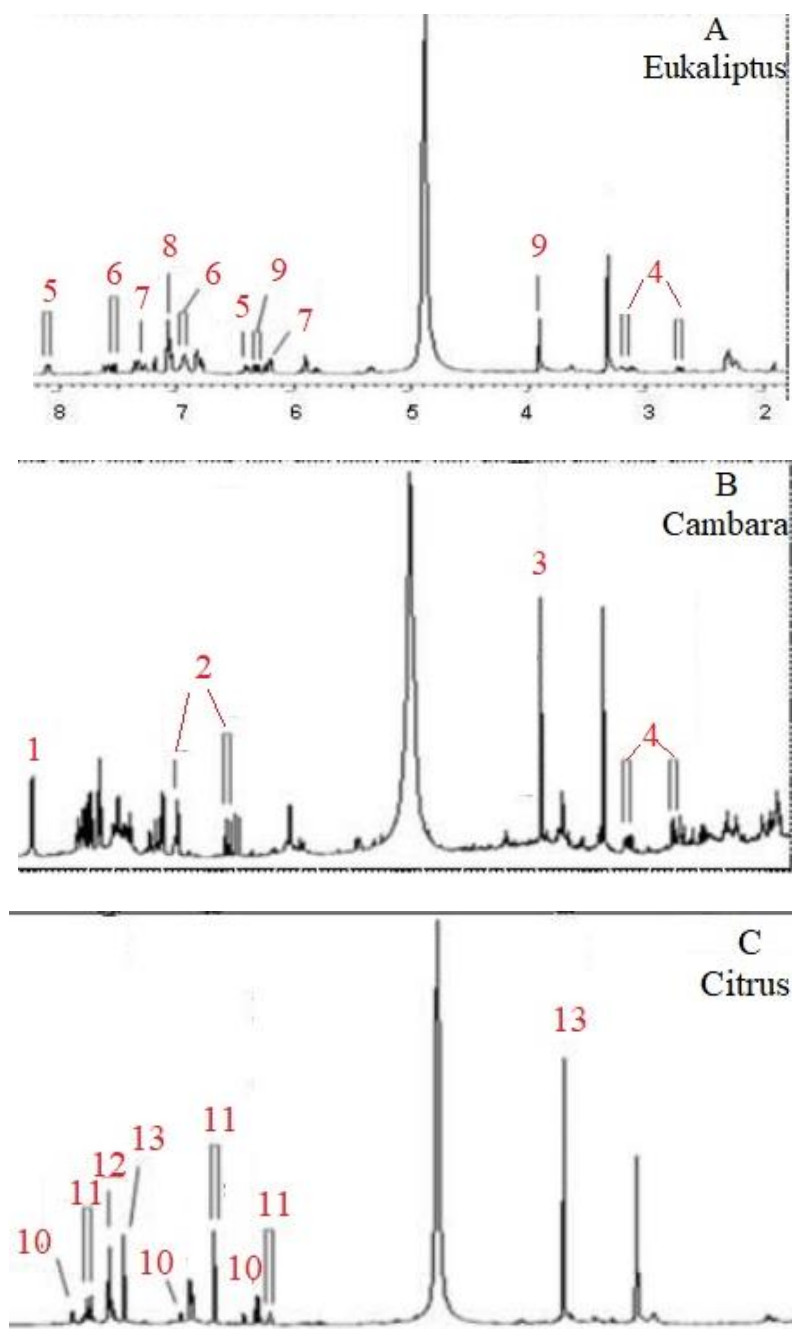
Slika 8. Međusobno razlikovanje 100%-tnog manuka meda i drugih cvjetnih medova primjenom PLS-DA modela kombinirajući tri karakteristična markera (Spiteri i sur., 2017).

Označeno plavo područje dobivenog PLS-DA modela pripada uzorcima manuka meda, a minimalno preklapanje s crvenim područje pokazalo je uspješno razlikovanje manuka meda od ostalih cvjetnih medova koristeći MGO, DHA i leptosperin kao parametre razlikovanja.

2.3.2. Utvrđivanje botaničkog porijekla brazilskih medova

U svrhu klasifikacije botaničkog porijekla brazilskih medova Salgueiro i sur. proveli su ^1H NMR spektroskopsku analizu spregnutu s kemometrikom analizirajući 53 uzorka medova vrsta *Citrus* (konkretno naranče), *Eucalyptus* i *Cambara*. Dobiveni NMR-spektri pokazali su karakteristične signale polifenolnih spojeva prikazane na slici 9. i izlistane u tablici 2. s njihovim kemijskim pomacima. Kemijske strukture navedenih spojeva prikazane su na slici 10.

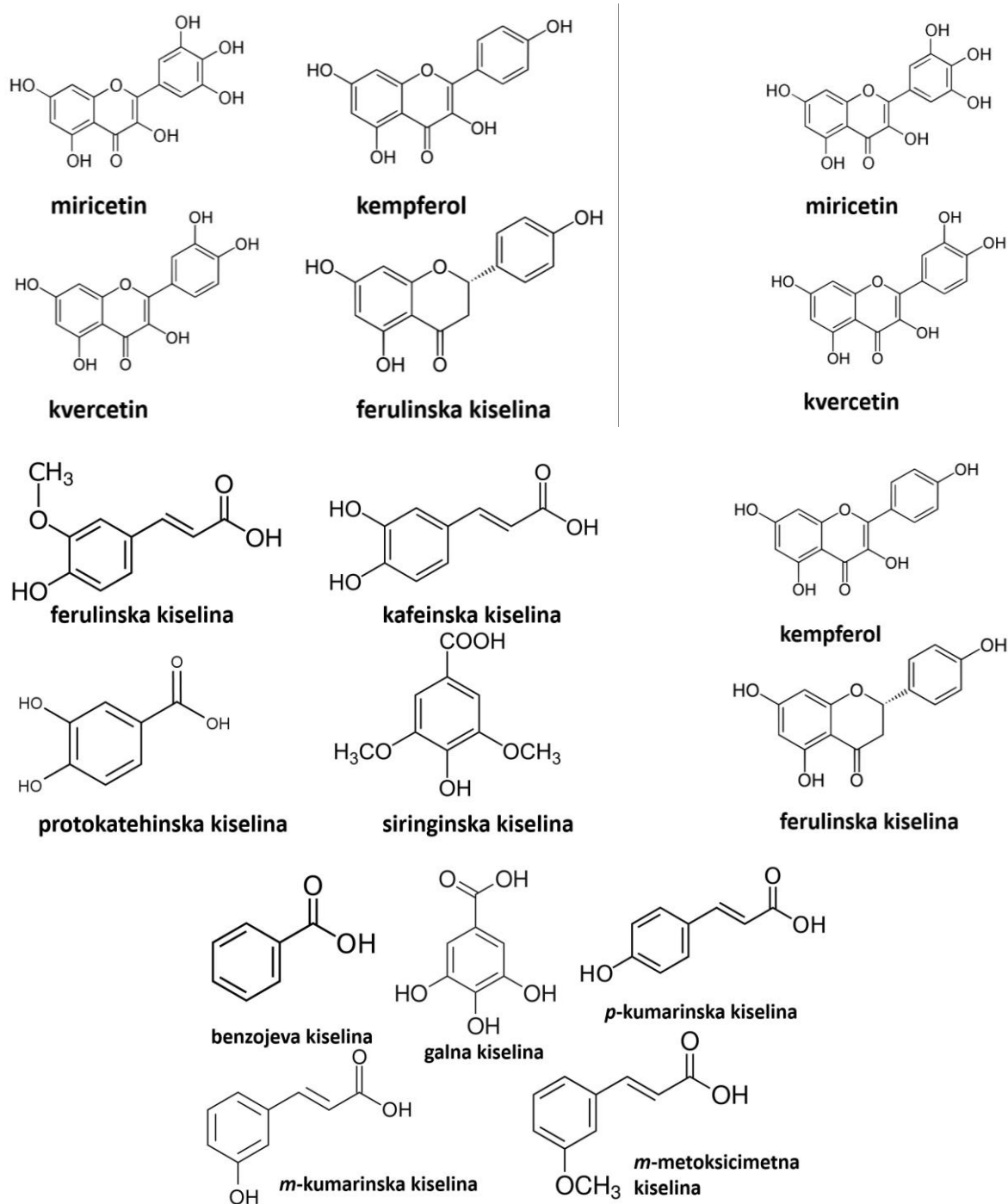
Slika 9. ^1H NMR spektri medova (A) eukaliptusa, (B) cambare i (C) naranče (Salgueiro i sur., 2016). (Brojevi iznad signala odgovaraju fenolnim spojevima iz tablice 2.)



