

# Određivanje udjela ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti cvjetnog meda sezona 2018.

---

Spajić, Tatjana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:565406>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 30. rujan 2019.

Tatjana Spajić

1138/USH

**ODREĐIVANJE UDJELA  
UKUPNIH FENOLA TE  
ANTIOKSIDACIJSKE  
AKTIVNOSTI CVJETNOG MEDA-  
SEZONA 2018.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Nade Vahčić, red. prof. Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Valentine Hohnjec, tehničkog suradnika i ing. Renate Petrović, višeg tehničkog suradnika Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem se, u prvom redu, svojoj mentorici prof.dr.sc. Nadi Vahčić, koja me je strpljivo i s razumijevanjem vodila kroz pisanje ovog rada te pomogla u ostavljanju mog traga na ovom fakultetu. Također, zahvaljujem se Valentini Hohnjec i Renati Petrović, koje su mi neizmjereno pomogle pri samom radu u laboratoriju te ga učinile jednim lijepim iskustvom.*

*Hvala svim mojim kolegama i kolegicama za pruženu podršku kao i svim prijateljima i dragim ljudima koji su uvijek bili uz mene.*

*Na kraju, želim se zahvaliti svojoj obitelji kojima i posvećujem ovaj rad. Neizmjereno vam se zahvaljujem za sve što ste učinili za mene. Za sve tople riječi, podršku, za to što mi niste dali da odustanem i za to što ste uvijek vjerovali u mene, čak i kad ja nisam. Hvala vam na pruženoj ljubavi, zbog vas sam uspjela.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda  
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLA TE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI CVJETNOG MEDA- SEZONA 2018.

*Tatjana Spajić, 1138/USH*

**Sažetak:** U ovom radu analizirano je 45 uzoraka meda od čega je 34 uzorka cvjetnog meda i 11 uzoraka meda livade. Uzorci su iz različitih područja Hrvatske, Bosne i Hercegovine te Slovenije. Određen je udio ukupnih fenola pomoću modificirane Folin-Ciocalteu metode te antioksidacijska aktivnost pomoću dviju metoda, FRAP i DPPH. Udio ukupnih fenola se kretao u rasponu od 12,25 do 257,25 mg GAEkg<sup>-1</sup> meda, "radical scavenging" aktivnost izražena kao IC<sub>50</sub> u rasponu od 0,8301 do 43,0648 mgmL<sup>-1</sup> te antioksidacijska aktivnost određena pomoću FRAP metode u rasponu od 91,9310 do 407,7931 μM Fe(II) 10%-tne otopine meda.

**Ključne riječi:** antioksidacijska aktivnost, DPPH, FRAP, fenoli, med

**Rad sadrži:** 42 stranice, 7 slika, 13 tablica, 43 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom** (pdf format) **obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof.dr.sc. Nada Vahčić

**Pomoć pri izradi:** Valentina Hohnjec, tehnički suradnik

Ing. Renata Petrović, viši tehnički suradnik

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Draženka Komes
2. Prof. dr. sc. Nada Vahčić
3. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Doc. dr. sc. Martina Bituh

**Datum obrane:** 30. rujan 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Quality Control  
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

### DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLORAL HONEY- SEASON 2018.

*Tatjana Spajić, 1138/USH*

**Abstract:** In this assay, 45 samples of honey were analyzed out of which 35 was from floral origin and 11 was meadow honey. Samples were collected from different regions of Croatian, Bosnian and Herzegovinian and Slovenian territory. Total phenolic content was determined by the modified Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity by two methods, FRAP and DPPH. Phenolic content ranged from 12,25 to 257,25 mg GAE/kg of honey, "radical scavenging" activity expressed as IC<sub>50</sub> from 0,8301 to 43,0648 mg/mL and antioxidant activity determined by FRAP method in range from 91,9310 to 407,7931 µM Fe(II) of the 10% honey solution.

**Keywords:** antioxidant activity, DPPH, FRAP, phenols, honey

**Thesis contains:** 42 pages, 5 figures, 12 tables, 41 reference

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Tehnology and Biotehnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. Nada Vahčić, Full Professor

**Tehnickal support and assistance:** Valentina Hohnjec, Tehnickal Associate

Ing. Renata Petrović, Senior Tehnickal Associate

**Reviewers:**

1. PhD. Draženka Komes, Full professor
2. PhD. Nada Vahčić, Full professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full professor
4. PhD. Martina Bituh, Assistant profesor

**Thesis defended:** 30 september 2019

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. MED .....	2
2.1.1. Uzgoj medonosnih pčela .....	2
2.1.2. Definicija meda .....	2
2.1.3. Fizikalna i senzorska svojstva meda.....	4
2.1.4. Kemijska svojstva meda.....	7
2.1.5. Nutritivna vrijednost meda.....	11
2.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET MEDA .....	12
2.2.1. Antioksidansi.....	12
2.2.2. Slobodni radikali .....	12
2.2.3. Antioksidansi u medu.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
3.1. ZADATAK RADA .....	15
3.2. MATERIJALI .....	15
3.3. METODE RADA .....	16
3.3.1. Priprema analoga meda .....	16
3.3.2. Određivanje udjela ukupnih fenola .....	17
3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	19
3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>23</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>37</b>



## 1. UVOD

Med je jedna od najvrjednijih namirnica koju je čovjek pronašao na zemlji, a koja se ne može industrijski proizvesti jer tajnu proizvodnje pravog pčelinjeg meda pčele nose u svom tijelu i organima za probavu.

Povijest meda je dio mitova i legendi gdje se spominje kao dar s neba. Nektar, ambrozija i hrana bogova su riječi koje su se koristile kako bi se opisao med. Zapisi o ovoj zlatnoj tekući govore da su civilizacije diljem svijeta uživale u medu kroz povijest. Kroz dugo razdoblje, med je bio jedini zaslađivač koji je bio dostupan širokoj masi. Otac moderne medicine, Hipokrat, pisao je o ljekovitim svojstvima meda i njegovim pozitivnim učincima na ten, kožu i zdravlje. Prije proizvodnje penicilina, povijest meda pokazuje da je on vodeći antibiotik koji se koristio za otvorene ozljede i rane, a u istu svrhu se koristi i danas.

Med je sladak i gust sok što ga pčele medarice prave od nektara koji skupljaju na cvjetovima i sadrži sve što je potrebno za zdravlje te je pravi eliksir za organizam. Mješavina najmanje 180 različitih tvari, brojnih organskih kiselina, vitamina, minerala, enzima, voska, polenovih zrnaca, eteričnih ulja. Posjeduje jedinstvenu strukturu i antimikrobna, antibakterijska i antioksidativna svojstva. Sadrži jednostavne šećere što ga čini lako probavljivom namirnicom i izvrsnom namirnicom za sve, a ponajviše za sportaše jer omogućuje brzu nadoknadu energije. Osim što povećava otpornost organizma na infekcije i pomaže u borbi protiv bolesti, med je izvrsno sredstvo za smirenje, povećanje energije, poticanje umne aktivnosti i poboljšanje duševnog zdravlja, a koristi se i za njegovanje kose i kože.

Cilj ovog rada bit će odrediti udio ukupnih fenola i antioksidacijska svojstva cvjetnog meda i meda livade pomoću metoda DPPH i FRAP.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MED

#### 2.1.1. Uzgoj medonosnih pčela

Uzimanje meda od pčela nikada nije bio bezbolan posao, jer pčele instinktivno brane svoju zajednicu, dom i hranu od uljeza. Prvi sakupljači meda pratili su pčele na povratku s pčelinje paše do njihovih košnica, koje su se najčešće nalazile u dupljama drveća ili pećinama (Belčić, 1985). Od četiri europske rase pčela medarica, tamna europska (*Mellifica*), kranjska (*Carnica*), talijanska (*Ligustica*) i kavkaska (*Caucasia*), za moderno pčelarstvo na našem području najvažnija je kranjska pčela medarica (*Apis mellifica carnica*), koja se aktivno uzgaja i selektira na poželjne proizvodne, zdravstvene i fiziološke odlike rase (Minarik, 2018).

#### 2.1.2. Definicija meda

Med jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele 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 (Pravilnik, 2015).

Med je po svom sastavu prilično složen te ne postoje dva identična uzorka meda. Različita fizikalno-kemijska i senzorska svojstva su posljedica izloženosti različitim klimatskim i okolišnim uvjetima te različitog porijekla biljaka sa kojih je sakupljen nektar. Med je, jednostavno rečeno, koncentrirana vodena otopina invertnog šećera, ali također sadrži i oko 200 različitih tvari koji tvore smjesu ostalih saharida, enzima, amino i organskih kiselina, polifenola, karotenoidnih spojeva, produkata Maillardovih reakcija, vitamina i minerala. Navedeni sastojci su odgovorni za bioaktivna svojstva meda što ga čini, osim namirnice visoke vrijednosti, i bogatim izvorom antioksidansa (Šarić i sur., 2012). Konačni sastav, gustoća i boja meda ovisi o vrsti i okolišu biljke od koje potječe, ali i o obradi meda, uvjetima skladištenja, godišnjem dobu te o zdravstvenom stanju pčele (Oršolić, 2006).

Med se može podijeliti (Pravilnik, 2015) :

Prema podrijetlu

- Cvjetni ili nektarni med-med dobiven od nektara biljaka
- Medljikovac ili medun- med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka.

Prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja:

- *Med u saću*- med kojeg skladište pčele u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća
- *Med sa saćem ili med s dijelovima saća*
- *Cijeđeni med*- med koji se dobiva ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
- *Vrcani med*- med dobiven vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
- *Prešani med*- med dobiven prešanjem saća bez legla, s ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45
- *Filtrirani med*- med dobiven na način koji tijekom uklanjanja starih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi

Sporedna vrsta meda je pekarski med- med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom prerađuje i može:

- imati strani okus ili miris, ili

- biti u stanju vrenja ili prevrio, ili

- biti pregrijan.

Osim podjele meda, Pravilnikom o medu su definirani i kriteriji sastava meda koji govore da:

- boja meda može varirati od gotovo bezbojne do tamnosmeđe
- med može biti tekuće ili viskozne konzistencije, djelomično ili potpuno kristaliziran, a
- aroma može varirati, ali mora potjecati od izvornog bilja.

Prema Pravilniku o kakvoći uniflornog meda, med možemo podijeliti i prema podrijetlu medonosnih biljaka ili medne rose, i to na:

*Nektarni med*- proizvod što ga pčele proizvode od nektara medonosnih biljaka različitih vrsta (lipa, bagrem, kadulja, livadno bilje i dr.), a može biti:

1. uniflorni- med koji u netopivom sedimentu sadrži najmanje 45 % peludnih zrnaca iste biljne vrste. Med se razvrstava u skupinu monofloernih ako udio peludnih zrnaca u netopivom sedimentu iznosi najmanje za:
  - pitomi kesten (*Castanea sativa*) 85%;
  - uljana repica (*Brassica napus L.*) 60%;
  - facelija (*Phacelia tanacetifolia Benth.*) 60%;
  - lipa (*Tilia spp.*) 25%;
  - bagrem (*Robinia pseudoacacia L.*) 20%;
  - metvica (*Mentha spp.*) 20%;
  - vrijesak (*Calluna vulgaris L.*) 20%;
  - maslačak (*Taraxacum officinale Weber*) 20%;
  - ružmarin (*Rosmarinus officinalis*) 30%;
  - lipu (*Tilia sp.*) 25%;
  - kadulju (*Salvia sp.*) 20%;
  - lavandu (*Lavandula sp.*) 20%
2. poliflorni- mješavina meda različitih vrsta

Miješani med jest mješavina nektarnog meda i medljikovca.

*Medljikovac*- med što ga pčele proizvode od medne rose (crnogorice ili bjelogorice). Medljikovac se od cvjetnog meda razlučuje metodom električne vodljivosti, koja mora biti veća od  $1,00 \text{ mScm}^{-1}$  (mili Simensa po centimetru).

### 2.1.3. Fizikalna i senzorska svojstva meda

Svojstva meda se mogu podijeliti na fizikalna svojstva meda i na senzorska svojstva.

U fizikalna svojstva meda se ubrajaju:

- kristalizacija
- viskoznost
- higroskopnost
- električna vodljivost
- optička svojstva
- indeks refrakcije
- specifična masa.

Kristalizacija meda je osobina svakog prirodnog meda. Sposobnost kristalizacije ima samo potpuno čist, prirodan med. Brzina kristalizacije u ambalaži zavisi od odnosa glukoze i fruktoze kao i temperature na kojoj se med čuva. Ako je u medu sadržaj glukoze viši, takav med brže kristalizira (Savjetodavna, 2019). Budući da je med prezasićena otopina glukoze, spontano prelazi u stanje ravnoteže kristalizacijom suvišne količine glukoze u otopini. Glukoza gubi vodu (postaje glukoza monohidrat) i prelazi u kristalni oblik, a voda, koja je prije bila vezana na glukozu, postaje slobodna tako da se povećava sadržaj vode u nekristaliziranim dijelovima meda. Zbog toga med postaje skloniji fermentaciji i kvarenju. (Vahčić N., Matković D., 2009). Fruktoza ostaje u tekućem stanju i čini tanak sloj oko kristala glukoze. Med mijenja boju, postaje svjetliji, više nije proziran, a mijenja i okus. (Škenderov, S., Ivanov, C., 1986). Temperature ispod 20°C ubrzavaju kristalizaciju, dok ju vlažnost zraka usporava. Određene vrste meda (med od bagrema, bijele djeteline, lipe, facelije, livadni) kristaliziraju sitnim kristalima pa su vrlo traženi. Ova karakteristika prirodnog meda potvrđuje njegovu zrelost i kvalitetu. Med koji nije čist ne može kristalizirati i ostaje u tekućem stanju. (Savjetodavna, 2019).

Med je gusta viskozna tekućina. Viskoznost je osobina tekućine koju karakterizira ljepljivost i opiranje curenju (Mujić i sur., 2014). Viskoznost meda označava stupanj likvidnosti i utječe na daljnje postupanje s medom tijekom dorade i skladištenja. Na viskoznost meda utječe više različitih faktora poput sastava samog meda i gustoće, podrijetla nektara, koncentracije vode u medu, temperature te broja i veličine kristala (Vahčić i Matković, 2009). Povećanjem temperature smanjuje se viskoznost meda (Mujić i sur., 2014). Što je udio vode u medu manji, to mu je viskoznost veća. Na viskoznost utječe i sastav ugljikohidrata pa će med biti viskozniji što je veći udio disaharida i trisaharida (Bhandari i sur., 1999). Zbog toga dvije vrste meda mogu imati različitu viskoznost iako imaju isti udio vode (Vahčić i Matković, 2009).

Higroskopnost je svojstvo meda da upija vlagu iz zraka, pri čemu dolazi do povećanja količine vode u površinskom sloju meda. Takav proces je uvjetovan velikom količinom šećera (Vahčić i Matković, 2009). Visok udio fruktoze čini med higroskopnim jer npr. tijekom kristalizacije ona ostaje u tekućem stanju i higroskopnija je od glukoze (Mujić i sur., 2014). Higroskopnost ima veliki značaj za pčelare, ali i za potrošače u vezi s čuvanjem i skladištenjem istog. Ako se med neprikladno čuva u vlažnim prostorijama, zbog privlačenja vode iz prostorije na površinu meda, imat će veći maseni udio vode. Kao posljedica toga je to da je med podložniji fermentaciji i kvarenju (Škender i Ivanov, 1986).

Električna vodljivost je svojstvo neke tvari da provodi električnu struju. Električna vodljivost u medu definira se kao vodljivost 20%-tne vodene otopine meda pri temperaturi od 20 °C gdje se

20% odnosi na suhu tvar meda (White i sur., 1963). U medu, električnu struju provode ionski oblici minerala i disocirane kiseline (Petričko, 2015). Kako med sadrži malu količinu mineralnih tvari, tako je i električna vodljivost u njemu prilično mala (Bogdanov i sur., 1999). Prema Pravilniku o medu (Pravilnik, 2015) električna vodljivost nektarnog meda smije iznositi najviše 0,8 mS/cm, a meda medljikovca i meda od kestena minimalno 0,8 mS/cm.

Optička aktivnost meda je funkcija udjela pojedinih ugljikohidrata u medu. Vodena otopina meda je optički aktivna, to jest ima sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti. Fruktosa zakreće ravninu polarizirane svjetlosti ulijevo, a glukoza, svi disaharidi, trisaharidi i viši oligosaharidi udesno (Škenderov i Ivanov, 1986). Analizom optičke rotacije i sastava ugljikohidrata u medu možemo razlikovati medljikovac i nektarni med te različitost vrsta uniflornog nektarnog meda (Bogdanov i sur., 1999).

Indeks refrakcije se mjeri refraktometrom na principu loma svjetlosti koji prolazi kroz određenu otopinu. Mjerenje se najčešće provodi na temperaturi od 20 °C. Ako se indeks refrakcije mjeri na temperaturi višoj ili nižoj od 20 °C, refrakcijski koeficijent se značajno mijenja (National Honey Board, 2005).

Specifična masa je odnos mase meda prema masi iste količine vode te ovisi o udjelu vode u medu. Jedna litra meda teža je od 1 kg, zato što se u toj litri tekućine nalazi šećer (National Honey Board, 2005). Specifična masa kvalitetnih vrsta meda veća je od 1,42. Medonosno bilje od kojeg potječe nektar može lagano utjecati na specifičnu masu meda (Vahčić i Matković, 2009).

#### Senzorska svojstva meda

Najvažnija senzorska svojstva meda su: boja, okus i miris.

Boja meda varira u rasponu od svjetlo žute do tamno smeđe a ponajviše ovisi o botaničkom podrijetlu meda (Batinić, 2014).

Okus i miris meda najviše ovise o sastavu hlapljivih tvari.

#### 2.1.4. Kemijska svojstva meda

Med predstavlja izuzetno složenu smjesu s više od 70 različitih komponenata. Neke od njih u med dodaju pčele, neke potječu od medonosne biljke, a neke nastaju tijekom zrenja meda u saću (Krell, 1996). Različite vrste meda, kao i med unutar pojedine vrste razlikuju se po svom sastavu u ovisnosti o biljnom i geografskom podrijetlu, klimatskim uvjetima, pasmini pčela te sposobnostima pčelara (način dorade i skladištenje meda) (Škenderov i Ivanov, 1986). Ugljikohidrati, od kojih su najzastupljenije glukoza i fruktoza, i voda čine više od 99% kemijskog sastava meda. Preostalih 1% čine proteini (uključujući enzime), mineralne tvari, vitamini, organske kiseline, fenolni spojevi, tvari arome i razni derivati klorofila (Singhal, 1997).

Ugljikohidrati su odgovorni za fizikalna svojstva meda, njegovu viskoznost, higroskopičnost, kristalizaciju i energetska svojstva. Prosječni odnos glukoze i fruktoze u medu je 1 : 1,2 (White, 1975). Omjer fruktoze i glukoze te omjer glukoze i vode u medu su izuzetno bitni jer se pomoću njih može odrediti pa čak i predvidjeti tendencija kristalizacije meda. Glavni šećeri koji medu daju slatkoću su fruktoza, glukoza, saharoza i maltoza. Budući da je fruktoza najzastupljenija u medu, med je u prosjeku 1,5 puta slađi od konzumnog šećera (National Honey Board, 2004). Količina i odnos između pojedinih ugljikohidrata u medu ovise najviše o njegovom botaničkom i geografskom podrijetlu, ali i o sastavu i intenzitetu lučenja nektara, klimatskim uvjetima i fiziološkom stanju i pasmini pčela (Mateo i Bosch-Reig, 1997). Određivanje saharoze je važno kako bi se utvrdilo patvorenje meda, hranjenje pčela šećerom saharozom ili direktno dodavanje šećera u med. (Vahčić i Matković, 2009).

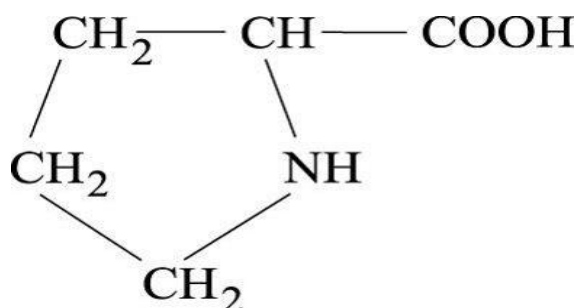
Voda je poslije ugljikohidrata drugi najzastupljeniji sastojak meda i udio vode u medu se kreće između 15 i 23 %. Količina vode u medu ovisi o vrsti meda, godišnjem dobu i o stupnju zrelosti meda. Po pravilu u medu ne bi trebalo biti više od 20 % vode jer s povećanjem udjela vode med postaje podložniji fermentaciji (Kapš, 2013).