Tablica 2. Kemijski pomaci u ^1H NMR spektrima fenolnih spojeva iz analiziranih medova (Salgueiro i sur., 2016).

Broj spoja	Naziv spoja	NMR-signal (kemijski pomak, cijepanje signala, pripadajući vodikov atom)
1	benzojeva kiselina	8,04 (dd, H1, H6)
2	<i>m</i> -kumarinska kiselina	6,41 (dd, H- β), 7,86 (dd, H- α)
3	<i>m</i> -metoksicimetna kiselina	3,84 (s, OMe)
4	naringenin	2,7 (dd, H3), 3,09 (dd, H3)
5	kempferol	8,08 (d, H2', H6'), 6,41 (d, H8)
6	kafeinska kiselina	7,53 (d, H- α), 6,93 (dd, H6)
7	miricetin	7,28 (s, H-2'), 6,21 (d, H-6)
8	galna kiselina	7,08 (d, H2, H6)
9	ferulinska kiselina	6,47 (d, H- β), 3,90 (s, OMe)
10	kvercetin	6,89 (d, H5'), 6,40 (d, H8), 6,19 (d, H6)
11	<i>p</i> -kumarinska kiselina	7,60 (d, H- α), 6,28 (d, H- β), 6,80 (d, H3, H5)
12	protokatehinska kiselina	7,46 (dd, H1, H6)
13	siringinska kiselina	7,32 (s, H2, H6), 3,87 (s, 2xOMe)

s - singlet; d - dublet; dd - dublet dubleta

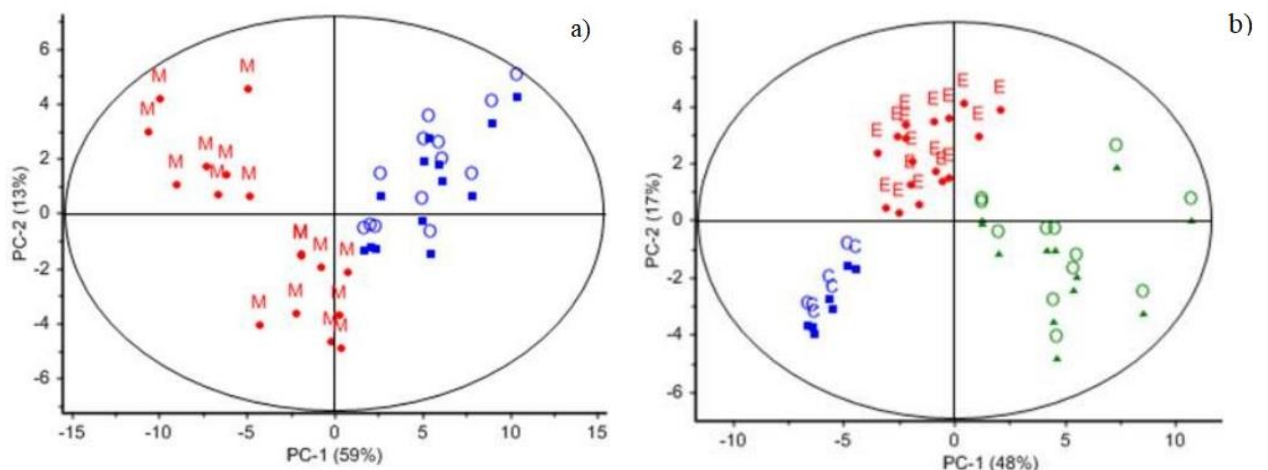


Slika 10. Kemijske strukture fenolnih spojeva pronađenih u medovima (Salguiero i sur., 2016).

Spektroskopija NMR zajedno s kemometrikom pokazala se učinkovitom u zamjeni melisopalinologije u svrhu klasifikacije botaničkog porijekla medova. Kao što je već navedeno, peludna analiza meda nailazi na prepreke, od kojih je najveća u poznavanju morfoloških karakteristika zrnaca i njihovom razlikovanju, odnosno pronalasku stručnog osoblja. Sastojci

meda pojavljuju se u različitim omjerima ovisno o sezonskim i okolišnim čimbenicima pa tako i sastav ukupnih fenolnih spojeva, koji služe kao biomarkeri pri identifikaciji medova i njihovoj klasifikaciji po botaničkom porijeklu. Specifični biomarkeri pronađeni u medovima vrste *Eucaliptus* bili su miricetin, kempferol, naringenin, galna, kafeinska i ferulinska kiselina. Kod medova vrste *Citrus* to su bili kvarcetin, *p*-kumarinska kiselina kao i siringinska i protokatehinska kiselina. Fenolni profil meda *Cambare* sastojao se od *m*-metoksicimetne, *m*-kumarinske i benzojeve kiseline te naringenina.

Dobiveni NMR-podaci bili su dodatno analizirani PCA metodom (eng. *Principal Component Analysis* – metoda glavnih komponenata). Metoda glavnih komponenata jedna je od najjednostavnijih metoda multivarijatne statistike čiji je cilj reducirati dimenzionalnost podataka, a sačuvati njihovu varijabilnost (Groth i sur., 2013). Prvi prikaz uključivao je med naranče i višecvjetne medove, a drugi jednocvjetne medove vrsta *Eucalyptus*, *Cambara* i *Citrus*. Obje provedene analize su pružile zadovoljavajuće rezultate u vidu prikaza međusobnog razlikovanja ispitivanih medova. Iz prikaza se jasno vidi da svaka vrsta meda zauzima posebne kvadrante s minimalnim preklapanjem, a najbolje razlikovanje postignuto je za medove vrste *Cambara* [slika 11 a) i b)]. Ovim je potvrđeno da fenolni spojevi i njihov sastav predstavljaju bitan biomarker prilikom razlikovanja medova te pripisivanja botaničkog porijekla olakšavajući tako identifikaciju biljnih vrsta u medovima upitnog sastava. Samim tim, spektroskopija NMR predstavlja dobru alternativu peludnoj analizi meda.



Slika 11. a) Rezultati PCA dobiveni iz ^1H NMR spektra meda naranče i višecvjetnih medova: (O) naranča i (M) višecvjetni ; b) Rezultat PCA dobiveni iz ^1H NMR spektra medova naranče (O), vrsta *Cambara* (C) i *Eucalyptus* (E) (Salgueiro i sur., 2016).

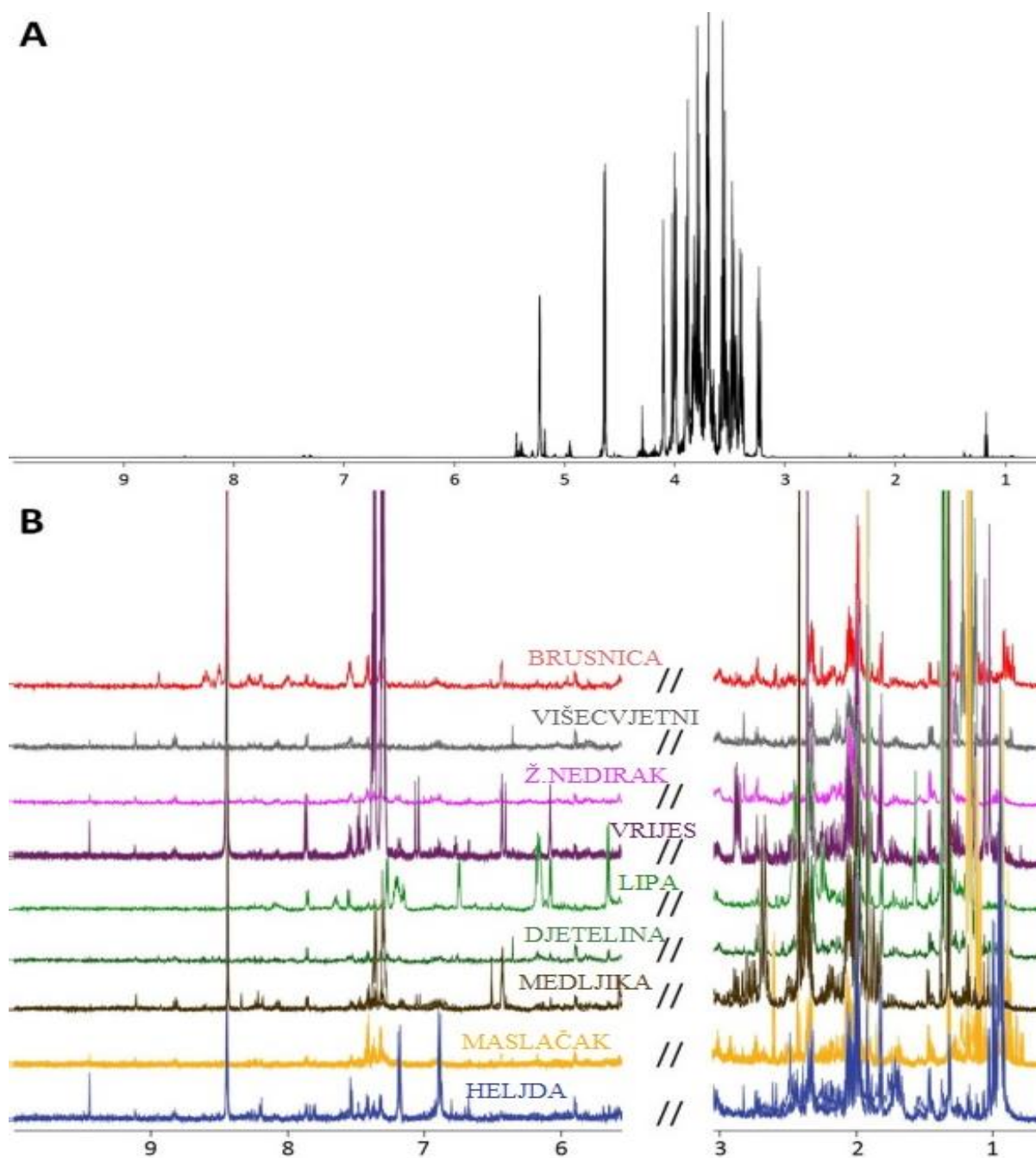
2.3.3. Utvrđivanje botaničkog porijekla finških medova

Proizvodnja jednocvjetnih medova u arktičkim i borealnim područjima otežana je zbog nepovoljnih uvjeta za rast određenih cvjetnih vrsta koje na ovom području cvjetaju sasvim slučajno. Stoga postoji velika vjerojatnost pronalaska peludnih zrnaca iz sekundarnih izvora što dodatno otežava karakterizaciju svojstava standardnim metodama. Iz tog razloga su sortni jednocvjetni finški medovi visoko cijenjeni. Primjenjujući spektroskopiju NMR analizirani su medovi heljde, djeteline, maslačka, vrijesa, žljezdastog nedirka, medljikovca, lipe, brusnice i višecvjetne medove, stavljajući naglasak na njihove vodene otopine (Kortesniemi i sur., 2016). NMR spektri analiziranih vodenih otopina medova prikazani su na slici 12., a naglašeni markeri odabranih uzoraka u različitim područjima spektra na slici 13.