Organske kiseline prisutne su u malim količinama (0,57%), ali su jako važne za okus meda. Najvažnija je glukonska kiselina koja nastaje kao produkt aktivnosti enzima glukoza oksidaze (Krell, 1996). Kiselost meda je pokazatelj kakvoće meda i kreće se u rasponu od 3,2- 6,5 pH (Mujić i sur., 2014). Previsoka kiselost uglavnom znači da je med neko vrijeme fermentirao što je rezultiralo pretvorbom alkohola kao produkta fermentacije u organsku kiselinu (Anupama i sur., 2003).

Mineralne tvari u medu količinski su slabo zastupljene, prosječno 0,1-0,2% u nektarnom medu i do 1,5% u medljikovcu, što je izraženo kao udio pepela (Škenderov i Ivanov, 1986). Najzastupljeniji je kalij koji čini 25% do 50% ukupnog udjela mineralnih tvari, a s natrijem, kalcijem i fosforom najmanje 50% (Hernandez, 2004). Udio mineralnih tvari u medu najviše ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu, ali i o klimatskim uvjetima i sastavu tla na kojem je rasla medonosna biljka (Vahčić, Matković, 2009).

Med sadrži vitamine, ali zbog malih količina ne smatra se značajnim izvorom za ljudski organizam (Finke, 2005). Med sadrži nešto veću količinu vitamina B skupine te vitamin C i vitamin K. (Škenderov i Ivanov, 1986).

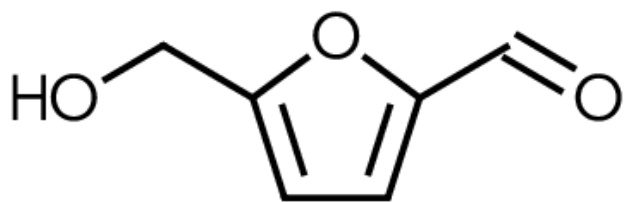
Većina proteina i aminokiselina u medu potječe iz peludi, nektra i žlijezda pčela, a njihovi omjeri ovise o podrijetlu meda (Hermosin, 2003). Udio proteina u medu iznosi oko 0- 1,7%, neki su u veznom obliku a neki kao slobodne aminokiseline. Najzastupljenija aminokiselina je prolin 80-90% (Batinić i Palinić, 2014). Prolin se smatra pokazateljem zrelosti meda, a može poslužiti i kao indikator patvorenja (Meda i sur., 2005). Mali dio proteina prisutnih u medu su enzimi. Osnovni enzimi u medu su: dijastaza, invertaza, glukoza oksidaza i katalaza. Dijastaza i invertaza imaju važnu ulogu u određivanju kvalitete meda i mogu se koristiti kao indikatori svježine meda (Krell, 1996).



*Slika 1. Kemijska struktura prolina ("Prolin")*

Hidroksimetilfurfural je ciklički aldehid koji nastaje dehidratacijom fruktoze i glukoze u kiselom mediju (Vahčić i Matković, 2009). Razlaže se na mravlju i levulinsku kiselinu, a brzina razlaganja je viša pri povišenim temperaturama, odnosno porast brzine proporcionalan je porastu temperature (Karabournioti i Zervaki, 2001). U svježem medu je prisutan u tragovima, a koncentracija mu se povećava skladištenjem i dugotrajnim zagrijavanjem meda (Krell, 1996).





*Slika 2. Kemijska struktura hidroksimetilfurfurala (Ataç Mogol, 2014)*

Tablica 1. Prosječan kemijski sastav meda (USDA, 2018)

Makroelementi	Jedinica	Vrijednost na 100g
Voda	G	17,10
Energija	Kcal	304
Energija	kJ	1272
Proteini	G	0,30
Ukupne masti	G	0,00
Pepeo	G	0,20
Ugljikohidrati	G	82,40
Vlakna	G	0,2
Ukupni šećeri	G	82,12
Saharoza	G	0,89
Glukoza (dekstroza)	G	35,75
Fruktoza	G	40,94
Maltoza	G	1,44
Galaktoza	G	3,10
<b>Mineralne tvari</b>		
Kalcij, Ca	Mg	6
Željezo, Fe	Mg	0,42
Magnezij, Mg	Mg	2
Fosfor, P	Mg	4
Kalij, K	Mg	52
Natrij, Na	Mg	4
Cink, Zn	Mg	0,22
Bakar, Cu	Mg	0,036
Mangan, Mn	Mg	0,080
Selen, Se	µg	0,8
Fluor, F	µg	7,0
<b>Vitamini</b>		
<b>Vitamin C</b>	Mg	0,5
Tiamin	Mg	0,000
Riboflavin	Mg	0,038
Niacin	Mg	0,121
Pantotenska kiselina	Mg	0,068
Vitamin B6	Mg	0,024
Ukupni folati	µg	2

### 2.1.5. Nutritivna vrijednost meda

Med sprječava rast mikroorganizama i gljiva, a njegovo antibakterijsko djelovanje je najbolje dokazano na gram-pozitivnim bakterijama. Antimikrobni učinak meda ovisi o raznim spojevima prisutnim u medu ali ovisi i o njegovom botaničkom podrijetlu. Niska aktivnost vode u medu te vodikov peroksid koji je nastao djelovanjem glukoza-oksidge također inhibiraju rast bakterija. U medu su prisutni i neki "ne-peroksidni" antibakterijski spojevi s različitim kemijskim porijeklom kao npr. aromatske kiseline te fenolni spojevi i flavonoidi. Nizak pH meda također može biti odgovoran za njegovu antibakterijsku aktivnost (Šarić, 2011).

Apiterapija je primjena pčelinjih proizvoda kao terapija za očuvanje zdravlja ili liječenje bolesti. Od pčelinjih proizvoda za liječenje koriste se med, matična mliječ, propolis, pelud i pčelinji otrov (Minarik, 2018). Med ima antimikrobna svojstva koja su posljedica visoke osmolarnosti, kiselosti te udjela brojnih inhibirajućih tvari kao što su vodikov peroksid, fenolne kiseline i flavonoidi. Med inhibira rast mikroorganizama i gljivica i ima bakteriostatski i baktericidni učinak kod nekih patogenih vrsta kao što su npr. *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* itd. Također, med ima i važno antioksidativno djelovanje jer sadrži glukoza-oksidge, katalazu i askorbinsku kiselinu. Neka istraživanja su pokazala da med ima i protuupalan učinak jer sprječava formiranje radikala oslobođenih iz upalnih tkiva (Vahčić, 2013). Pčelinji proizvodi su jedna od rijetkih namirnica u ljudskoj prehrani koja do potrošača dolaze u izvornom obliku, odnosno bez ikakve prerade, dodataka aditiva, konzervansa i slično. Med na tržište dolazi onakav kakav je proizveden od pčela u pčelinjaku (Minarik, 2018).

## 2.2. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET MEDA

### 2.2.1. Antioksidansi

Postoji jasna povezanost između unosa voća i povrća i smanjenog broja srčanih bolesti, tumora i drugih degenerativnih bolesti te usporavanja starenja, što su pokazala i razna istraživanja (Kopjar, 2007). Za sprječavanje ili usporavanje oksidativnog stresa potrebno je konzumirati određenu količinu antioksidansa koji štite stanične sustave od oksidacijskih oštećenja te u konačnici smanjuju rizik od kroničnih bolesti (Kaur i Kapoor, 2001).

Antioksidansi su sastojci koji u malim količinama, u odnosu na neki oksidacijski supstrat, značajno odgađaju ili inhibiraju oksidaciju tog supstrata (Becker i sur., 2004). Antioksidansi su prirodne ili sintetske tvari koje blokiraju slobodne radikale u njihovom razornom pohodu na organizam. Slobodni radikali su agresivni i vežu se na sve organske tvari i pri tome ih oštećuju i uništavaju samu srž života, tj. mitohondrije stanica, pa i strukturu deoksiribonukleinske kiseline (eng. deoxyribonucleic acid-DNA). Borba sa slobodnim radikalima traje cijeli život od rođenja do smrti, s tim da ništa ne vidimo i ne osjetimo (Reuben, 1998). Antioksidansi djeluju tako da lako stupaju u reakcije sa slobodnim radikalima, odnosno reaktivnim molekulama kisika i dušika te ih neutraliziraju čime se zaustavlja lančana reakcija stvaranja novih slobodnih radikala u stanici (Minarik, 2018).

Visoko reaktivni slobodni radikali i reaktivne vrste kisika nalaze se u biološkim sustavima, a potječu iz različitih vrsta izvora. Proizvodnja reaktivnih kemijskih vrsta i antioksidacijska zaštita su približno u ravnoteži *in vivo*, ali jedan dio kemijskih vrsta može izbjeći sustav zaštite i dovesti do pojave oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres nastaje u onom trenutku kada sekundarne reakcije oksidacije koje su uzrokovane slobodnim radikalima ne mogu biti efikasno spriječene djelovanjem prikladnih antioksidansa, što dovodi do raznih poremećaja kao što su poremećaji u metabolizmu stanice, oštećenja biološkog materijala, gubitak fizioloških funkcija, kronične bolesti, cjelokupno starenje ili smrt organizma (Iveković, 2014).

### 2.2.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali su kemijske vrste koje posjeduju nespareni elektronski par i često se nazivaju slobodni spin (Krijan, 2017). Slobodni radikali su takve kemijske strukture koje su izrazito

kratkog vijeka trajanja zbog toga što sadrže nesparene elektrone. Takva "nepotpuna" elektronska konfiguracija, ih čini nestabilnima i izrazito reaktivnima. Takvo svojstvo im omogućuje mogućnost doniranja elektrona ili primitka elektrona od drugih molekula, pri čemu se ponašaju kao oksidansi ili reducensi. Novonastali slobodni radikal može reagirati ponovo s drugim molekulama i time se stvara "začarani krug" koji šteti staničnim strukturama. Štetni učinci koje takve izrazito reaktivne jedinice mogu nanijeti oštećenje molekula kao što su DNA, proteini, ugljikohidrati i lipidi (Chandra i sur., 2010).