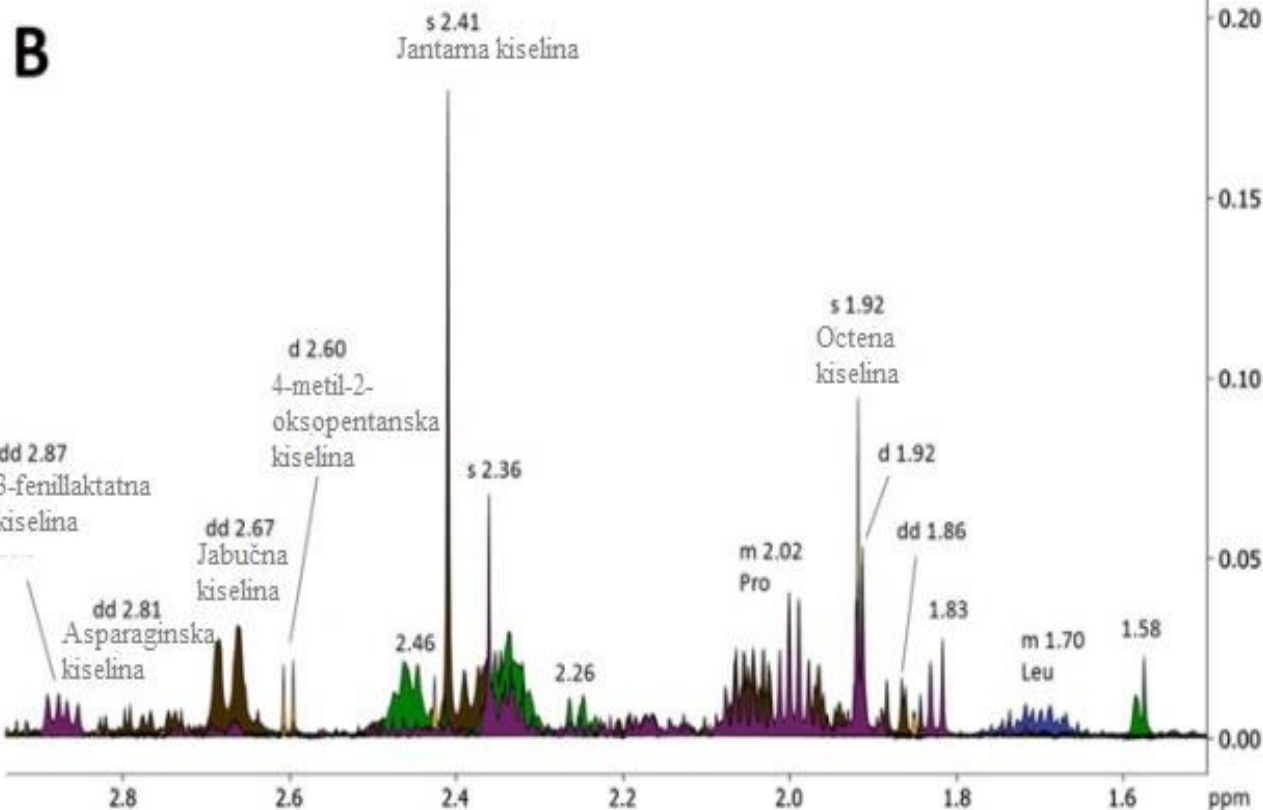
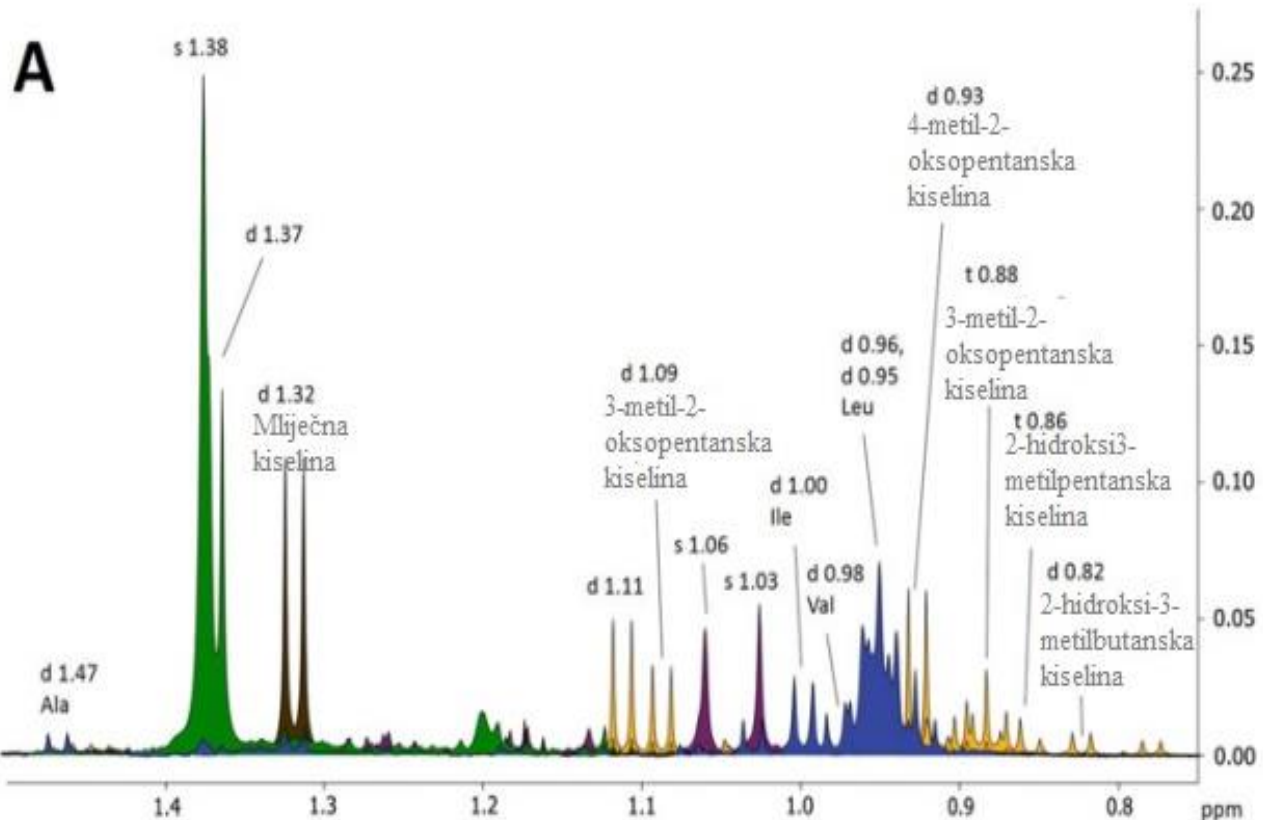
Analiza uzoraka meda heljde pokazala je visoke koncentracije Ile, Leu, Thr, Tyr i Val. Detektirani dubleti pri 7,80 ppm i 6,91 ppm pripadaju 4-hidroksibenzojevoj kiselini (slika 13., A, B i E). Tyr i 4-hidroksibenzojeva kiselina prethodnim su istraživanjima potvrđeni kao specifični markeri heljde. Signali pri 5,04, 6,67, 6,70 i 6,80 ppm nisu pripisani pripadajućim spojevima no mogu poslužiti kao pokazatelji botaničkog porijekla meda heljde (slika 13., E) (Kortesniemi i sur., 2016). Uzorci meda maslačka dali su signale pripisane 2-hidroksi-3-metilbutanskoj kiselini pri 0,82 i 0,96 ppm, zatim 2-hidroksi-3-metilpentanskoj kiselini pri 0,86 i 0,93 ppm, 3-metil-2-oksopentanskoj kiselini pri 0,88 i 1,09 ppm te 4-metil-2-oksopentanskoj kiselini pri 0,93 i 2,60 ppm (slika 13., A i B). Strukture navedenih spojeva prikazane su na slici 14. na kojoj su naznačeni i protoni kojima se pripisuju detektirani signali. U uzorcima meda lipe najviše su se istaknuli signali genciobioze predloženi kao markeri te vrste (slika 13., E). Za medove brusnice, žljezdastog nedirka, djeteline i višecvjetne medove nisu pronađeni specifični markeri. Specifični signal meda vrijesa očitao je pri 1,92 ppm (slika 13., B). U alifatskom dijelu spektra vidljivi su signali pri 1,03 i 1,06 ppm također karakteristični za med vrijesa (slika 13., A). Opaženi su i signali u aromatskom dijelu spektra koji pripadaju benzojevoj, 3-fenil-mliječnoj i fenil-octenoj kiselini, a zaslužni su za specifičnu aromu i miris meda (slika 13., E).