Slobodni radikali nastaju u dva tipa reakcija: homolitičkim cijepanjem veza i reakcijama molekula s drugim slobodnim radikalima. Za homolitička cijepanja je potrebna visoka temperatura kako bi došlo do selektivnog disociranja unutar molekule (Pine, 1994).

Slobodni radikali mogu nastati i tijekom normalnog aerobnog metabolizma. Ravnoteža u metaboličkim procesima pomaknuta je u smjeru nastanka viška slobodnih radikala. To može biti jedan od razloga starenja ljudskog organizma, budući da što smo stariji, smanjuje se i obrana organizma od radikala te možemo reći da nastaje zatvoreni krug između procesa oksidacijskog stresa i starenja organizma kao uzroka i posljedice. Upravo zbog toga je bitna konzumacija antioksidansa, bilo putem prehrane ili lijekova (Puljak i sur., 2004).

Kod čovjeka postoje unutrašnji i vanjski izvori reaktivnih kisikovih čestica. Užurbani način života današnjice popraćen je stresom, fizičkim i psihičkim opterećenjem, neaktivnošću, što utječe i na koncentracije reaktivnih kisikovih čestica. Mogući vanjski izvori reaktivnih kisikovih čestica su teški metali, metan, alkohol, opasne kemikalije, pojedini lijekovi, a i unutrašnje upale i razne povrede (Poon, 2004).

### 2.2.3. Antioksidansi u medu

Za razliku od industrijskih proizvoda, med predstavlja prirodni proizvod koji ne uzrokuje nuspojave koje mogu biti štetne za zdravlje (Khalil i sur., 2010).

Med sadrži značajne antioksidacijske sastojke kao što su glukoza oksidaza, katalaza, flavonoidi, fenolne kiseline, askorbinska kiselina, derivati karotenoida, organske kiseline, produkte Maillardovih reakcija, amino kiseline i proteine (Khalil i sur., 2010).

Najveći utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ima botaničko podrijetlo dok procesiranje, rukovanje i skladištenje ima minimalni utjecaj. Pokazalo se da je antioksidacijska aktivnost u

korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola, ali također ovisi i o boji meda. Brojna istraživanja potvrdila su da med tamne boje ima veći sadržaj ukupnih fenola te posljedično veću antioksidacijsku aktivnost (Vallianou i sur., 2014).

Antioksidansi mogu biti:

1. Neenzimatski (polifenoli, tiolni antioksidansi, vitamin E, askorbinska kiselina)
2. Enzimatski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, transferin, albumin).

#### 2.2.4. Flavonoidi i fenolne kiseline u medu

Fenolni spojevi ili polifenoli su jedna od najvažnijih i najrasprostranjenijih grupa tvari koje su prisutne u biljkama, a nastaju i kao produkti njihovog sekundarnog metabolizma. Flavonoidi i fenolne kiseline tvore najvažnije grupe polifenola a mogu se podijeliti na flavonole, flavanone, flavone, antocijanidine i izoflavone. Odlikuju se antibakterijskim, protuupalnim, antialergijskim i antitrombotičnim djelovanjem (Šarić, 2011). Najčešće su u obliku glikozida što ih čini dobro topljivima u vodi (Kapš, 2013). Izvori fenola u medu su nektar i propolis (Mujić i sur., 2014). Osim flavonoida med sadrži i druge fenole od kojih se najviše fenolne kiseline poput galne, kumarinske, kofeinske, elaginske i ferulične te njihovi esteri (Rasupuleti i sur., 2016). Flavonoidi koji se najčešće nalaze u medu su apigenin, krizin, galangin, hesperetin, kamferol, kvercetin, luteolin, miricetin i pinocembrin (Šarić, 2011). Prisustvo navedenih flavonoida u medu prvenstveno ovisi o botaničkom podrijetlu pa se pojedini flavonoidi označavaju kao markeri botaničkog podrijetla meda (Lachman i sur., 2010). Ispitivanja sadržaja fenolnih spojeva i flavonoida u medu su pokazala da postoji korelacija s botaničkim i geografskim podrijetlom s jedne strane i antimikrobnim djelovanjem s druge strane (Paspuleti i sur., 2006; Bertoneclj, 2008).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. ZADATAK RADA**

Zadatak ovog rada bio je odrediti sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost uzoraka livadnog i cvjetnog meda iz različitih područja Hrvatske.

#### **3.2. MATERIJALI**

##### 3.2.1. Uzorci:

Analizirano je ukupno 45 uzoraka meda od čega su 34 uzorci cvjetnog meda, a preostalih 11 su uzorci meda livade. Svi uzorci su poznatog podrijetla s područja Republike Hrvatske, od čega su 21 uzorak s područja Zagreba i okolice, 4 s područja Mostara i Širokog Brijega, 3 iz Slovenije, 7 iz Siska, 6 iz područja istočne Hrvatske, 2 iz Varaždina te po jedan s područja Knina i Šila.

Provedeno je određivanje ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu metode te određivanje potencijalne antioksidacijske ovisnosti pomoću dviju metoda, FRAP metode i DPPH metode.

Rezultati analiza predstavljaju vrijednosti tri paralelna mjerenja za svaki uzorak.

##### 3.2.2. Oprema:

Spektrofotometar

Električna mješalica

Analitička vaga

pH metar

vodena kupelj

laboratorijsko posuđe (kivete, pipete, staklene čaše, epruvete, odmjerne tikvice, lijevci, mikropipete, stakleni štapić).

### 3.2.3. Reagensi:

TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin)

40 mM HCl

20 mM željezov klorid ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )

300 mM acetatni pufer,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , pH 3,6

20 mM željezov sulfat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Destilirana voda

Apsolutni etanol

130  $\mu\text{M}$  DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u apsolutnom etanolu

100 mM acetatni pufer,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , pH 5,5

Glukoza

Fruktoza

Maltoza

Saharoza

Galna kiselina

10 % Folin-Ciocalteu's phenol reagens.

## 3.3. METODE RADA

### 3.3.1. Priprema analoga meda

#### PRINCIP:

Za potrebe ispitivanja pripremljen je analog meda (umjetni med čiji sastav odražava prosječan sastav šećera u medu) koji sadrži 40 % fruktoze, 30 % glukoze, 8 % maltoze i 2 % saharoze. Korištenjem analoga provjerava se interferiraju li glavni sastojci meda (šećeri) u analizama i utječe li nativna boja meda na rezultate mjerenja.



## POSTUPAK:

Za pripremu 100 g analoga izvaže se 40 g fruktoze, 30 g glukoze, 8 g glukoze, 8 g maltoze i 2 g saharoze te otopi u 20 mL destilirane vode. Pripremljeni analog se čuva na mračnom mjestu pri sobnoj temperaturi.

### 3.3.2. Određivanje udjela ukupnih fenola

#### PRINCIP:

Sadržaj ukupnih fenola je određen spektrofotometrijski u otopini meda. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfotungstične i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih sastojaka ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet plavog obojenja pri valnoj duljini 750nm (Beretta i sur., 2005, Bertonec i sur., 2007).

#### POSTUPAK:

Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline:

Pripremi se *stock* otopina galne kiseline te iz nje standardne otopine galne kiseline u koncentracijama 20-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tako što se otpipetira 300  $\mu\text{L}$  otopine svake koncentracije galne kiseline i 3 mL 10 % Folin-Ciocalteu reagensa. Standardna otopina se promješa na vortexu 2 minute te se nakon 20 minuta mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri 750nm. Svaki uzorak standardne otopine se analizira u tri ponavljanja, na temelju izmjerenih apsorbancija, nacrtava se baždarni dijagram.

Priprema otopine uzorka:

5, 0000 g uzorka meda se izvaže, otopi u 20 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni destiliranom vodom do oznake.

Određivanje:

U epruvetu se otpipetira 300  $\mu\text{L}$  otopine meda i doda 3 mL Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se mješa na električnoj mješalici 2 minute te se nakon 20 minuta očita apsorbancija pri 750nm u odnosu na analog šećera odnosno slijepu probu.

RAČUN:

Baždarni pravac se nacrtava pomoću računala na temelju rezultata dobivenih mjerenjem apsorbancije različitih koncentracija galne kiseline. Pomoću baždarnog pravca dobije se jednačina prema kojoj se izračuna koncentracija te udio ukupnih fenola.

U ovom slučaju, dobivena jednačina pravca glasi:

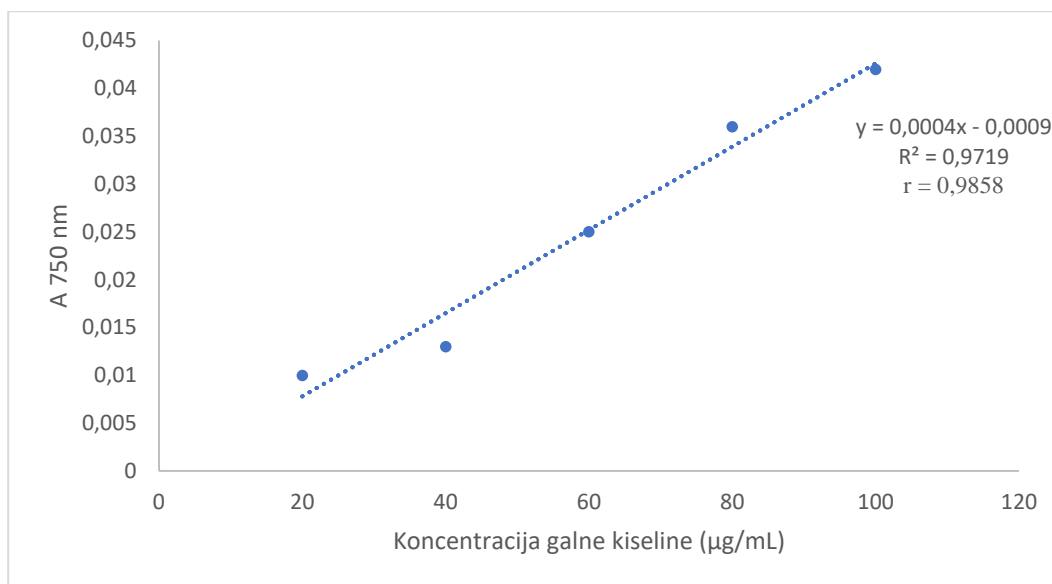
$$y = 0,0004x + 0,0009$$

gdje je:

$y$  – apsorbancija pri 750 nm

$x$  – koncentracija galne kiseline ( $\mu\text{g/mL}$ )

ukupni fenoli se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (eng. Gallic Acid Equivalents GAE) po kg meda.