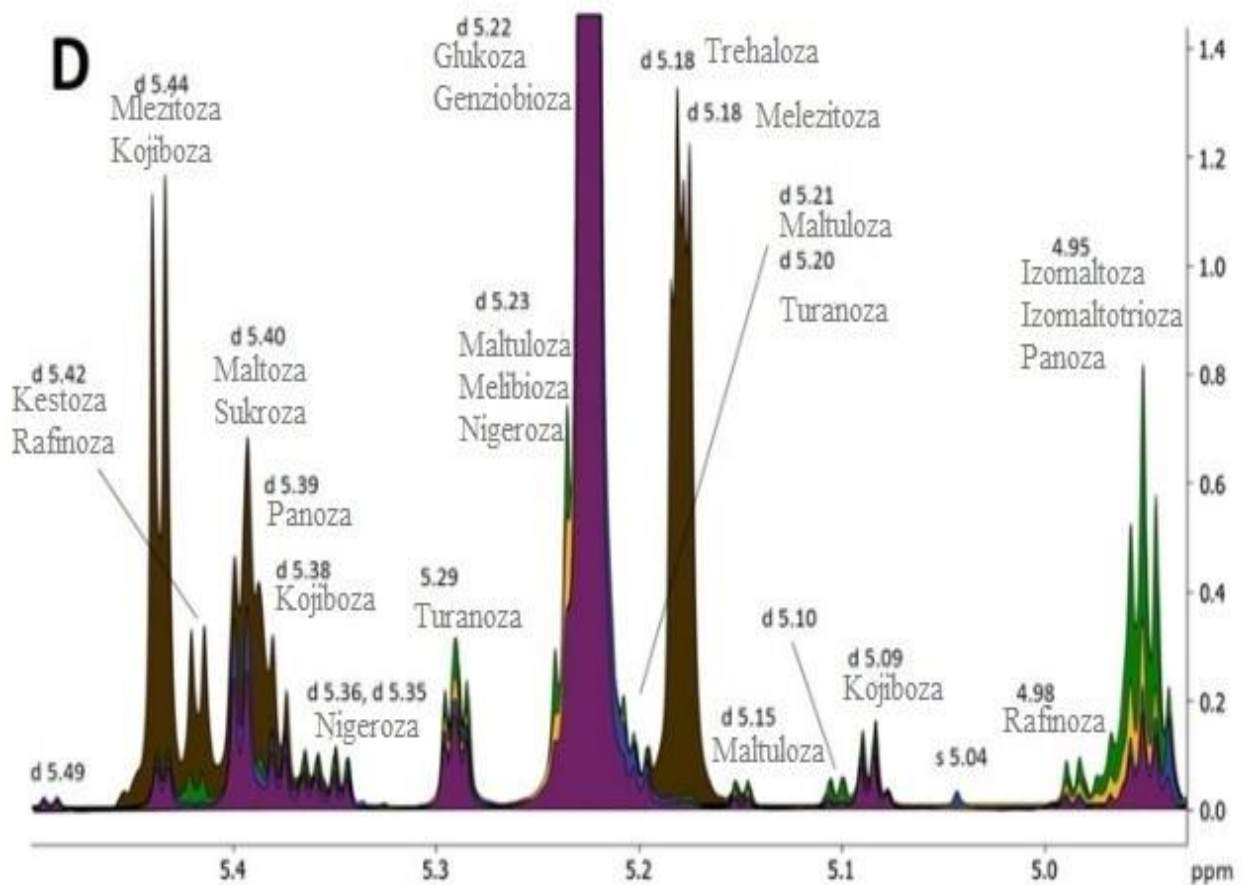
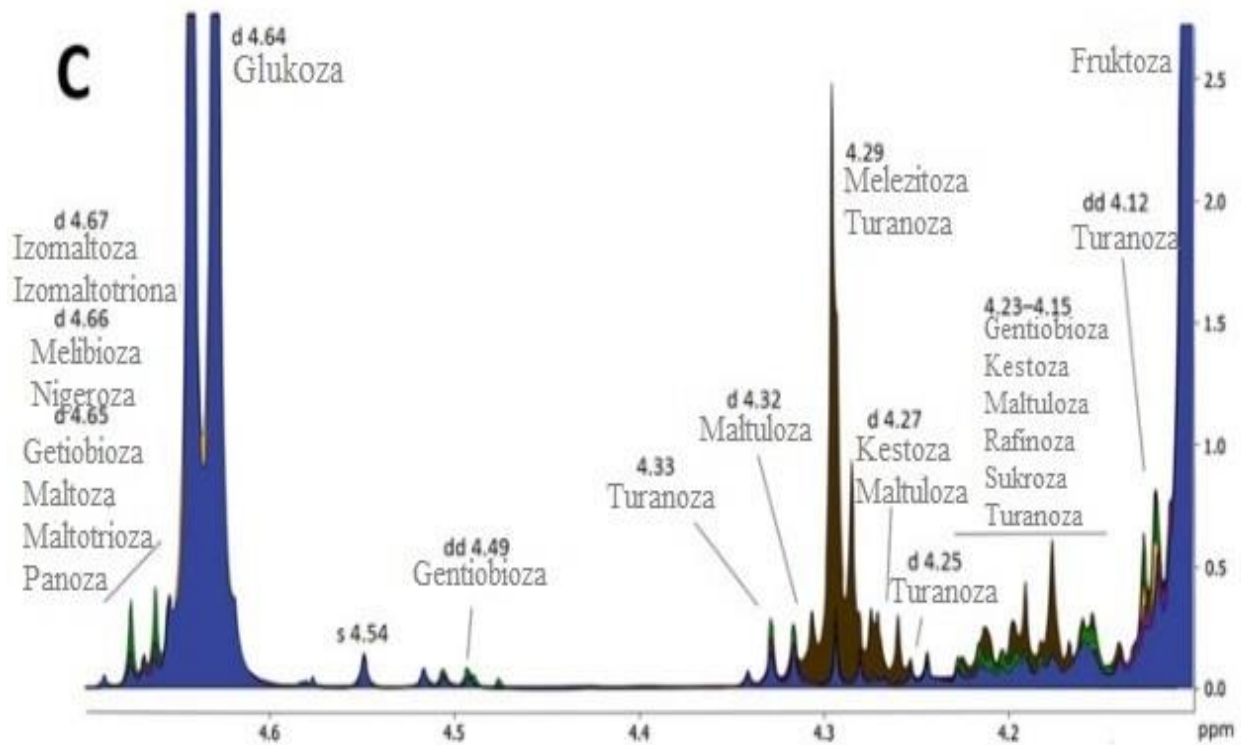
Sve vrste analiziranih medova pokazale su signale pripisane nekolicini di- i trisaharida: kojibioza, nigerioza, turanoza, izomaltotrioza, kestoza, melecitoza i rafinoza, a zbog preklapanja njihovih signala nije bila moguća njihova kvantifikacija (slika 13., C i D). Pri nižim koncentracijama detektirani su u svim medovima i trigonelin i uridin. Kao znakovi procesa fermentacije u nekim su uzorcima detektirani etanol i octena kiselina, posebice u medovima vrijesa i maslačka koji svojim visokim udjelom vlage omogućuju rast mikroorganizama koji potiču fermentaciju. Uz produkte fermentacije utvđen je i signal 5-hidroksimetilfurfurala pri

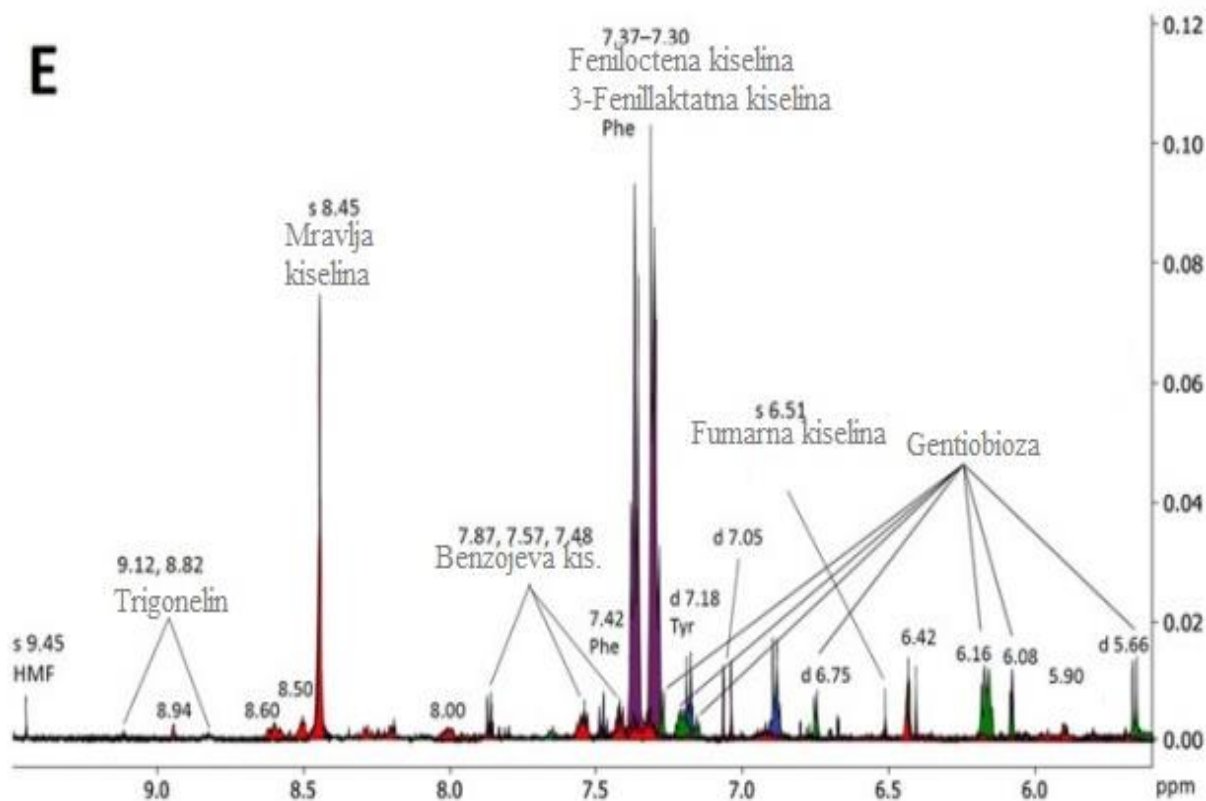
9,45 ppm, a koji služi za procjenu kvalitete (njegovo prisustvo u uzorku ukazuje na nedostatke nastale pregrijavanjem i predugim skladištenjem (Kortisniemi i sur., 2016).



Slika 12. ^1H NMR spektri vodenih otopina uzoraka medova. A) Superimponirani spektar (10,0-0,6 ppm). B) Zasebni spektri uzoraka (10,0-5,6 ppm i 2,9-0,6 ppm). (Kortisniemi i sur., 2016).

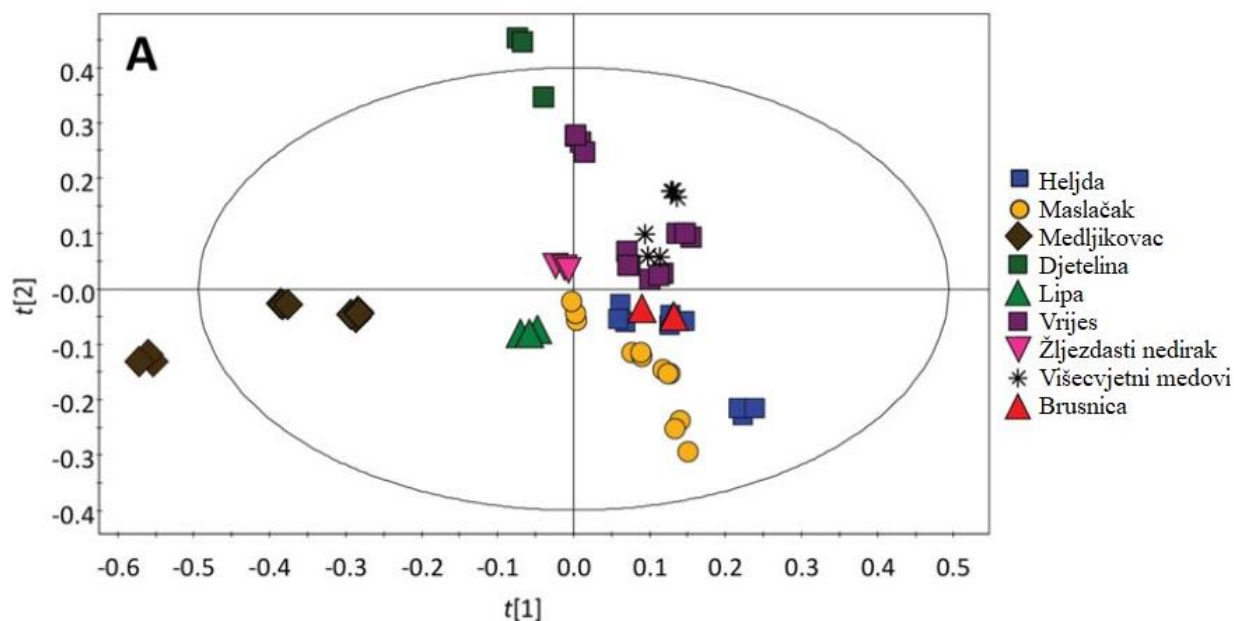






Slika 13. Istaknuti markeri za medove heljde (plava), maslačka (žuta), vrijesa (ljubičasta), medljike (smeđa), lipe (zelena) i brusnice (crvena) u različitim rasponima kemijskih pomaka: A) 1,50-0,75 ppm, B) 2,94-1,50 ppm, C) 4,70-4,10 ppm, D) 5,50-4,93 ppm, E) 9,50-5,60 ppm. Kratice: Ala, alanin; HMF, 5-hidroksimetilfurfural; Ile, izoleucin; Leu, leucin; Phe, fenilalanin; Pro, prolin; Tyr, tirozin; Val, valin. Singali : s, singlet; d, dublet; dd, dublet dubleta; m, multiplet; t, triplet (Kortesniemi i sur., 2016).

U razlikovanju medova PCA modelom, sastav šećera je igrao važnu ulogu. Dobiveni PCA model prikazan je na slici 14. Najbolje razlikovanje s obzirom na ostale cvjetne medove je postignuto s uzorkom meda medljike. Razlog tome je prisustvo meleziptoze kao glavnog markera meda medljikovca. Za distribuciju uzoraka cvjetnih medova zaslužne su fruktoza i glukoza, no njihovo obilje u cvjetnim medovima uzrokovalo je preklapanje rezultata dobivenih analizom PCA. Budući da NMR-spektroskopijom nisu dobiveni značajni markeri za med žljezdastog nedirka pozicioniranje ove vrste meda je u središtu PCA modela te može poslužiti kao pokazatelj botaničkog porijekla drugih medova preko sastava šećera (Kortesniemi i sur., 2016).