Slika 3. Baždarni dijagram galne kiseline za određivanje ukupnih fenola

### 3.3.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

#### PRINCIP:

Nespareni elektron DPPH radikala postiže apsorbancijski maksimum pri 517 nm i ljubičaste je boje. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani DPPH-H. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona ( Prakash, 2001). Dodatak antioksidansa rezultira smanjenjem apsorbanije koja je proporcionalna koncentraciji i antioksidacijskoj aktivnosti samog spoja (Beretta i sur., 2005, Bertocelj i sur., 2007).

#### POSTUPAK:

Pripremi se početna otopina meda tako što se izvaže 15 g uzorka meda, kvantitativno se prenese u odmjenu tikvicu od 25 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz te otopine se razrjeđivanjem pripremi 11 otopina različite koncentracije meda od 30-600 mg/mL.

Tablica 2. Priprema 11 otopina meda (koncentracija 1-20 mgmL<sup>-1</sup>)

Oznaka	V <sub>otopine meda</sub> (mL)	V <sub>vode</sub> (mL)	C <sub>meda</sub> (mgmL <sup>-1</sup> )
1	0,1	1,9	1
2	0,2	1,8	2
3	0,4	1,6	4
4	0,6	1,4	6
5	0,8	1,2	8
6	1,0	1,0	10
7	0,2	0,8	12
8	0,4	0,6	14
9	0,6	0,4	16
10	0,8	0,2	18
11	2,0	0,0	20

Priprema kontrolnog uzorka:

Izvaže se 15 g šećernog analoga, otopi u destiliranoj vodi te se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 25 ml i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz početne otopine se razrjeđivanjem pripremi 11 otopina različitih koncentracija analoga.

Određivanje:

U svaku epruvetu s otopinom meda i epruvetu kontrolnog uzorka se otpipetira 1,9 DPPH reagensa te 1 mL acetatnog pufera. Usporedno se naprave slijepa probe za čiju se pripremu koriste sve otopine osim DPPH reagensa kako bi se eliminirao utjecaj boje meda. Tako pripremljene otopine se mješaju na vortexu i ostavljaju 90 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi. Nakon toga se na spektrofotometru pri 517 nm mjere apsorbancije svakog uzorka meda i svakog kontrolnog uzorka u odnosu na slijepu probu.

Račun:

Iz dobivenih rezultata se napravi graf ovisnosti preostalog DPPH o koncentraciji meda. Rezultat se izražava kao IC<sub>50</sub>, odnosno kao koncentracija meda (antioksidanska) koja uzrokuje inhibiciju 50% DPPH radikala. IC<sub>50</sub> se računa iz jednadžbe pravca za svaki pojedinačni uzorak.

Preostali DPPH se računa iz sljedeće jednadžbe :

$$\text{Preostali DPPH (\%)} = (A_{uz} - A_{SP} / A_K) \times 100$$

*A<sub>UZ</sub> apsorbancija uzorka meda*

*A<sub>K</sub> apsorbancija kontrolnog uzorka*

*A<sub>SP</sub> apsorbancija slijepa probe*

### 3.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

PRINCIP:

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksa u ferri obliku u fero oblik koji je plave boje, u prisutstvu antioksidansa pri pH 3,6. Redukcija se prati mjerenjem apsorbancije pri 593 nm. Rezultati se izražavaju kao FRAP vrijednost (μM Fe(II)) 10 % otopine meda (Beretta i sur., 2005, Bertonecclj i sur., 2007).

POSTUPAK:

Baždarni dijagram:

Pripremi se stock otopina tako što se izvaže 0,55604 g željezovog sulfata te se kvantitativno prenese u odmjeru tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz pripremljene otopine se naprave standardne otopine željezovog sulfata u koncentracijama 0,04, 0,1, 0,2, 0,3 i 0,4 mM. Otpipetira se 200  $\mu$ L svake koncentracije u epruvetu, doda se 1,8 FRAP reagensa, promješa na električnoj mješalici te inkubira u vodenoj kupelji na temperaturi 37 stupnjeva 10 minuta. Zatim se izmjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 593 nm u odnosu na slijepu probu.

Priprema otopine uzorka meda:

U čašu se izvaže 5,0000 g meda te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Priprema FRAP reagensa:

Na analitičkoj vagi se izvaže 0,0312 g TPTZ reagensa u tikvicu od 10 mL i dopuni do oznake 40 mM HCl-om te se smjesa u potpunosti otopi u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C. Zatim se u tikvicu od 10 mL izvaže 0,0541 g željezo klorida i dopuni destiliranom vodom do oznake. Za pripremu FRAP reagensa se otpipetiraju pripremljeni TPTZ reagens,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i acetatni pufer u omjeru 1:1:10. FRAP reagens se uvijek priprema neposredno pred uporabu, a između analiza se čuva u vodenoj kupelji pri 37 °C.

Određivanje:

Za analizu se u kivetu otpipetira 200  $\mu$ L uzorka otopine meda i doda 1,8 mL FRAP reagensa te se inkubira 10 minuta pri temperaturi od 37 °C u vodenoj kupelji. Zatim se na spektrofotometru izmjeri apsorbancija pri 593 nm u odnosu na slijepu probu.

IZRAČUN:

Nacrta se baždarni dijagram uporabom računala te se pomoću njega dobije jednadžba pravca prema kojoj se izračuna FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe (II)}$ ) 10 %-tne otopine meda.

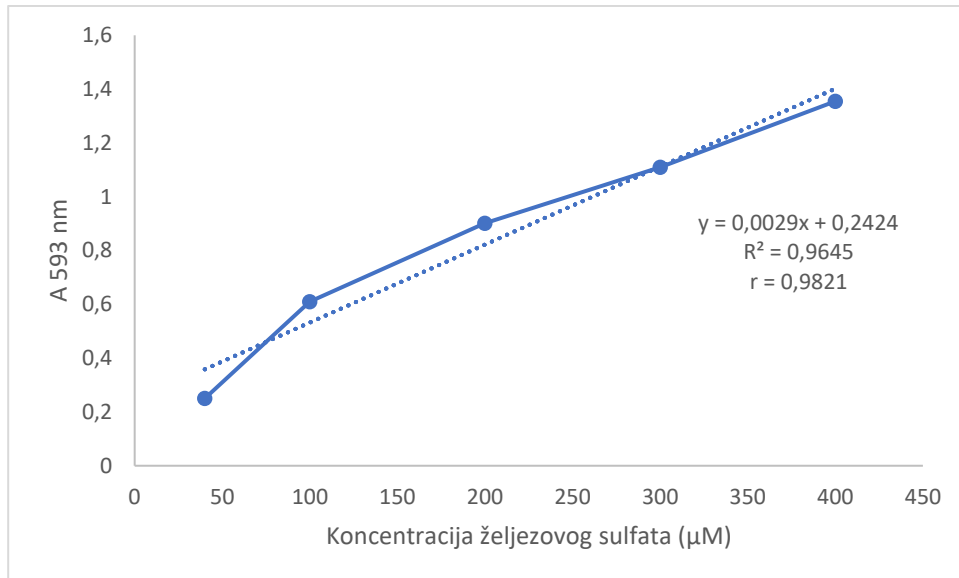
U ovom slučaju dobivena jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0029x + 0,2424$$

*gdje je:*

$y$  – apsorbancija pri 593 nm

$x$  – koncentracija željezovog sulfata ( $\mu\text{M}$ )



Slika 4. Baždarni dijagram željezovog sulfata za FRAP metodu

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Zadatak ovog rada bio je analizirati 45 uzoraka meda od čega su 34 uzorci cvjetnog meda, a preostalih 11 su uzorci meda livade. Svi uzorci su poznatog podrijetla s područja Republike Hrvatske, od čega su 21 uzorak s područja Zagreba i okolice, 4 s područja Mostara i Širokog Brijega, 3 iz Slovenije, 7 iz Siska, 6 iz područja istočne Hrvatske, 2 iz Varaždina te po jedan s područja Knina i Šila. Za navedene uzorke određen je udio ukupnih fenola pomoću spektrofotometrijske metode Folin-Ciocalteu te antioksidacijska aktivnost pomoću DPPH i FRAP metode. Osim što su metode FRAP i DPPH vrlo brze, one su i jednostavne te reagensi nisu skupi i bez obzira na sitne nedostatke, vrlo često se primjenjuju u praksi.

*Tablica 3. Udio ukupnih fenola u uzorcima cvjetnog meda*

<b>Uzorak</b>	<b>A 750 nm (prosječne apsorbancije)</b>	<b>Prosječni udio ukupnih fenola (mg GAEkg<sup>-1</sup> meda)</b>
005	0,024	62,25
006	0,031	79,75
008	0,045	114,75
010	0,044	112,25
012	0,045	114,75
021	0,062	157,25
022	0,052	132,25
027	0,043	109,75
029	0,051	129,75
032	0,051	129,75
035	0,049	124,75
038	0,004	12,25
039	0,010	27,25
049	0,005	14,75
051	0,006	17,25
057	0,004	12,25

Tablica 4. Udio ukupnih fenola u uzorcima cvjetnog meda – nastavak

<b>Uzorak</b>	<b>A 750 nm (prosječne apsorbancije)</b>	<b>Prosječni udio ukupnih fenola (mg GAEkg<sup>-1</sup> meda)</b>
077	0,015	39,75
078	0,0593	150,58
082	0,048	122,25
085	0,051	129,75
091	0,050	127,25
094	0,012	32,25
098	0,031	79,75
108	0,029	74,75
111	0,053	134,75
112	0,036	92,25
118	0,077	194,75
130	0,027	69,75
131	0,066	168,08
135	0,031	79,75
143	0,062	157,25
145	0,052	131,42
147	0,069	174,75
149	0,035	89,75

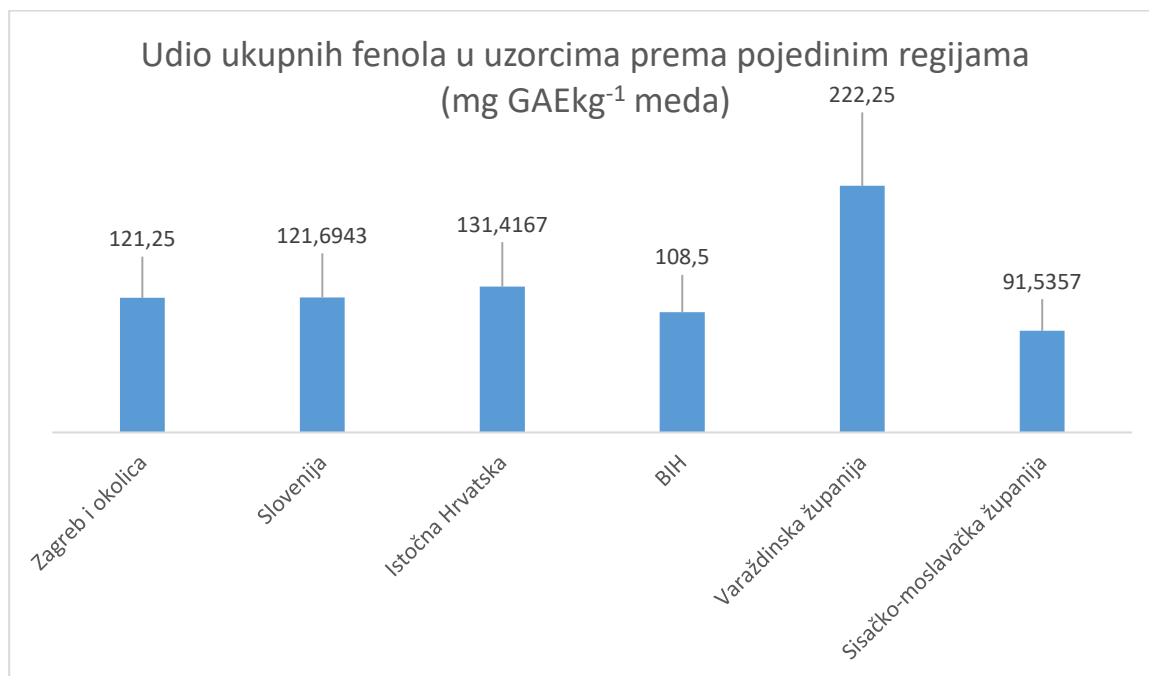


Tablica 5. Udio ukupnih fenola u uzorcima meda livade

Uzorak	A 750 nm (prosječna apsorbancija)	Prosječna vrijednost ukupnih fenola ( mg GAEkg <sup>-1</sup> meda)
001	0,102	257,25
007	0,070	177,25
024	0,063	159,75
040	0,099	249,75
047	0,074	187,25
061	0,094	237,25
068	0,070	177,25
072	0,072	182,25
073	0,056	142,25
137	0,082	207,25
141	0,047	119,75

Sadržaj ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a rezultati su izraženi kao miligrami galne kiseline po kilogramu meda. Prema istraživanjima, količine flavonoida u medu su vrlo različite te im vrijednosti mogu iznositi i do 6000 µgkg<sup>-1</sup> (Kurtagić, 2017). Pojedina ispitivanja udjela ukupnih fenola u medu su pokazala da postoji korelacija s antimikrobnim djelovanjem ali i s njegovim cvjetnim i botaničkim podrijetlom (Bertocelj, 2008; Pasupuleti i sur., 2016). U analiziranim uzorcima udio ukupnih fenola kretao se u vrijednosti od 12,25 do 257,25 mg galne kiseline po kg meda te jako varira od uzorka do uzorka iako je riječ o istoj vrsti meda što je vidljivo u tablici 2. Srednja vrijednost i standardna devijacija ukupnih fenola iznosila je 136,899±62,686. U istraživanju Berrete i sur. na uzorcima talijanskog meda srednja vrijednost ukupnih fenola je iznosila 170,4 ± 1,7 mg GAEkg<sup>-1</sup> meda dok su rezultati Bertocelj i sur., iznosili 126,8 do 194,6 mg GAEkg<sup>-1</sup> meda, sa srednjom vrijednošću od 157,3 mg GAEkg<sup>-1</sup> meda što je nešto više od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. U istraživanju koje je provela Flanjak, 2012. na različitim vrstama medova prikazano je da se rezultati značajno razlikuju s obzirom na vrstu meda. Na primjer, prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola meda kestena iznosila je 162,1+/-21,6 mg GAEkg<sup>-1</sup> meda, meda kadulje 96,5+/-13,6 mg GAEkg<sup>-1</sup>

meda, meda bagrema  $39,1 \pm 6,8$  mg GAEkg<sup>-1</sup> meda, a medljikovca  $318,6 \pm 132,6$  mg GAEkg<sup>-1</sup> meda.



Slika 5. Udio ukupnih fenola u uzorcima prema pojedinim regijama (mg GAEkg<sup>-1</sup> meda)

Na ovoj slici je prikazan udio ukupnih fenola u uzorcima meda cvijeta i livade prema pojedinim regijama u Hrvatskoj, BiH i Sloveniji. Uzorci meda iz Sisačko-moslavačke županije imali su vidno niži udio fenola, dok su uzorci prikupljeni u Varaždinskoj županiji znatno prednjačili u odnosu na ostale. Budući da je antioksidativna aktivnost jedno od najvažnijih svojstava fenola i flavonoida, možemo reći kako su ovim mjerenjem uzorci s područja Varaždinske županije pokazali najveću antioksidativnu aktivnost.

Tablica 6. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u uzorcima cvjetnog meda

<b>Uzorak</b>	<b>Masa uzorka(g)</b>	<b>Jednadžba pravca</b>	<b>Koeficijent korelacije</b>	<b>IC50 (mgmL<sup>-1</sup>)</b>
005	14,9948	$y=-2,2735x + 57,56$	0,9991	3,33
006	15,0491	$y=-0,9466x + 53,379$	0,9733	3,57
008	14,8667	$y=-2,0319x + 76,856$	0,9979	13,22
010	14,9341	$y=-2,7068x + 67,313$	0,9056	6,40
012	14,9826	$y=-2,7388x + 75,682$	0,9704	9,38
021	15,0524	$y=-3,1559x + 73,053$	0,957	7,30
022	14,9404	$y=-3,1832x + 80,108$	0,9814	9,46
027	14,9404	$y=-2,9096x + 76,63$	0,9124	9,15
029	14,9511	$y=-3,4786x + 83,584$	0,9995	9,65
032	14,9476	$y=-2,9978x + 84,324$	0,9945	11,45
035	14,8430	$y=-2,7289x + 82,906$	0,9804	12,09
038	15,0222	$y=-1,3987x + 94,14$	0,9537	31,56
039	14,8785	$y=-2,2502x + 84,659$	0,9998	15,40
049	14,8804	$y=-5,4577x + 114,5$	0,9708	11,82
051	15,0485	$y=-3,3064x + 88,087$	0,92	11,52
057	15,1258	$y=-2,8473x + 95,753$	0,9849	16,07
077	14,9444	$y=-2,0554x + 67,659$	0,9890	8,59
078	15,1642	$y=-3,0732x + 69,74$	0,9870	8,40

Tablica 7. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u uzorcima cvjetnog meda – nastavak

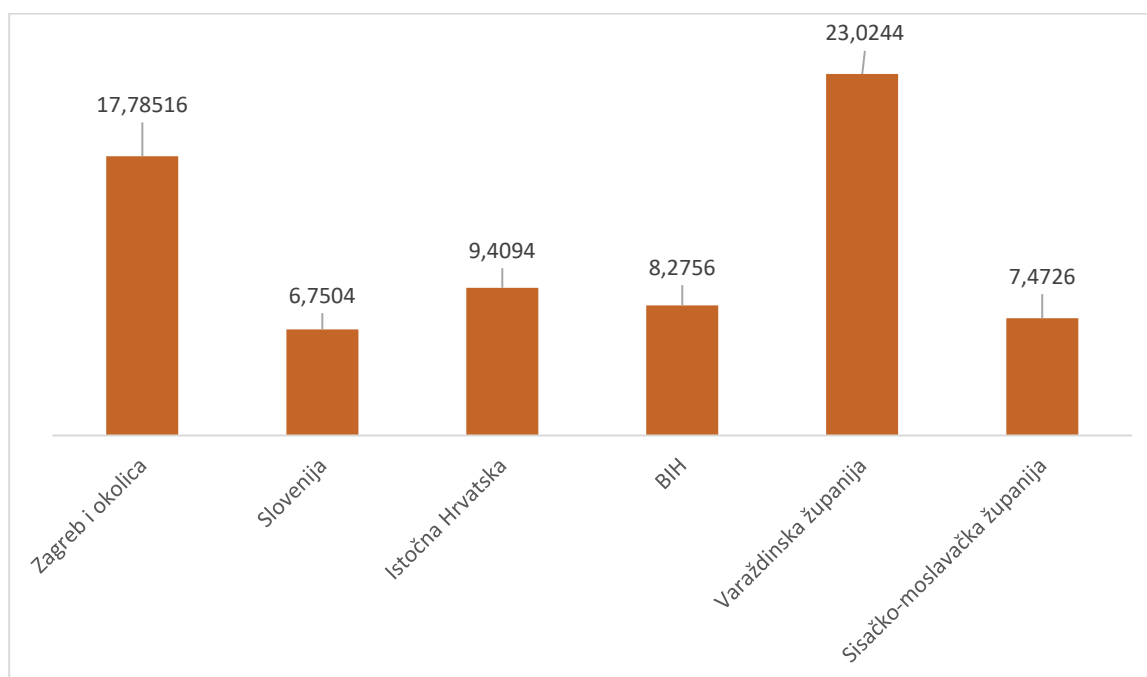
<b>Uzorak</b>	<b>Masa uzorka(g)</b>	<b>Jednadžba pravca</b>	<b>Koeficijent korelacije</b>	<b>IC50 (mgmL<sup>-1</sup>)</b>
082	14,8720	$y=-2,2998x + 69,329$	0,9780	8,40
085	14,8910	$y=-1,9723x + 105,38$	0,9962	28,08
091	14,9666	$y=-3,8023x + 98,609$	0,9429	12,78
094	14,9063	$y=-3,4105x + 112,35$	0,9920	18,28
098	14,9355	$y=-1,621x + 104,14$	0,9921	33,40
108	14,8214	$y=-1,6748x + 111,99$	0,9956	37,01
111	15,1253	$y=-2,1442x + 55,473$	0,9973	2,55
112	15,0586	$y=-1,6669x + 44,654$	0,9496	3,21
130	14,8544	$y=-1,8851x + 51,813$	0,9962	0,96
131	14,8448	$y=-1,8164x + 52,033$	0,9958	1,12
135	14,8465	$y=-2,0383x + 51,692$	0,9753	0,83
143	15,0780	$y=-1,1383x + 65,97$	0,9628	14,03
145	15,0756	$y=-3,4534x + 71,714$	0,9987	6,29
147	15,1257	$y=-2,2325x + 57,267$	0,9857	3,25
149	15,0619	$y=-1,1377x + 65,485$	0,9952	13,61