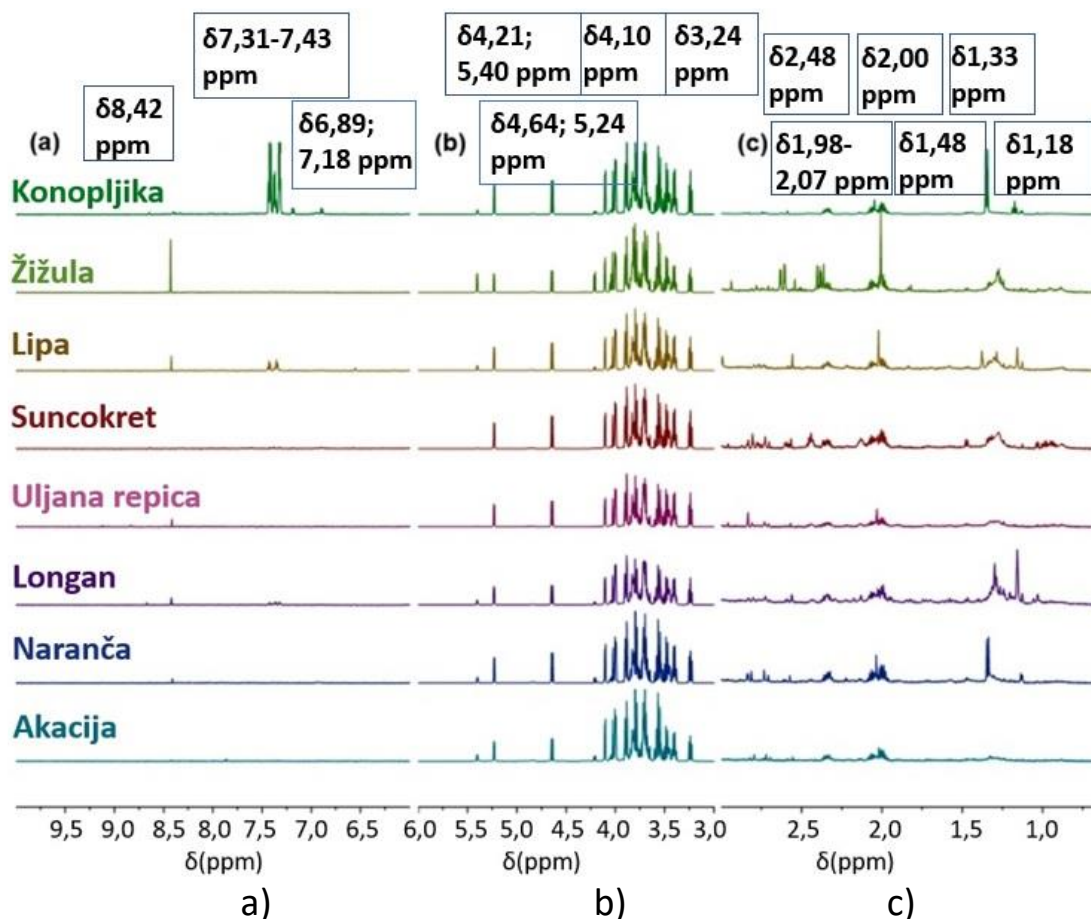


Slika 14. PCA model devet uzoraka finskih medova (Kortesniemi i sur., 2016).

2.3.4. Utvrđivanje botaničkog porijekla kineskih medova

Kina je jedna od vodećih država na svijetu u proizvodnji i izvozu meda. Cilj istraživanja Zhanga i sur. bio je utvrditi botaničko i geografsko porijeklo kineskih medova kako bi utvrdili njihovu izvornost budući da su široko rasprostranjeni na svjetskom tržištu. Ispitivani su uzorci 8 različitih vrsta medova prikupljenih od strane kineskih pčelara u razdoblju od 2017. do 2019. godine, a navedene botaničke vrste bile su longan, akacija, žižula, lipa, naranča, uljana repica, suncokret i konopljika (Zhang i sur., 2020).

Specifični signali mravlje kiseline (δ 8,42 ppm), Phe (δ 7,29-7,42 ppm) i Tyr (δ 7,18 i 6,89 ppm) zabilježeni su pri niskom polju NMR spektra (slika 15.). Phe je u najvećim koncentracijama prisutan u medu konopljike, zatim medovima lipe i longana te u vrlo malim količinama u medu uljane repice. U ostalim medovima koncentracija Phe bila je ispod granica detekcije. Med konopljike također sadrži velike koncentracije Tyr, dok se u medovima suncokreta i longana nazire mali signal vidljiv tek kod velikog uvećanja y-osi. Glede mravlje kiseline, visoke koncentracije detektirane su u medovima žižule i lipe dok je u drugim medovima ta količina zanemariva. Usporedba koncentracija mravlje kiseline u različitim cvjetnim medovima nije potrebna s obzirom da mravlja kiselina u medu može nastati iz nekoliko izvora, kao npr. izlučena iz samih pčela, prisutna u pesticidima ili kao rezultat Maillardovih reakcija tijekom zagrijavanja (Zhang i sur., 2020).



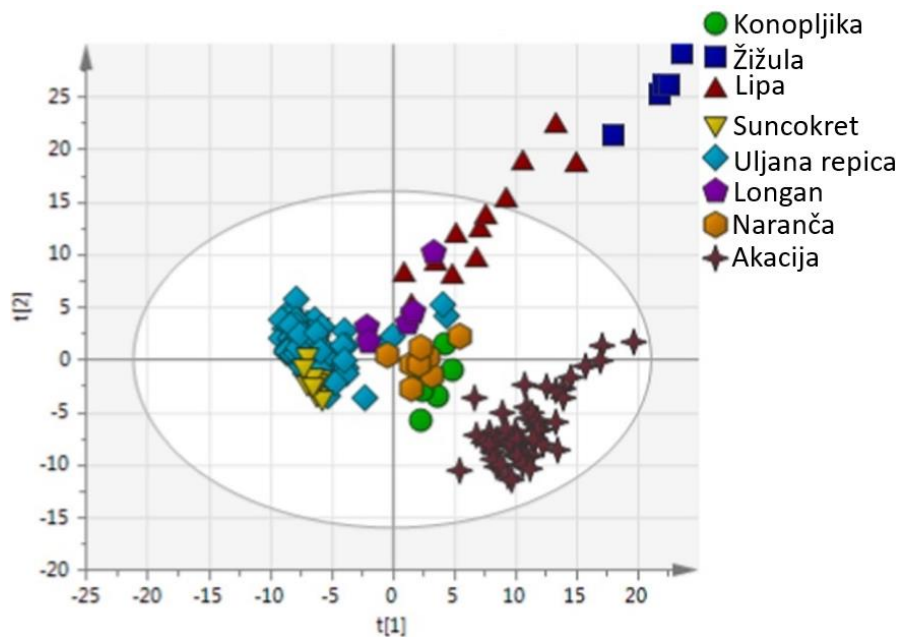
Slika 15. ^1H NMR spektri 8 različitih vrsta medova i specifični signali istaknuti na vrhu. a) aromatska regija, y-os uvećana 150 puta; b) regija ugljikohidrata; c) alifatska regija, y-os uvećana 225 puta. (Zhang i sur., 2020).

U regiji ugljikohidrata signali su pripadali velikom broju šećera, a najviše saharozi (δ 5,40 i 4,20 ppm), glukozi (δ 5,23, 4,64 i 3,24 ppm) i fruktozi (δ 4,10 ppm) koje su u visokim koncentracijama zastupljene u medu (slika 15.). Najviše koncentracije saharoze sadržavao je med žižule, a potom medovi lipa, longana, naranče i akacije. Sadržaj glukoze i fruktoze bio je visok u svim medovima, posebice u medu suncokreta i uljane repice.

U alifatskoj regiji zabiježeni su signali Ala (δ 1,47 ppm), Pro (δ 2,30-2,37 ppm), etanola (δ 1,16 ppm), te octene (δ 2,02 ppm), mliječne (δ 1,33 ppm) i jantarne kiseline (δ 2,48 ppm) (slika 15.). U uzorcima medova konopljike, longana i naranče detektirana je manja količina etanola, dok je njegova koncentracija u drugim medovima gotovo zanemariva. Etanol u ispitivanim medovima je najvjerojatnije prisutan kao rezultat fermentacije ugljikohidrata povezane s prethodnim skladištenjem meda (Zhang i sur., 2020). Signali octene kiseline su se

u nekim slučajevima preklapali s multipletom prolinskih protona zbog čega je otežana procjena udjela octene kiseline u uzorcima. Najviše koncentracije octene kiseline imali su medovi žižule i lipe. Sadržaj mliječne kiseline u medu konopljike bio je viši od ostalih medova, a nešto niže koncentracije detektirane su u medovima naranče i suncokreta te u vrlo niskim koncentracijama u medovima lipe i žižule. Ala je u najvišoj koncentraciji detektiran u medu suncokreta, zatim medovima konopljike i longana dok je signal alanina u ostalim uzorcima bio jedva primjetan. Pro je najzastupljeniji u medu konopljike, a u medovima lipe i uljane repice prisutan je u niskim koncentracijama.

Korištenjem PCA-X modela utvrđivano je botaničko porijeklo medova. Slika 16. prikazuje rezultat provedene analize. Varijable su uglavnom koncentrirane na sredini koordinatnog sustava ukazujući tako na sličnosti analiziranih uzoraka, tj. medova konopljike, suncokreta, uljane repice, longana i naranče. Suprotno tome, uzorci meda akacije, lipe i žižule su uspješno razlikovani od ostalih medova. Ovakvom izdvajanju od sredine koordinatnog sustava pridonio je sastav šećera (Zhang i sur., 2020).