Tablica 8. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u uzorcima meda livade

Uzorak	Masa uzorka(g)	Jednadžba pravca	Koeficijent korelacije	IC50 (mgmL <sup>-1</sup> )
007	14,8237	-3,3556x + 93,591	0,985	12,99
024	14,9967	-1,3209x + 81,512	0,9732	23,85
040	14,9318	-4,7671x + 101,79	0,9993	10,86
047	14,9400	-3,2432x + 103,78	0,9955	16,58
061	14,9405	-2,8857x + 114,09	0,8764	22,21
064	14,8545	-1,4996x + 114,58	0,9993	43,06
068	15,0919	-2,3444x + 121,46	0,9958	30,48
072	15,1128	-3,3845x + 121,39	0,9964	21,09
073	15,0168	-4,0678x + 136,02	0,9919	18,69
137	14,8550	-3,0865x + 123,58	0,9954	23,84
141	14,9390	-2,1328x + 110,64	0,9916	28,43

“Radical scavenging” aktivnost, odnosno sposobnost “hvatanja” slobodnih radikala određena DPPH metodom izražena je kao IC50 vrijednost (koncentracija meda pri kojoj je vezano 50% DPPH) i prikazana je u Tablici 3. Budući da dodatak antioksidansa u ovoj metodi rezultira smanjenjem apsorbancije, manji rezultat će značiti veću antioksidacijsku aktivnost i obrnuto. Tako su rezultati u ovom istraživanju pokazali da antioksidacijska aktivnost u uzorcima cvjetnog meda visoka te je prosječna srednja vrijednost IC50 iznosila  $13,0877 \pm 9,0886 \text{ mgmL}^{-1}$ , dok je za uzorke meda livade antioksidacijska aktivnost izražena kao IC50 iznosila  $22,9183 \pm 3,1738 \text{ mgmL}^{-1}$ . Prema dostupnim literaturnim podacima primijećena su odstupanja u rezultatima primjerice Berreta i sur. su u cvjetnom medu dobili prosječne IC50 vrijednosti za cvjetni med od  $8,1 \pm 0,03 \text{ mgmL}^{-1}$  što je niže od rezultata ovog istraživanja, a ustvari znači da je med iz njegovog istraživanja imao veći antioksidacijski kapacitet. Cvjetni med može biti proizveden od velikog broja različitih biljnih vrsta pa je moguće da su uzorci ispitivani u ovom istraživanju imali viši udjel biljaka koje nose manju antioksidacijsku aktivnost. Također,

Bertoncelj i sur. proveli su istraživanje na uzorcima slovenskog meda te su njihove vrijednost IC50 u uzorcima cvjetnog meda od 8,1 do 13,9 mgmL<sup>-1</sup> što se dobro poklapa s dijelom uzoraka u ovom istraživanju. Antioksidacijski kapacitet meda značajno ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu zbog čega je prisutna velika varijacija u rezultatima. Na primjer, u istraživanju koje je provela Flanjak iz 2012. vidimo da je najniži antioksidativni kapacitet imao najsvjetliji med bagrema (73,50-201,36 mgmL<sup>-1</sup>), zatim med kadulje (18,65-34,08 mgmL<sup>-1</sup>) dok su tamnije vrste meda imale viši antioksidativni kapacitet (med kestena (11,34-21,36 mgmL<sup>-1</sup>) i medljikovac (3,46-14,14)). Isto tako, u istraživanju provedenom na uzorcima meda iz Bangladeša (Ruiz-Navajas, Y. I sur., 2011.) možemo primjetiti raspon antioksidativne aktivnosti prisutan u multifloornim medovima. Vrijednosti IC 50 se kreću u rasponu od 33,6-97,5%, od kojih četiri multiflorna uzorka pokazuju višu antioksidativnu aktivnost, kao i uzorci multifloornih medova u istraživanju Islam A. i sur. iz Alžira (44,55%) i Indije (57,5%). Budući da je med istraživan u ovom radu multifloorni, moguća je prisutnost udjela više biljnih vrsta koje imaju različita antioksidacijska svojstva.



Slika 6. Usporedba srednjih IC50 vrijednosti u uzorcima prema pojedinim regijama

Na slici je prikazana usporedba IC50 vrijednosti uzoraka meda cvijeta i livade iz pojedinih regija u Hrvatskoj, BiH i Sloveniji, dobivena određivanjem antioksidativne aktivnosti DPPH metodom. Vrijednosti dobivene ovom metodom pokazuju da su uzorci sa područja Slovenije imali najnižu IC50 vrijednost, odnosno najveću antioksidativnu aktivnost budući da je potrebna

manja koncentracija meda kako bi došlo do inhibicije 50% DPPH radikala. Suprotno od toga, uzorci prikupljeni s područja Varaždinske županije i Grada Zagreba pokazali su najmanju antioksidativnu aktivnost, odnosno imali su najveću IC50 vrijednost.

Tablica 9. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u uzorcima cvjetnog meda

<b>Uzorak</b>	<b>A 593 nm</b>	<b>FRAP vrijednost (<math>\mu\text{M}</math> (II))</b>
005	0,685	152,62
006	0,672	148,14
008	0,666	146,07
010	0,714	162,62
012	0,851	209,86
021	0,723	165,72
022	0,618	129,52
027	1,080	288,83
029	0,848	208,83
032	0,711	161,59
035	0,646	139,17
038	0,906	228,83
039	1,096	294,34
049	1,090	292,28
051	0,742	172,28
057	0,723	165,72
077	0,555	107,79



*Tablica 10. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u uzorcima cvjetnog meda – nastavak*

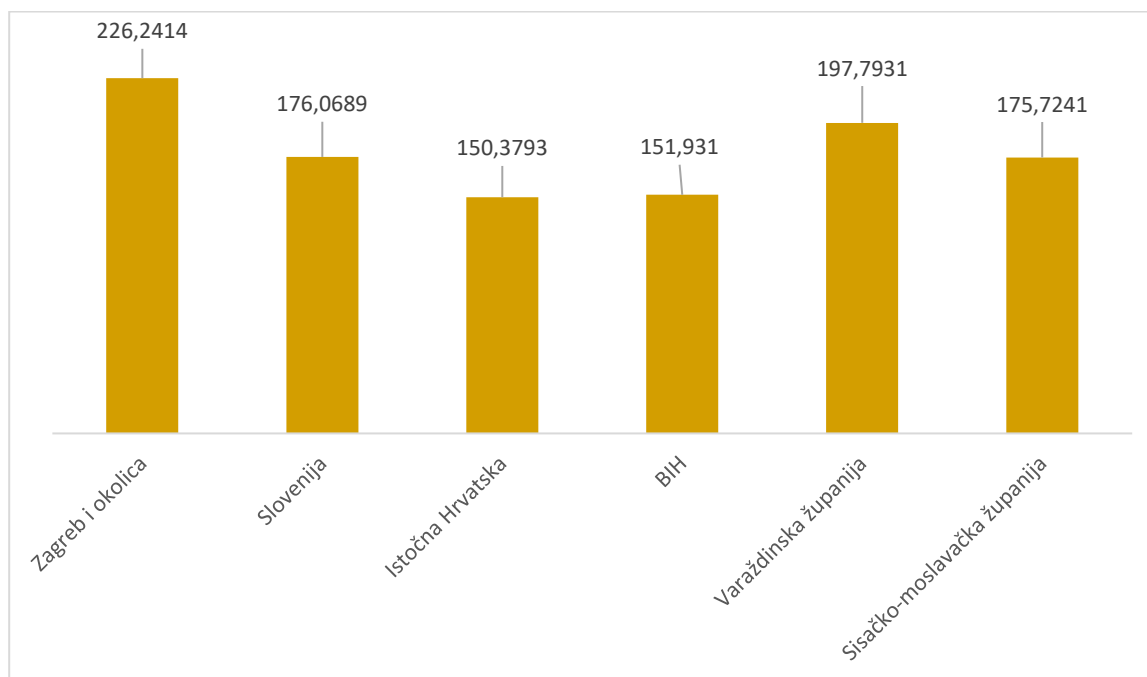
078	1,195	328,48
082	1,093	293,31
085	1,082	289,52
091	1,104	297,10
094	0,811	196,07
098	0,564	110,90
108	0,595	121,59
111	0,581	116,76
112	0,579	116,07
118	0,552	106,76
130	0,518	95,03
131	0,522	96,41
135	0,592	120,55
143	0,587	118,83
145	0,601	123,65
147	0,509	91,93
149	0,884	221,24

Tablica 11. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u uzorcima meda livade

Uzorak	A 593 nm (prosječne apsorbancije)	FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe (II)}$ )
001	1,136	308,14
007	0,709	160,90
024	0,985	256,07
040	1,425	407,79
047	1,425	407,79
061	0,917	232,62
068	0,998	260,55
072	1,109	298,83
073	0,816	197,79
137	0,715	162,97
141	0,888	222,62

FRAP metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju reduciraju žuti kompleks željeza (III) sa 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPPZ) u plavo obojeni kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -TPPZ, pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intenzitet nastale plave boje pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom izražena je kao  $\mu\text{M Fe(II)}$  10%-tne otopine meda, a rezultati su prikazani u Tablici 4., a kretale su se od 160,8965  $\mu\text{M Fe(II)}$  do 407,7931  $\mu\text{M Fe(II)}$  za uzorke meda livade dok je srednja vrijednost iznosila 265,0971 te od 91,9310  $\mu\text{M Fe(II)}$  do 328,4827  $\mu\text{M Fe(II)}$  za uzorke cvjetnog meda uz srednju vrijednost 177,0121  $\mu\text{M Fe(II)}$ . Ovi rezultati su nešto niži od onih dobivenih u istraživanju Berreta i sur. gdje je u cvjetnom medu utvrđeno  $361,9 \pm 10,8 \mu\text{M Fe(II)}$  10 % o.m, dok je u istraživanju Bertoneclj i sur., dobivena vrijednost od 181,1 do 262,9  $\mu\text{M Fe(II)}$  10% o.m. sa srednjom vrijednošću od 71,0  $\mu\text{M Fe(II)}$  10% o.m. Isto tako, Lachman i sur. su ovaj parametar određivali na uzorcima iz Češkog meda te su prosječne vrijednosti za cvjetni med iznosile 295,35  $\mu\text{M}$

Fe(II) 10% o.m što je viša vrijednost od one dobivene u ovom istraživanju, odnosno imaju višu antioksidativnu aktivnost. FRAP vrijednosti, kao i IC50 i udio ukupnih fenola, značajno ovisi o botaničkom podrijetlu meda. Na primjer, u istraživanju provedenom na medu iz Bangladeša vidimo da se FRAP vrijednosti uniflornog meda kreću do 140,23  $\mu\text{M}$  Fe(II) dok se vrijednosti multiflornog meda kreću i do 772,4  $\mu\text{M}$  Fe(II).



Slika 7. Usporedba srednjih FRAP vrijednosti u uzorcima prema pojedinim regijama

Na slici je prikazana usporedba antioksidativne aktivnosti uzoraka meda cvijeta i livade iz pojedinih regija Hrvatske, BiH i Slovenije izražena kao  $\mu\text{M}$  Fe(II) 10%-tne otopine meda. Rezultati dobiveni određivanjem pomoću FRAP metode pokazuju da su najveću antioksidativnu aktivnost imali uzorci s područja Grada Zagreba i Varaždinske županije dok su najnižu antioksidativnu aktivnost pokazali uzorci s područja BiH i Istočne Hrvatske. Rezultati FRAP metode nisu potpuno vjerodostojni budući da je veliki nedostatak ove metode taj što će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, ako posjeduje niži standardni potencijal od redoks para, dovesti do redukcije kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka, odnosno dati će lažno veće rezultate, što može objasniti razlike u rezultatima mjerenja DPPH i FRAP metodom.

## 5. ZAKLJUČCI

Provedenim istraživanjem na 45 uzoraka cvjetnog i livadnog meda određen je udio ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost koristeći dvije metode, FRAP i DPPH.

1. Udio ukupnih fenola se kretao u rasponu od 12,25 do 257,25 mg GAEkg meda što je nešto niža vrijednost u odnosu na dostupna literaturna istraživanja.
2. Rezultati istraživanja DPPH su pokazali da je antioksidacijska aktivnost u uzorcima cvjetnog meda niska. Prosječna srednja vrijednost IC<sub>50</sub> iznosila je  $13,0877 \pm 9,0886$  mgmL<sup>-1</sup>, dok je za uzorke meda livade antioksidacijska aktivnost izražena kao IC<sub>50</sub> iznosila  $22,9183 \pm 3,1738$  mgmL<sup>-1</sup>. U odnosu na ostala istraživanja, ovi uzorci imali su nešto nižu antioksidacijsku aktivnost.
3. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom su varirali od 160,8965 μM Fe(II) do 407,7931 μM Fe(II) za uzorke meda livade dok je srednja vrijednost iznosila 265,0971 te od 91,9310 μM Fe(II) do 328,4827 μM Fe(II) za uzorke cvjetnog meda uz srednju vrijednost 177,0121 μM Fe(II). Rezultati ovog istraživanja pokazuju višu FRAP vrijednost od istraživanja provedenih na slovenskom medu, a nižu vrijednost od onog provedenog na češkom medu.
4. Veliko variranje antioksidacijske vrijednosti između uzoraka može se pripisati različitosti u botaničkom i geografskom podrijetlu meda. Budući da se cvjetni med može proizvesti od velikog broja različitih biljnih vrsta, moguće je da su uzorci ispitivani u ovom istraživanju imali viši udio biljnih vrsta koje nose manju antioksidacijsku aktivnost.
5. Po svemu navedenom, određivanje antioksidacijske aktivnosti se može koristiti kao jedan od parametara za određivanje botaničkog podrijetla meda, ali ne kao isključiva metoda.

## 6. LITERATURA

Anupama, D., Bhat, K.K., Sapna, V.K. (2003) Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Res. Int.* **36**, 183-191.

Ataç Mogol, B. (2014) Mitigation of Thermal Process Contaminants by Alternative Technologies, Disertacija, Hacettepe University, Ankara, citirano: 24.9.2019., DOI: 10.13140/2.1.3463.3602

Batinić, K., Palinić, D. (2014) Priručnik o medu, Federalni agromediteranski zavod, Mostar. ([http://www.faz.ba/sites/default/files/publikacije/Prirucnik%20o%20Medu\\_2014.pdf](http://www.faz.ba/sites/default/files/publikacije/Prirucnik%20o%20Medu_2014.pdf))(01.06.2019).

Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007) Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **105**, 822-828.

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* **533**, 185-191.

Bhandari, B., D'Arcy, B., Chow, S. (1999) Rheology of selected Australian honeys. *J. Food Eng.* **41**, 65-68.

Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P. (1999) Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Commission. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 108-125.

Chandra, N., Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods-impact on human health. *Pharm. Rev.* **4**, 118-126.

Finke, M.D. (2005) Nutrient composition of bee brood and its potential as human food. *Ecol. Food Nutr.* **44**, 257-270.

Flanjak, I. (2012) Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja, Disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, citirano: 30.08.2019., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:121356>.

Hermosin, I., Chicon, R. M., Cabezudo, D. (2003) Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem.* **83**, 263-268.

Islam A., Ibrahim K., Islam N., Moniruzzaman M., Mottalib A., Amrah Sulaiman S and Siew Hua Gan. (2012) Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *ISCMR.* **12**, 177.

Krell, R. (1996) Value-added products from beekeeping, <<http://fao.org/docrep/w0076e/w0076e04.htm#2.2>>. Pristupljeno 1. lipnja 2019.

Karabournioti S., Zervalaki P. (2001) The effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta.* **36**, 177-181.

Kapš, P. (2013) Liječenje pčelinjim proizvodima - Apiterapija, Geromar, Zagreb, str. 17-18.

Khalil, M. I., Sulaiman, S.A., Boukraa, L. (2010) Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *TONUTRAJL.* **3**, 6-16.

Krijan, L. (2017) 'Slobodni radikali', Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, citirano: 04.06.2019., <<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:572298>>.

Lachman, J., Orsac, M., Hejtmankova, A., Kovarova E. (2010) Evaluation of antioxidant activity and total phenolic of selected Czech honeys. *LWT – Food Sci. Technol.* **430**, 52-58.

Mujić, I., Alibabić V., Travljanin, D. (2014) Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda, Studiograf Rijeka, Rijeka.

Mateo, R., Bosch-Reig, F. (1997) Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.* **60**, 33-41.

Meda, A., Lamien, C., Romito, M., Millogo J., Nacoulma, O.G. (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* **91**, 571-577.

National Honey Board (2009) Honey – A Reference Guide to Nature's Sweetener, <<http://www.honey.com/nhb/tehnical/tehnical-reference>>. Pristupljeno 4. lipnja 2019.

National Honey Board (2004) Carbohydrates and the Sweetness of Honey. <<http://www.nhb.org/download/factsht/carb.pdf>>. Pristupljeno 5. lipnja 2019.

Oršolić, N., Sirovina, D., Kosalec, I., Bašić, I. (2010) Honey Bee Products: Immunomodulation and Antitumor Activity U: Comprehensive Bioactive Natural Products. *Gupta V.K.* 45-48.

Reuben C. (1998) Antioksidansi, Izvori d.o.o., Zagreb.

Paspuleti, V. R., Kumara, T.K., Naguib, S., Siew, H. G. (2016) Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stigles bees: a comparative review. *Rev. Bras. Farmacogn.* **26**, 657-664.

Pine H. S. (1994) Slobodni radikali. U: Organska kemija, 3. izd. (Runje, V., Bešenić, D., ured.), Školska knjiga, Zagreb, str. 910-940.

Poon, H. F. (2004) Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med.* **20**, 329-359.

Pravilnik o medu (2015), *Narodne novine* **53**, Zagreb.

Pravilnik o kakvoći uniflornog meda (2013), *Narodne novine* **81**, Zagreb.

Puljak, A., Perko, G., Mihok, D., Radašević, H. (2004) Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix.* **10**, 98-102.

Petričko P. (2015) Fizikalno kemijski parametri cvjetnog meda kontinentalne Hrvatske, Završni rad, Veleučilište u Karlovcu.

Prolin. U: *Hrvatski biografski leksikon (on-line)*. Leksikografski zavod "Miroslav Krleža". Pristup ostvaren 24. 9. 2019. <<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=50621>>.

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Zaldivar-Cruz, J.M., Ángel Pérez-Álvarez, J. (2011) Antioxidant Activity of Artisanal Honey From Tabasco, Mexico, *Int. J. Food Prop.*, **14**, 459-470.

Škenderov, S., Ivanov, C. (1986) Pčelinji proizvodi i njihovo korištenje, Beograd *Nolit*.

Šarić, G. (2011) Flavonoidi u medu – udjel i promjene tijekom skladištenja te njihov utjecaj na antioksidacijska svojstva meda, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, citirano: 05.06.2019., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:900988>.

Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., Velioglu, Y. S. (2006) Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chem.* **95**, 653-657.

USDA. URL: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/19296?format=Full> (4.6.2019).

Vahčić, N., Matković, D. (2009): Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda. <http://www.pcelinjak.hr/OLD/Index.php>.

Vahčić, N. (2013) Ljekovitost meda. U:100 i pokoja više crtica znanosti o prehrani,1.izd., Zvonimir Štalić, ur., *HDPBN*, str. 60-63.

Vallianou, N.G., Gounari, P., Skourtis, A., Panagos, J., Kazazis, C. (2014) Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. *Gen. Med.* **2**, 132. DOI: 10.4172/2327-5146.1000132.

White, J. W., Subers, M.H., Schepartz, A. I. (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in honey glucoseoxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* . **73**, 57-70.



## **IZJAVA O IZVORNOSTI**

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Tatjana Spajić