Slika 16. PCA-X model uzoraka osam kineskih medova (Zhang i sur., 2020).

3. ZAKLJUČCI

1. Metabolomika je nova znanstvena disciplina s potencijalom primjene u različitim znanstvenim područjima. U analitici prehrambenih proizvoda metabolomikom je moguće pratiti metabolom sadržan u hrani i utvrditi kakav utjecaj imaju konvencionalne metode procesiranja na sami metabolički profil hrane. Spregnuta sa spektroskopijom NMR omogućuje utvrđivanje molekulskih mehanizama i interakcija spojeva prisutnih u hrani.
2. Med predstavlja jednu od najvrijednijih namirnica na svijetu zbog svog nutritivnog sastava, okusa i aroma te antibakterijskog i antioksidacijskog djelovanja. Kao takav, sve je češće predmet patvorenja i lažnog deklariranja geografskog i botaničkog porijekla. Prilikom procjene geografskog i botaničkog porijekla meda peludnom analizom, nailazi se na razne prepreke, poput poznavanja morfoloških karakteristika zrnaca i njihovog razlikovanja. Stoga se u procjeni autentičnosti meda možemo poslužiti NMR-metabolomskom analizom.
3. Med novozeladskog čajevca ili manuka med je zanimljiv zbog prisustva metil-glioksala, spoja koji ovom medu daje iznimnu antibakterijsku aktivnost i visoku cijenu na tržištu. Upravo iz tog razloga je nerijetko podvrgnut patvorenju. Spektroskopijom NMR uspješno su utvrđeni markeri meda novozelandskog čajevca ili manuka meda: metil-glioksal, dihidroksiaceton i leptosperin pomoću kojih je moguće potvrditi autentičnost manuka meda kao i razlikovati ga od medova drugih botaničkih vrsta. Daljnjom statističkom obradom podataka koristeći se PLS-DA modelom, dobiveno je minimalno preklapanje rezultata manuka meda s rezultatima drugih cvjetnih medova čime je potvrđeno njihovo razlikovanje.
4. Dobiveni NMR-spektri analiziranih brazilskih medova vrsta *Eucalyptus*, *Cambara* i *Citrus* dali su karakteristične signale polifenolnih spojeva. Sastav ukupnih fenolnih spojeva ovisi o sezonskim i okolišnim čimbenicima pa tako mogu poslužiti kao biomarkeri pri identifikaciji medova i njihovoj klasifikaciji po botaničkom porijeklu. Spektri su dalje analizirani PCA metodom čime su dobiveni zadovoljavajući rezultati u međusobnom razlikovanju ispitivanih uzoraka.
5. U medovima arktičkih i borealnih područja postoji velika šansa u pronalasku peludnih zrnaca sekundarnih izvora u medovima deklariranim kao „jednocvjetni“, prvenstveno zbog otežanih uvjeta za rast određenih biljnih vrsta. Iz tog razloga su finski medovi visoko cijenjeni. Primjenom spektroskopije NMR analizirano je 9 vrsta jednocvjetnih medova (heljda, djetelina, maslačak, vrijes, žljezdasti nedirak, medljikovac, lipa, brusnica i višecvjetni medovi) u svrhu pronalaska specifičnih biomarkera. Korištenjem PCA modela

pokazano je slabo razlikovanje analiziranih medova pripisano udjelima fruktoze i glukoze. Najbolje razlikovanje s obzirom na ostale vrste postignuto je s uzorkom meda medljike.

6. Kineski medovi široko su rasprostranjeni na svjetskom tržištu te je bitno utvrditi njihovo botaničko i geografsko podrijetlo u svrhu potvrde izvornosti. Spektroskopijom NMR analizirano je 8 vrsta jednocvjetnih medova (konopljika, žižula, lipa, suncokret, uljana repica, longan, naranča i akacija). Uzorci su dali slične spektre što je vidljivo i na dobivenom PCA-X modelu. Najbolje razlikovanje dobiveno je za medove akacije, žižule i lipe, dok su se rezultati ostalih medova preklapali.
7. Za analizu složenih sustava, kao što je hrana, sposobnost NMR-metabolomske analize za kvantitativno praćenje nekoliko klasa kemijskih spojeva bez uništavanja uzorka predstavlja veliku prednost ove metode u odnosu na druge češće korištene analitičke metode. Najveći nedostatak spektroskopije NMR je i dalje njena niska osjetljivost, stoga je potreban daljnji rad na usavršavanju NMR metabolomske analize prehrambenih proizvoda u svrhu kontrole kvalitete i sprječavanju patvorenja.

4. LITERATURA

Chernyshev A, Braggins T J (2020) Investigation of Temporal Apparent C4 Sugar Change in Manuka Honey. *Agric Food Chem.* **68**(14), 4261-4267. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06965>

Consonny R, Cagliani L (2019) The potentiality of NMR-based metabolomics in food science and food authentication assessment. *Magnetic Resonance in Chemistry* **57**(9), 558-578. <https://doi.org/10.1002/mrc.4807>

Emwas A H, Roy R, McKay R T, Tenori L, Saccenti E, Nagana Gowda G A, Raftery D, Alahmari F, Jaremko L, Jaremko M, Wishart D S (2019) NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* **9**:123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>

Groth D, Hartmann S, Klie S, Selbig J. (2013) Principal components analysis. *Methods Mol Biol.* **930**:527-547 https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5_22

Hatzakis E (2019) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **18**(1), 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>

Kim S, Kim J, Yun E, Kim K (2016) Food metabolomics: From farm to human. *Current Opinion in Biotechnology* **37**, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.004>

Kortesniemi M, Slupsky C, Ollikka T, Kuako L, Spevacek S, Yang B, Kallio H (2016) NMR profiling clarifies the characterization of Finish honeys of different botanical origins. *Food Research International* **86**, 83-92. <https://doi.org/>

Lee LC , Liong CY , Jemain AA (2018) 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**(15):3526-3539. <https://doi.org/10.1039/c8an00599k>

Marcone M, Wang S, Albabish W, Nie S, Somnarain D, Hill A (2013) Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food research International*

51(2), 729-747. [https://doi.org/ 10.1016/j.foodres.2012.12.046](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.046)

Pravilnik (2015a) Pravilnik o medu. Narodne novine 53, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html. Pristupljeno : 21.svibnja 2022.

Salgueiro F, Lira A, Rumanjek V, Castro R (2016) Botanical characterization of Brazilian honeys by nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Revista Virtual de Quimica* 8(1), 277-287. [https://doi.org/ 10.5935/1984-6835.20160018](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160018)

Spiteri M, Rogers K, Jamin E, Thomas F, Guyader S, Lees M, Rutledge D (2017) Combination of ¹H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honeys types from Oceania. *Food Chemistry* 217, 766-772. [https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2016.09.027](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.027)

Šarić G, Vahčić N, Kovačević D, Putnik P (2020) The Changes of flavonoids in honey during storage. *Processes* 8(8), 943. [https://doi.org/ 10.3390/PR8080943](https://doi.org/10.3390/PR8080943)

Utpott M, Rodrigues E, Rios A, Mercali G, Flores S (2022) Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation. *Food Chemistry* 366

Wishart D (2019) NMR metabolomics : A look ahead. *Journal of Magnetic Resonance* 306, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>

Zhang J, Chen H, Fan C, Gao S, Zhang Z, Bo L (2020) Classification of the botanical and geographical origins of Chinese honey based on ¹H NMR profile with chemometrics. *Food Research International* 137. [https://doi.org/ 10.1016/j.foodres.2020.109714](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109714)

Izjava o izvornosti

Ja Karla Obad izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis