

Određivanje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u bagremovu među-sezona 2018.

Matančević, Mirna

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:159:350463>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Mirna Matančević
1128/USH

**ODREĐIVANJE UKUPNIH
FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE
AKTIVNOSTI U BAGREMOVU
MEDU-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.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Nadi Vahčić na iskazanom povjerenju, korisnim savjetima i pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

Hvala članovima Zavoda ing. Renati Petrović i teh. Valentini Hohnjec na strpljenju i veseloj atmosferi pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na neizmjernoj podršci, razumijevanju, strpljenju i vjeri u moj uspjeh.

Posebno hvala mom Matku bez čije podrške i ljubavi moj uspjeh ne bi bio potpun.

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 UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U BAGREMOVU MEDU-SEZONA 2018.

Mirna Matančević, 1128/USH

Sažetak: U ovom radu analiziran je 41 uzorak bagremova meda od kojih je jedan sa područja Bosne i Hercegovine, ostatak sa područja Hrvatske. 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 34,75 do 157,25 mg GAE·kg⁻¹ meda, "radical scavenging" aktivnost izražena kao IC₅₀ u rasponu od 21,18 mg·mL⁻¹ do 137,43 mg·mL⁻¹ te antioksidacijska aktivnost određena pomoću FRAP metode u rasponu od 96,29 do 300,09 μM Fe(II) 10%-tne otopine meda.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 5 slika, 5 tablica, 48 literaturnih navoda

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: *ing. Renata Petrović, teh. sur. Valentina Hohnjec*

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, (zamjena)

Datum obrane: 30. rujna 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 THE TOTAL PHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN *Acacia* HONEY-SEASON 2018

Mirna Matančević, 1128/USH

Abstract:

In this assay 41 samples of honey acacia were analyzed, one of them from Bosnia and Herzegovina, the rest of Croatia. Total phenolic content was determined by the modified Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity by two methods, FRAP and DPPH. Phenolic content ranged from 34,75 to 157,25 mg GAE·kg⁻¹ of honey, "radical scavenging" activity expressed as IC₅₀ from 21,18 mg·mL⁻¹ to 137,43 mg·mL⁻¹ and antioxidant activity determined by FRAP method in range from 96,29 to 300,09 μM Fe(II) of the 10% honey solution.

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

Thesis contains: 42 pages, 5 figures, 5 tables, 48 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph. D. Nada Vahčić, Full Professor

Technical support and assistance: ing. Renata Petrović, tech. assoc. Valentina Hohnjec

Reviewers:

1. PhD. Draženka Komes, Full Professor
2. PhD. Nada Vahčić, Full Professor
3. PhD. Ksenija Marković, Full Professor
4. PhD. Martina Bituh, Assistant Professor (substitute)

Thesis defended: 30th September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA MEDA	2
2.2. VRSTE MEDA	2
2.2.1. BAGREMOV MED	4
2.3. SVOJSTVA I SASTAV MEDA	4
2.3.1. FIZIKALNA SVOJSTVA	4
2.3.1.1. KRISTALIZACIJA	4
2.3.1.2. VISKOZNOST	5
2.3.1.3. HIGROSKOPNOST	5
2.3.1.4. ELEKTRIČNA VODLJIVOST	5
2.3.1.5. INDEKS REFRAKCIJE	5
2.3.2. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA	5
2.3.3. KEMIJSKI SASTAV MEDA	6
2.3.3.1. UGLJIKOHIDRATI	7
2.3.3.2. VODA	7
2.3.3.3. PROTEINI I AMINOKISELINE	7
2.3.3.4. ORGANSKE KISELINE	8
2.3.3.5. MINERALNE TVARI	8
2.3.3.6. VITAMINI	8
2.3.3.7. FENOLNE KOMPONENTE	9
2.3.3.8. ENZIMI	10
2.3.3.9. HIDROKSIMETILFURFURAL	11
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA MEDA	12
2.4.1. DEFINICIJA I PODJELA ANTIOKSIDANASA	12
2.4.2. ANTIOKSIDANSI U MEDU	13
2.4.3. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA MEDA	14

3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.2. OPREMA	17
3.1.3. REAGENSI	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. PRIPREMA ANALOGA MEDA	19
3.2.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	19
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) METODOM.....	21
3.2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM ...	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Med se kao sladilo i prirodni konzervans koristio od davnina. Poznat pod nazivom „ljekovita hrana bogova“ dolazi iz činjenice da se koristio kao iscjeljujuće sredstvo u posljednjih 8000 godina, što potvrđuju brojna arheološka istraživanja.

Danas se koristi u narodnoj medicini, gdje mu se pripisuju antibakterijska, antivirusna, antikancerogena, antioksidacijska i mnoga druga ljekovita svojstva. S obzirom na raznolikost biljaka, tlo i klimu u kojoj rastu biljke, med ima specifična fizikalna, kemijska, senzorska svojstva.

Bogat je antioksidansima, posebice fenolima i flavonoidima. Za cjelokupni antioksidacijski kapacitet meda, osim fenola, zaslužne su brojne druge komponente: organske kiseline, aminokiseline, peptidi, enzimi, organskih kiseline, produkti Maillardovih reakcija, organske kiseline (Bertoncelj i sur., 2007.).

Cilj ovog rada biti će odrediti sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti bagremova meda iz sezone 2018., pomoću FRAP i DPPH metode. Dobivene rezultate usporedit će se s drugim sličnim istraživanjima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA MEDA

Prema Pravilniku o medu i Codex Alimentariusu, med se može definirati kao prirodno sladak proizvod što ga 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 i sokove, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja (Pravilnik, 2015; CXS 12, 2019).

Navedena definicija ukazuje da je med proizvod koji ima dvostruko porijeklo: biljno i životinjsko. Kao krajnji proizvod medonosnih pčela, med je smjesa različitih šećera, no sadrži i druge spojeve poput bjelančevina, aminokiselina, enzima, organskih kiselina, peludi i mineralnih tvari. Porijeklo vuče iz cvjetnog nektara ili medne rose, a nikako iz drugih šećernih proizvoda (Anonymous 1, 2019).

2.2. VRSTE MEDA

Postoji nekoliko podjela:

1) Prema nastanku / podrijetlu:

- NEKTARNI (cvjetni) - nastaje sakupljanjem nektara medonosnih biljaka, kojih je u Hrvatkoj zabilježeno više od stotine.
- MEDLJIKAVAC - nastaje od medljike ili medne rose lisnatih i štitastih biljnih uši. Karakterističan je po tamnijoj boji u odnosu na nektarni med, zbog većeg sadržaja mineralnih tvari. Prema podrijetlu se može podijeliti na crnogorični (bor, jela, smreka, pinija) i bjelogorični (lipa, bukva, hrast).
- MIJEŠANI - smjesa nektarnog (cvjetnog) i medljikovca.

2) Obzirom na ispašu pčela, odnosno cvjetove s kojih se skuplja nektar:

- UNIFLORNI - podrazumijeva med koji je nastao prikupljanjem nektara s većinskim udjelom jedne vrste medonosne biljke što se može potvrditi peludnom analizom koja pokazuje da pelud biljke treba sadržavati 20- 50% ukupne količine peludnih zrnaca meda, ovisno o vrsti meda.

- MULTIFLORNI - podrazumijeva med koji je nastao prikupljanjem nektara s više vrsta medonosnih biljaka i nema izraženiji postotak pojedinih peludnih zrnaca.

U Hrvatskoj je medljikovac podcijenjen med, s obzirom na to da u sebi ima više minerala, melecitoze i saharoze (melocitoza - složeni šećer koji je teško probavljiv).

3) Prema konzistenciji:

- KRISTALIZIRANI ili ČVRSTI med - svojstvo koje se javlja kada postotak vode pada na manje od 20% te prevladavaju glukozni šećeri (75%). Kristalizacija se razlikuje kod pojedinih vrsta medova i može se uočiti u vremenskom razdoblju od tjedan do godine dana nakon vrcanja.
- KREMASTI med - definira se kao 100%-tni prirodni med dobiven kontroliranom kristalizacijom tekućeg meda. Takva se konzistencija postiže miješanjem tijekom kojeg ostaju sačuvana sva prirodna svojstva, a postignuta konzistencija ostaje ista. (Zdravlje iz košnice: med i drugi pčelinji proizvodi, 2013).

4) Prema načinu proizvodnje:

- med u saću - med kojeg pčele skladište 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
- cijedeni 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, sa ili bez korištenja umjerene temperature koja ne smije prijeći 45 °C
- filtrirani med - med dobiven na način koji tijekom uklanjanja stranih anorganskih ili organskih tvari dovodi do značajnog uklanjanja peludi
- pekarski med – je med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom prerađuje i može:
 - imati strani okus ili miris,
 - biti u stanju vrenja ili prevrio, ili
 - biti pregrijan (Pravilnik, 2015).

2.2.1. BAGREMOV MED (*Robinia pseudoacacia*)

Čisti bagremov med, bez drugih primjesa, pokazuje vrlo svijetlu, gotovo bezbojnu boju. Ima slab intenzitet mirisa i može podsjećati na sok od bagrema. Ističe se po tome da je blag i ugodan nepcu.

Zreo se bagremov med prepoznaje po tome što je gust, a na niskoj temperaturi ima svojstvo ljepljivosti. Zbog većeg sadržaja fruktoze u odnosu na glukozu može i do godine dana ostati u tekućem stanju, bez da kristalizira. Bagremov med pripada skupini prvorazredne stolne vrste meda. Često se može susresti s primjesom drugih, najčešće voćnih vrsta medova. Zabilježeno je da može biti postupno proziran ako ga pčele odlažu u novo saće. Tada se naziva djevičanski ili „virgin“ med, odnosno med u djevičanskom saću. Konzumacijom se bagremovog meda opušta cijeli živčani sustav te se ublažavaju simptomi vrtoglavice, nesanice, depresije i stresa (Šimić, 1980).

2.3. SVOJSTVA I SASTAV MEDA

2.3.1. FIZIKALNA SVOJSTVA

2.3.1.1. KRISTALIZACIJA

Kristalizacija se kao učestala pojava prilikom skladištenja meda odvija na temperaturama od 10-15 °C. Kvaliteta i nutritivna svojstva meda ne narušavaju se njegovom kristalizacijom. Na istu utječe sastav meda (sadržaj šećera, voda, prisutnost kristalizacijskih jezgri), uvjeti i vrijeme skladištenja. Poznato je da bagremov med kristalizira vrlo sporo te može ostati u nekrystaliziranom stanju do 2 godine, dok med medljike ili uljane repice kristalizira u kratkom vremenskom razdoblju tijekom skladištenja, čak i u saću ili neposredno nakon postupka vrcanja. Na brzinu stvaranja kristala utječe sadržaj šećera, omjer različitih šećera te odnosa šećera i vode. Primjerice, ako određeni med sadrži veći udio fruktoze i vode, ili ako sadržaj glukoze ne prelazi 30% ukupnog udjela, kristalizacija izostaje. Kristalizirani se med vraća u prvobitno stanje postupkom zagrijavanja do 40 °C, što predstavlja graničnu temperaturu iznad koje se narušava nutritivni sastav meda, gubi se enzimatska aktivnost, hlapljive komponente i povećava se udio hidroksimetilfurfurala (Laktić i Šekulja, 2008).

2.3.1.2. VISKOZNOST

Med je viskozna tekućina čija viskoznost najviše ovisi o udjelu vode i temperaturi. Veći udjel vode i viša temperatura izaziva manju viskoznost. Fluidnost je većine medova dovoljno visoka za učinkovito manipuliranje tijekom obrade (Bogdanov, 2004).

2.3.1.3. HIGROSKOPNOST

Med se odlikuje velikom higroskopnošću i ima svojstvo da na sebe privlači vodu u vlažnim uvjetima. Prilikom navlačenja vode može doći do ubrzane fermentacije koja izaziva ubrzano kvarenje meda. Takvu karakteristiku meda treba uzeti u obzir tijekom skladištenja i manipuliranja u obradi (Bogdanov, 2004).

2.3.1.4. ELEKTRIČNA VODLJIVOST

Fizikalno svojstvo koje se sve više provodi u kontrolama kakvoće meda zbog svoje jednostavnosti i brzine provođenja. Nedavno je uključeno u nove međunarodne standarde Codex Alimentarius i Europske unije, kao zamjena za određivanje sadržaja pepela. Ono direktno ovisi o udjelu mineralnih tvari i kiselina u medu, koje ujedno predstavljaju elektrolite u postupku određivanja električne vodljivosti. Služi i kao kriterij za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca. Za većinu vrsta medova i njihovih mješavina smije iznositi najviše 0,8 mS/cm (Bogdanov, 2004; CSX 12, 2019).

2.3.1.5. INDEKS REFRAKCIJE

Indeks refrakcije ovisi o udjelu vode u medu. Bitno je da se mjeri pri temperaturi od 20 °C zato što se na nižoj ili višoj temperaturi od 20 °C koeficijent refrakcije mijenja i nije mjerodavan. Refraktometar mjeri na principu loma svjetlosti u trenutku prolaska kroz otopinu, stoga je bitno da je med u tekućem stanju (Bogdanov, 2004).

2.3.2. SENZORSKA SVOJSTVA MEDA

Boja, okus, miris i aroma ovise o podrijetlu, uvjetima prerade i načinu čuvanja meda.

Boja najviše ovisi o botaničkom podrijetlu i kreće se između dva ekstrema, zelenkasto bijele (bagremov med) do tamnosmeđe (kestenov med) boje. Sve se ostale nijanse kreću između, imaju isto svojstvo kristalizacije tijekom skladištenja, prilikom koje dolazi do posvjetljenja

meda. Postupkom dekristalizacije, med se vraća u prvobitnu nijansu. Određuje se kolorimetrijskim tehnikama.

Okus meda najviše proizlazi iz različitih omjera i vrsta šećera. Tako se okus mijenja od slatkog preko gorkog do kiselog, koji je pokazatelj fermentacije. Za slatkoću je meda odgovorna fruktoza koja je 2,5 puta slađa od glukoze i 1,5 od saharoze.

U različitim se medovima nalaze različiti omjeri fruktoze, glukoze i saharoze. Tvari sa više OH skupina, također mogu biti odgovorne za slatkoću meda.

Miris proizlazi iz različitih karbonilnih spojeva (aldehida / ketona), alkohola i estera. Prisutno je preko pedeset spojeva koji pridonose mirisu meda. Krajnji miris ovisi o botaničkom podrijetlu meda koji je ujedno parametar pri određivanju procjene kvalitete. Pošto se sastoji od hlapivih komponenti koje ishlape na temperaturama iznad 40 ° C, može predstavljati jedan od pokazatelja patvorenosti meda.

Aroma meda izvorno ovisi o omjeru glukoze i fruktoze, aldehida, diacetila, metilacetilkarbamata te hlapljivih i nehlapljivih kiselina. Kod uniflornih se medova primjećuje mirisna i okusna aroma karakteristična za pojedine biljke, dok kod multiflornih takva aroma nije poznata (Škenderov i Ivanov, 1986).

2.3.3. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med je kao prirodna slatka tvar mješavina različitih spojeva sastavljena od ugljikohidrata (70-80%) od kojih su glukoza (31%), fruktoza (38%) i voda (20%). Najvažnija su vrijednosti meda njegova antioksidacijska, antibakterijska, protuupalna i anti-tumorska svojstva, koja ponajviše ovise o flori iz koje je proizveden. Sadrži enzimske (katalaza, glukoza oksidaza i peroksidaza) i neenzimske antioksidacijske komponente: fenolni spojevi, askorbinska kiselina, α -46 tokoferol, karotenoidi, organske kiseline, aminokiseline, proteini i produkti Maillarovih reakcija (Casuelo i Vazquez, 2018).

Manje od 1% udjela tih tvari odgovorni su za senzorska i nutritivna svojstva meda (Singhal i sur, 1997.).

2.3.3.1. UGLJIKOHIDRATI

S udjelom do 80% čine med prezasićenom otopinom šećera imajući najveći utjecaj na njegova slatkoću, fizikalna svojstva (kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, ljepljivost, gustoća), kao i energetske vrijednosti (Barhate i sur., 2003).

U procjeni kvalitete i patvorenja meda ugljikohidrati se gledaju kao bitan parametar. Sadržaj se pojedinih šećera mijenja zrenjem i skladištenjem meda. Saharoza se kao jedan od parametara za otkrivanje patvorenosti pod utjecajem enzima invertaze razlaže na jednake djelove fruktoze i glukoze.

Prema prisutnoj količini saharoze u konačnom proizvodu, može se ustanoviti eventualno patvorenje (Riethop i sur., 1962).

Prema Pravilniku o medu, sadržaj saharoze u medu ne smije prijeći više od 5%, osim za med bagrema (*Robinia pseudoacacia*), lucerne (*Medicago sativa*), *Banksia menziesii*, slatkovine (*Hedysarum* spp.), eukaliptusa (*Eucalyptus camadulensis*), *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milliganii*, agruma (*Citrus* spp.) gdje količina saharoze ne prelazi 10%. Sukladno tome, med ne smije biti dobiven hranjenjem pčela šećerom i šećernim proizvodima, niti se miješati s medom dobivenim na taj način (Pravilnik, 2015).

2.3.3.2. VODA

Drugi najzastupljeniji element s udjelom od 15-23% je voda. Upravo zbog tolikog udjela, direktno utječe na fizikalna svojstva meda (kristalizaciju, viskoznost, specifičnu težinu, indeks refrakcije) i kakvoću meda. Tijekom čuvanja i skladištenja može doći do promjene udjela vode u medu, što utječe na stabilnost i otpornost, kao i mikrobiološko kvarenje meda (fermentacija-osmofilni kvasci koji razgrađuju glukozu i fruktozu na etanol i ugljikov dioksid) tijekom čuvanja (Bogdanov i sur., 1999.).

Čimbenici koji mogu utjecati na udio vode u konačnici osim skladištenja i procesiranja su podrijetlo i sastav nektara, klimatski uvjeti, pčele i snaga pčelinje zajednice, relativna vlažnost i temperatura unutar košnice (Flanjak, 2012).

2.3.3.3. PROTEINI I AMINOKISELINE

Proteini i aminokiseline nalaze se u obliku koloida ili obliku prave otopine aminokiselina, a mogu biti životinjskog (od pčela-žlijezda slinovnica) i biljnog (iz peludi) podrijetla.

Udjel proteina može se kretati od 0-1,7% s tim da medljikovac sadrži više proteina od nektarnog meda (Uršulin-Trstenjak, 2010).

Analiza se slobodnih aminokiselina u medu koristi kao parametar određivanja botaničkog i zemljopisnog podrijetla. Uz ukupno 26 esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina, kao indikator patvorenja i zrelosti meda uzima se aminokiselina prolin. Također, sastav i količina pojedinih aminokiselina može koristiti kao marker u određivanju botaničkog podrijetla. Tako se primjerice kestenov med karakterizira po aminokiselini argininu, dok bagremov po fenilalaninu (Flanjak, 2012).

2.3.3.4. ORGANSKE KISELINE

Osim svojih antibakterijskih svojstava, organske kiseline pridonose ugodnoj aromi i specifičnom okusu meda. Od velikog broja organskih kiselina (mravlja, octena, maslačna, vinska, limunska, jabučna, mliječna, benzojeva, jantarna) najzastupljenija je glukonska kiselina koja je produkt djelovanja glukoza enzima oksidaze na glukozu. Ovisno o podrijetlu meda, mijenja se pH vrijednost (za nektarni med se kreće od 3.3-4.6, dok za medljikovac i med kestena između 4.5-6.5). Općenito, tamnije vrste medova imaju veću kiselost od svjetlijih (Flanjak, 2012).

2.3.3.5. MINERALNE TVARI

Svojom malom prisutnošću (0,02-1,03%) doprinose nutritivnoj vrijednosti meda. Najzastupljeniji mineral u medu je kalij, a u manjim količinama nalazimo olovo, krom, kadmij, nikal, kositar i litij. Svakako, minerali se mogu koristiti kao parametri i pokazatelji botaničkog i zemljopisnog porijekla, jer dolaze od same biljke s koje pčela skuplja nektar. Njihova količina ovisi o sastavu tla na kojem je biljka rasla u određenim klimatskim uvjetima. Jedan od parametara prilikom razlikovanja nektarnog meda od medljikovca je električna provodnost meda koja je linearno povezana sa sastavom i udjelom mineralnih tvari u medu (Flanjak, 2012., Bogdanov i sur., 2007).

2.3.3.6. VITAMINI

Med sadrži male količine vitamina, no najviše vitamine B skupine koji uglavnom dolaze od zrnaca peludi. U tu skupinu se ubrajaju: tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinska kiselina (B3), pantotenska kiselina (B5), piridoksin (B6), biotin (B8 ili H), folna kiselina (B9) i vitamin K.

Zbog niskog pH meda, može se pronaći i vitamin C, prisutan u skoro svim vrstama meda, bitan zbog svoje antioksidacijske aktivnosti. Zabilježeno je da se postupkom filtracije može smanjiti udio vitamina u medu (Missio da Silva i sur., 2016).

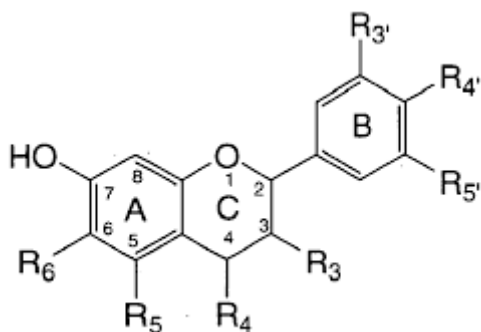
2.3.3.7. FENOLNE KOMPONENTE

Fenolni se spojevi mogu podjeliti u nekoliko skupina: jednostavni fenoli, fenolne kiseline, fenilpropanoidi i flavonoidi. Glavna im je razlika po broju ugljikovih atoma spojenih u fenolni kostur (Michalak, 2006.). Uglavnom dolaze iz cvijetnog nektara, propolisa (i/ili voska) i u manjoj mjeri pelud (Flanjak, 2012., Anklam, 1998).

Osobito su bitni jer imaju sposobnost hvatati slobodne radikale u tijelu, inhibirajuće i stimulirajuće djelovati na specifične enzime, hormone. Tako očituju svoja antibakterijska, antialergijska, antitumorigena i protuupalna svojstva (Kumar i Pandey, 2013).

U medu se od fenolnih komponenata nalaze: flavonoid aglikoni, benzojeva kiselina i njeni esteri te cimetna kiselina i njeni esteri.

Kao što je prikazano na slici, flavonoid sačinjavaju dva aromatska prstena povezana mostom od tri ugljikova atoma.



Slika 1: Osnovna kemijska struktura flavonoida (Pietta, 2000).

Uzevši u obzir modifikacije ugljikova prstena, flavonoidi se dijele u šest podskupina: flavononi, flavoni, flavonoli, izoflavonoidi, antocijani, flavani.

Glavne skupine flavonoida u medu su: *flavononi*, *flavonoli* i *flavoni*

Neki flavonoidi služe pri identifikaciji botaničkog porijekla, dok je primjerice zanimljivost da lavandin i bagremov med u svom flavonoidnom profilu nemaju određeni flavonoid po kojem bi bili specifični i zato se ne koriste kod identifikacije botaničkog porijekla (Ferrerres i sur. 1994;1998., Flanjak, 2012). Najčešći flavonoidi koji se nalaze u medu su: pinocembrin,

kvercetin, krizin, galangin, luteolin, hesperitin. Ovisi o botaničkom podrijetlu i primjenjuju se kao markeri pri identifikaciji i razlikovanju različitih medova (Turkmen i sur., 2006).

Druge bitne komponente u medu koje se izoliraju zajedno s flavonoidima jesu fenolne kiseline koje su specifične za pojedine vrste meda. Neke od njih su: kava kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, galna, elaginska i sinapinska kiselina (Flanjak, 2012).

2.3.3.8. ENZIMI

Prisutne male količine enzima u medu mogu potjecati od same biljke, dodatkom pčele dok pretvara nektar u med, kao i od kvasaca/bakterija, ako su prisutni u medu. Njihova je uloga osim što ubrzavaju kemijske procese u živom organizmu i biološkom materijalu, služe i kao parametar pri određivanju kakvoće meda. Enzimi se promatraju iz tehnološkog aspekta, obzirom da su osjetljivi na svjetlost, toplinu i druge oblike energije.

Najzastupljeniji enzimi u medu su: *dijastaza* (α -amilaza i β -amilaza), *invertaza* (α -glukozidaza), *glukoza oksidaza*, *katalaza*, *kisela fosfataza* itd. (White, 2000).

DIJASTAZA (α i β amilaza): Izvor je dijastaze pčela. Katalizira uglavnom kao α -amilaza i razlaže škrob na dekstrine. Aktivnost dijastaze ovisi o vrsti meda i višestruko je veća kod tamnijih vrsta medova (medljikavac, kesten). Dobar je pokazatelj patvorenosti meda. Pri visokim pH dolazi do inaktivacije dijastaze (White, 2000).

INVERTAZA: Izvor je invertaze uglavnom pčela, no može biti prisutna i u samoj biljci. Uloga joj je da razgrađuje saharozu iz nektara u glukozu i fruktozu. Aktivnost joj ovisi o fiziološkom stanju pčela, snazi i zdravstvenom stanju pčelinjih zajednica, biljnom podrijetlu same biljke, klimatskim uvjetima, intenzitetu lučenja nektara i stupnju prerade (Bonvehi i sur., 2000).

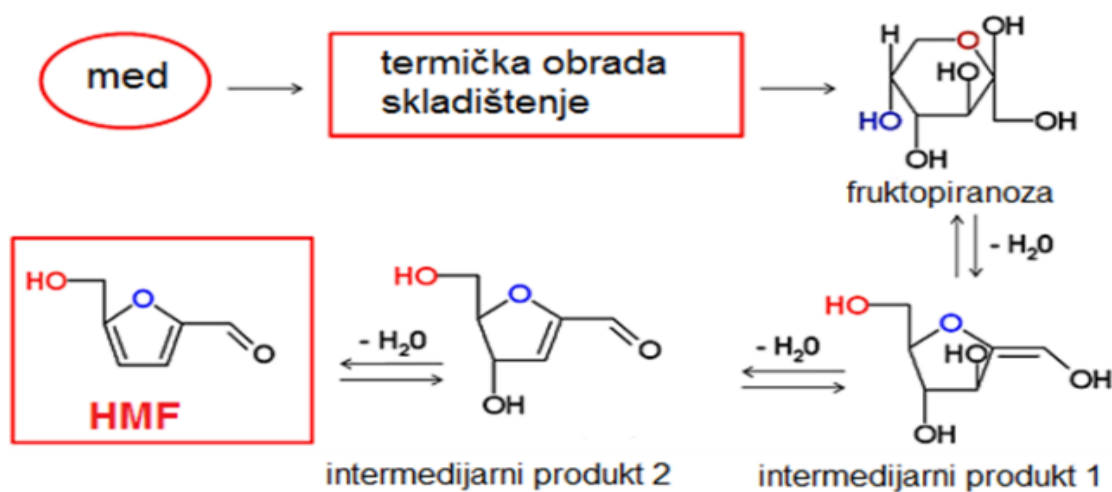
GLUKOZA OKSIDAZA: enzim koji pčele dodaju u med. Katalizira reakciju oksidacije glukoze u glukonsku kiselinu i vodikov peroksid. Tako utječe na mikrobiološku stabilnost meda. Aktivnost joj je niska u nerazrijeđenom medu (White i sur., 1963).

KATALAZA: Uglavnom dolazi od peludi. Razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik. Uvjetovana je omjerom glukoza oksidaze i katalaze i tako utječe na antibakterijski potencijal meda (Weston, 2000).

Proteaza hidrolizira protein i polipeptide na manje peptide, **Esteraza** hidrolizira estersku vezu, **Kisela fosfataza** hidrolizira estere fosforne kiseline.

2.3.3.9. HIDROKSIMETILFURFURAL

Razgradnjom heksoza (većinom fruktoze koja je termolabilnija od glukoze i saharoze) u kiselom mediju/Maillardovim reakcijama pri zagrijavanju ili skladištenju nastaje furan {5-(hidroksimetil)furan-2-karbaldehid} tj. hidroksimetilfurfural. Ovisi o profilu i udjelu ugljikohidrata u medu, aktivitetu vode (nizak pogoduje rastu), prisutnosti organskih kiselina, pH i udjelu vlage (Massio da Silva i sur., 2016).



Slika 2: Nastajanje HMF-a tijekom skladištenja i toplinske obrade (Anonymous 3, 2019).

Uz enzime diastaze i invertaze, HMF je jedan od glavnih parametara u određivanju kakvoće meda, može biti pokazatelj posljedice pregrijavanja i svježine meda (Tosi i sur, 2002).

Kao produkt Maillardovih reakcija dolazi rijede zbog niskih temperatura. Dozvoljeni udio HMF-a u hrvatskom medu iznosi 40 mg·kg⁻¹ i isti je kao udio kojeg propisuju Codex Alimentarius i Europska komisija. Dozvoljen udio u medu iz zemalja s tropskom klimom iznosi 80 mg·kg⁻¹. (Anonymous 2, 2019; Pravilnik 2015; CXS 12, 2019).

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA MEDA

2.4.1. DEFINICIJA I PODJELA ANTIOKSIDANASA

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali, zbog čega pokazuju iznimno veliku reaktivnost i nestabilnost.

Zbog tog svojstva, oduzimaju elektron drugim molekulama, što ima za posljedicu oksidaciju raznih biomolekula uključujući: proteine, lipide, lipoproteine i DNA. Na taj način uspostavljaju lančanu reakciju i mogu uzrokovati niz degenerativnih bolesti.

Drugi reaktivni oblici kisika, poput: hidroksilnog radikala ($\bullet\text{OH}$), peroksidnog radikal aniona ($\text{ROO}\bullet$), hiperoksidnog radikala (HO_2), vodikovog peroksida (H_2O_2) i drugih, uključeni su i doprinose starenju stanica, destabilizaciji membrana, oštećenju DNA i oksidaciji lipoproteina niske gustoće u organizmu. Na taj način izazivaju mutagenze, karcinogeneze, mogu biti uzročnici različitih bolesti poput: dijabetesa, gastrointestinalnih upalnih bolesti, ateroskleroze, bolesti srca i jetre (Halliwell, 1989).

U biološkom sustavu nastaju kao posljedica starenja organizma kao nusprodukti normalnog metabolizma, ali ih mogu uzrokovati izlaganje stresu kao i djelovanje vanjskih čimbenika, poput zračenja (Ammar i sur., 2009).

Zbog negativnih djelovanja slobodnih radikala, povećalo se zanimanje brojnih znanstvenika na području nutricionizma i medicine za izučavanjem djelovanja tvari koji sprječavaju slobodne radikale u biološkim sustavima i hrani.

Antioksidansi ili „hvatači slobodnih radikala“ su molekule koje imaju sposobnost neutraliziranja spojeva kisikove i dušikove vrste te na taj način sprječavaju ili odgađaju oksidaciju određenih supstrata. Učinkovitost im ovisi o doniranju vodika slobodnom radikalu.

Dijele se na dvije skupine:

- Primarni - pokazuju svojstvo da odgađaju ili sprječavaju inicijacijski ili propagacijski stupanj lipidne oksidacije -> *fenolne komponente*
- Preventivni - sprječavaju inicijacijsko djelovanje samog slobodnog radikala na način da: hvataju singlet kisik, inhibiraju peroksidativne enzime, keliraju s prijelaznim metalima-> *katalaza i peroksidaza, superoksid dimutaza*.

(Karadag i sur., 2009; Flanjak, 2012).

Antioksidansi koji su prisutni u 4 velike skupine i nalaze se u hrani i biološkim sustavima su:

- enzimi (katalaza, peroksidaza, superoksid dimutaza) koji pretvaraju reaktivne kisikove vrste u nereaktivne molekule kisika.
- hvatači slobodnih radikala (fenolne komponente, vitamin C, tokoferoli) doniraju vodikov atom peroksil radikalima i tvore neradikalne produkte koji sprječavaju lipidnu oksidaciju.
- kelatori prijelaznih metala (fosforna, limunska kiselina, fenolni spojevi, aminokiseline, feritin) kompleksi s metalnim ionima (Cu i Fe) koji mogu odgađati inicijalne reakcije katalizirane metalima i pokazuju sposobnost odgađanja razgradnje lipida.
- hvatači singlet kisika (karotenoidi, tokoferoli i mokraćna kiselina) koji pretvaraju singlet kisik u stabilniji triplet kisik zbog svoje konjugirane dvostruke veze u strukturi.

(Lee i sur., 2004; Prior i sur., 2005; Flanjak, 2012).

2.4.2. ANTIOKSIDANSI U MEDU

Postoji mnogo komponenata koje sudjeluju u antioksidacijskoj aktivnosti meda, no zbog složene kemijske strukture pojedinih komponenata još uvijek nije otkriven točan mehanizam djelovanja svih antioksidanasa u medu.

Pokazalo se da:

- *fenolne komponente: flavonoidi* (krizin, kvercetin, pinocembrin, pinobanksin, kempferol, galangin, luteolin, apigenin, miricetin, hesperitin)
- *fenolne kiseline* (kumarinska, kafeinska, ferulinska, klorogena, elagična)
- *enzimi* (katalaza, glukoza-oksidaza),
- *peptidi*
- *aminokiseline*
- *organske kiseline*
- *produkti Maillardovih reakcija*
- *derivati karotenoida*

jesu komponente koje pridonose antioksidacijskom djelovanju meda (Flanjak 2012; Bertonecelj i sur., 2007).

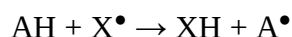
Prema (Beretta i sur., 2005) i (Bertonecelj i sur., 2007) dokazano je da botaničko i geografsko podrijetlo meda uvelike utječe na antioksidacijski kapacitet meda.

Isto tako, antioksidacijski kapacitet meda je rezultat prisutnosti fenolnih komponenata kao bitne sastavnice meda. Uočeno je da tamnije vrste meda sadrže više fenolnih komponenata, što ima za posljedicu veći antioksidativni kapacitet. Na sastav i antioksidacijska svojstva meda mogu utjecati uvjeti čuvanja, način skladištenja i obrada meda, ali znatno manje od njegovog botaničkog podrijetla.

2.4.3. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA MEDA

Zbog složenog sastava meda, potrebni su različiti standardi i protokoli pri određivanju antioksidacijske aktivnosti. Metode se baziraju na tome da antioksidansi imaju sposobnost deaktivacije slobodnih radikala sa prijenosom elektrona (*Single Electron Transfer*) SET i prijenosom vodikovog atoma (*Hydrogen Atom Transfer*) HAT mehanizmom.

- **HAT (*Hydrogen Atom Transfer*)** – prijenos vodikovog atoma
- Brze reakcije gdje se reaktivnost temelji na kompeticijskoj kinetici zabilježenoj pomoću kalibracijske krivulje. U mehanizmu sudjeluju generator slobodnih radikala koji oksidira probnu tvar za praćenje procesa i antioksidant koji se natječe sa probnom tvari za slobodne radikale.



- Najčešće analitičke metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti koje se zasnivaju na HAT mehanizmu su:

ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

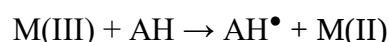
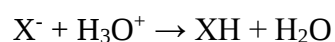
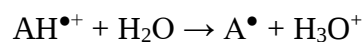
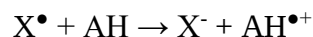
TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parametar*)

CBA (*Crocin bleaching antioxidant assay*)

U biološkom sustavu i u hrani pojava lipidne oksidacije je izrazito štetna pojava, a temelji se na doniranju vodikovih atoma pri čemu nastaje peroksil radikal koji izaziva lipidnu oksidaciju. Zato su različiti antioksidansi bitni u očuvanju membrana stanice i u lipidnoj oksidaciji, gdje se posebice ističe vitamin E.

- **SET (*Single Electron Transfer*)** – prijenos jednog elektrona

Temelji se na deprotonizaciji i ionizacijskom potencijalu reaktivnih funkcionalnih skupina, mjerenju sposobnosti antioksidansa da donira elektrone i reducira različite spojeve.



- U reakciji sudjeluju antioksidans i probna tvar koja ima ulogu oksidansa primajući elektrone od antioksidansa. Kao posljedica se uočava promjena boje probne tvari, koja je proporcionalna koncentraciji antioksidansa. Dobivena redukcijska sposobnost antioksidansa prikazuje se kao jednadžba pravca gdje se isčitavaju promjene absorbancije i koncentracije antioksidansa na kojem se promatra nagib pravca.
- Metode koje se baziraju na određivanju antioksidacijske aktivnosti meda su :

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

DPPH (*2,2 difenil-pikril-hidrazil*)

TEAC (*Trolax Equivalent Antioxidant Capacity*)

Oba se navedena mehanizma događaju skoro paralelno, no o tome koji će se odviti ovisi o otapalu, strukturi i svojstvima antioksidansa, topljivosti i koeficijentu razdjeljenja (Huang i sur., 2005; Prior i sur., 2005; Flanjak, 2012).

Kod navedenih se istraživanja često mogu dobiti rezultati koji se ne mogu dobro usporediti, a tome može biti uzrok: sama analitička metoda mjerenja kao priroda supstrata za oksidaciju, fizička struktura testnog sustava, vrsta početne oksidacije i prisutnost interferirajućih komponenti (Flanjak, 2012).

Još neke od metoda za detekciju antioksidacijskih aktivnosti su *kvantifikacija i moguća identifikacija fenolnih komponenti*: kvantifikacija Folin-Ciocalteu ili Folin-Denis metodom pomoću UV spektrofotometrije, elektrokemijska detekcija za pojedinačne fenole.

Također postoji mogućnost detekcije antioksidacijske aktivnosti s tankoslojnom kromatografijom, papirnom kromatografijom, plinskom kromatografijom, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola te 1,2-difenola (Naczki i Shahidi, 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. UZORCI

Analiziran je 41 uzorak meda od bagrema (*Robinia pseudoacacia*) s područja Hrvatske i Bosne i Hercegovine iz sezone 2018. Po jedan uzorak dolazi s područja Bosne i Hercegovine, Primorsko-goranske županije, Karlovačke, Vukovarsko-srijemske, Požeško-slavonske, Virovitice, Bjelovarsko-bilogorske, dva s područja Sisačko-moslavačke i Međimurske županije, tri s područja Krapinsko-zagorske i Varaždinske, pet iz Osječko-baranjske te ostatak s područja grada Zagreba i okolice.

U uzorcima bagremovog meda (*Robinia pseudoacacia*) je određen udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost. Ukupni fenoli su se određivali Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost pomoću FRAP i DPPH metode.

Rezultati analiza predstavljaju vrijednosti tri paralelna mjerenja za svaki uzorak.

3.1.2. OPREMA

Spektrofotometar

Električna mješalica

Analitička vaga

pH metar

Vodena kupelj

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

3.1.3. REAGENSI

TPTZ (2,4,6- Tri[pyridyl]-s-triazine)

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 μM 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, Fruktaza, Maltoza, Saharoza

Galna kiselina

Folin-Ciocalteu's phenol reagents

3.2. METODE RADA

3.2.1. PRIPREMA ANALOGA MEDA

PRINCIP:

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

3.2.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

PRINCIP:

Sadržaj je ukupnih fenola određen spektrofotometrijski u otopini meda. Folin-Ciocateu reagens je smjesa fosfotungstične i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih sastojaka ove kiseline se reduciraju u tungstični oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet plavog obojenja pri valnoj duljini 750 nm (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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tako što se otpipetira 300 μL 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 apsorbanacija na spektrofotometru pri 750nm. Svaki uzorak standardne otopine se analizira u tri ponavljanja, na temelju izmjerenih apsorbanacija, 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 μL otopine meda i doda 3 mL Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se miješa na električnoj mješalici 2 minute te se nakon 20 minuta očita apsorbancija pri 750 nm u odnosu na analog šećera, odnosno slijepu probu.

RACUN:

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

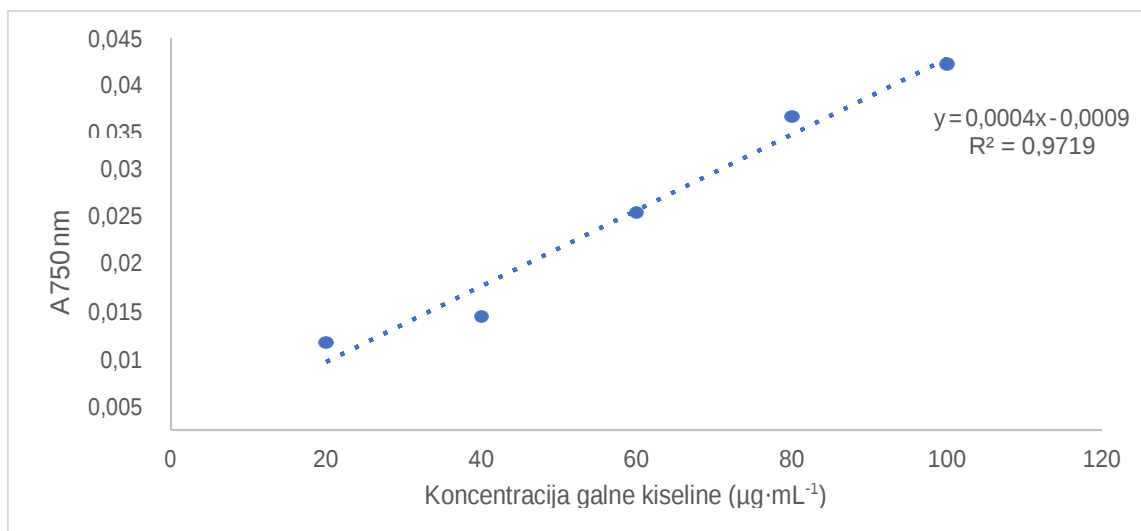
U ovom slučaju, dobivena jednadžba pravca glasi: $y = 0,0004x + 0,0009$

gdje je:

y – apsorbancija pri 750 nm

x – koncentracija galne kiseline ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

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



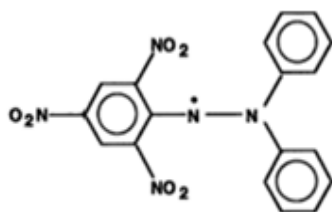
Slika 3: Baždarni dijagram galne kiseline za određivanje ukupnih fenola

3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) METODOM

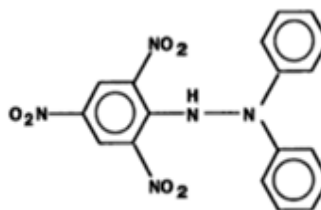
PRINCIP:

„DPPH radikal ima sposobnost delokalizacije nesparenog elektrona preko cijele molekule, tako da molekule DPPH radikala ne stvaraju dimere, kao što je to slučaj kod većine radikala. Delokalizacija elektrona kroz molekulu DPPH odgovorna je za tamno ljubičastu boju.“ (Flanjak, 2012).

Nespareni elektron DPPH radikala postiže apsorbancijski maksimum pri 517 nm i ljubičaste je boje. Promjena je ljubičaste boje u žutu posljedica 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; Bertancelj i sur., 2007).



difenilpikrilhidrazil (ljubičaste boje)



difenilpikrilhidrazin (žute boje)

Slika 4. Strukturna formula DPPH radikala i reduciranog oblika DPPH₂ (Molyneux, 2004; Flanjak, 2012)

POSTUPAK:

Pripremi se početna otopina meda tako što se izvaže 15 g uzorka meda, kvantitativno se prenese u odmjernu 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⁻¹.

Tablica 1: Priprema 11 otopina meda (koncentracija $1\text{-}20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Oznaka	V otopine meda (mL)	Vvode (mL)	Cmeda ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	0,1	1,9	3
2	0,2	1,8	6
3	0,4	1,6	12
4	0,6	1,4	18
5	0,8	1,2	24
6	1,0	1,0	30
7	0,2	0,8	36
8	0,4	0,6	42
9	0,6	0,4	48
10	0,8	0,2	54
11	2,0	0,0	60

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 1L otopina različitih koncentracija analoga.

Određivanje:

U svaku epruvetu s otopinom meda i epruvetu kontrolnog uzorka se otpipetira 1,9 DPPH reagensa te 0,8 mL acetatnog pufera. Usporedno se naprave slijepe probe za čiju se pripremu koriste sve otopine osim DPPH reagensa kako bi se eliminirao utjecaj boje meda. Tako pripremljene otopine se miješaju 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 se rezultata napravi graf ovisnosti preostalog DPPH o koncentraciji meda. Rezultat se izražava kao IC₅₀, odnosno kao koncentracija meda (antioksidansa) koja uzrokuje inhibiciju 50% DPPH radikala. IC₅₀ se računa iz jednadžbe pravca za svaki pojedinačni uzorak.

Preostali se DPPH računa iz sljedeće jednadžbe :

$$[1] \text{ DPPH (\%)} = (A_{\text{UZ}} - A_{\text{SP}} / A_{\text{K}}) \times 100$$

A_{UZ} apsorbancija uzorka meda

A_K apsorbancija kontrolnog uzorka

A_{SP} apsorbancija slijepe probe

3.2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

PRINCIP

Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksa u feri 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; Bertoncelj 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 μL 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 vazi 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 željezovog 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 μL 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 apsorbanca pri 593 nm u odnosu na slijepu probu.

IZRAČUN:

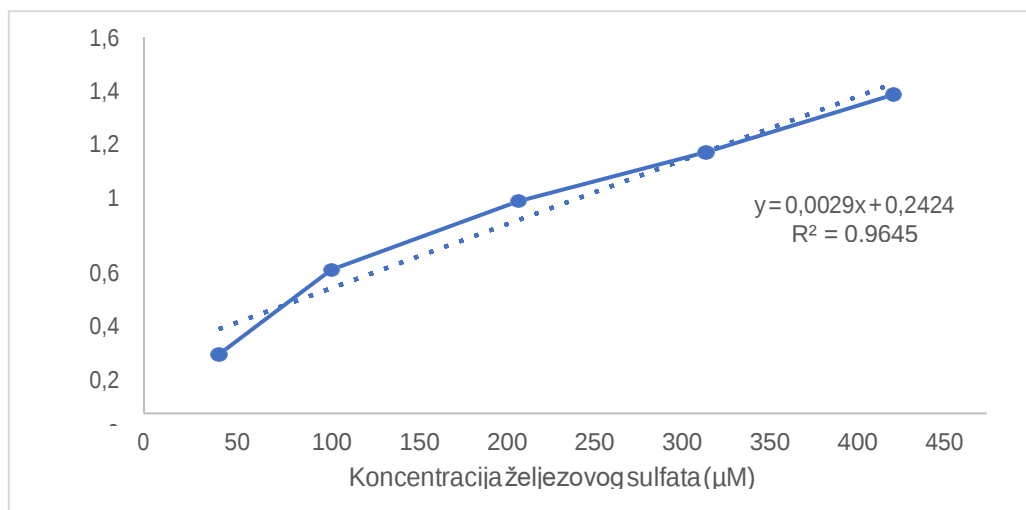
Nacrta se baždarni dijagram uporabom računala te se pomoću njega dobije jednačba pravca prema kojoj se izračuna FRAP vrijednost ($\mu\text{M Fe (II)}$) 10 %-tne otopine meda.

U ovom slučaju dobivena jednačba pravca glasi: $y = 0,0029x + 0,2424$

gdje je:

y – apsorbanca pri 593 nm

x – koncentracija željezovog sulfata (μM)



Slika 5: Baždarni dijagram željezovog sulfata za FRAP metodu

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 2: Udio ukupnih fenola u uzorcima bagremova meda

Uzorak	Prosječna apsorbancija A 750 nm	Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola mg GAE·kg ⁻¹ meda
002	0,019	49,75
004	0,013	34,75
011	0,023	58,91
025	0,028	73,08
034	0,023	58,91
036	0,038	97,25
043	0,018	47,25
045	0,026	66,41
046	0,028	73,08
050	0,017	46,42
055	0,034	87,25
056	0,046	117,25
060	0,03	87,25
062	0,037	93,92
063	0,038	97,25
064	0,048	122,25
066	0,033	84,75
071	0,021	54,75
074	0,040	102,25
086	0,045	114,75
093	0,036	92,25

Tablica 2: Udio ukupnih fenola u uzorcima bagremova meda-nastavak

Uzorak	A 750 nm	Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola GAE·kg ⁻¹ meda
101	0,049	124,75
103	0,034	87,25
109	0,045	114,75
110	0,024	62,25
113	0,047	119,75
119	0,036	92,25
128	0,035	91,42
129	0,030	77,25
132	0,045	114,75
134	0,031	79,75
138	0,060	152,25
139	0,025	64,75
144	0,029	74,75
146	0,028	72,25
150	0,028	72,25
151	0,041	104,75
152	0,041	104,75
153	0,037	94,75
154	0,062	157,25
164	0,039	99,75

Ukupni su fenoli određeni modificiranom Folin – Ciocalteu metodom i prikazani su u tablici 2. Za svaki su uzorak prosjek tri mjerenja izražena kao ekvivalent galne kiseline – miligram galne kiseline po kilogramu meda. Prema dobivenim je rezultatima uočljiva varijacija između

uzoraka. Najniži rezultat iznosi $34,75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ u uzorku 004, a najviši $157,25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ u uzorku 154. Prosječna srednja vrijednost svih dobivenih rezultata iznosi $88,33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Usporedbom sa slovenskim istraživanjima Berrette i suradnika iz 2005. godine, čija prosječna vrijednost sadržaja fenola iznosi $55,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ili Bertoncelj i suradnika iz 2007. godine na slovenskom bagremovom medu, gdje najniža vrijednost iznosi $25,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do najviše $67,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (prosjek: $44,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), primjećuje se da bagremovi medovi s hrvatskog područja imaju nešto viši udio ukupnih fenola u odnosu na slovenske. Također, usporedbom s rezultatima Krpan i suradnika iz 2009. godine, koji se kreću u rasponu od $31,72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do $80,11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, vidljivo je da se rezultati ovog istraživanja poklapaju s rezultatima bagremova meda s područja Hrvatske.

U istraživanju Ghendolfa i suradnika, sadržaj ukupnih fenola iznosi $4,6 \text{ mg}/100\text{g}$ meda, što pokazuje znatno niži sadržaj ukupnih fenola u odnosu na ovo istraživanje. Prema najnovijem istraživanju (Gül i Pehlivan, 2018) bagremova meda iz Turske, čiji rezultati prosječne vrijednosti ukupnih fenola iznose $51,91 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, uočava se da su dobiveni rezultati u skladu s dobivenim vrijednostima ukupnih fenola u ispitanim uzorcima s područja grada Zagreba i okolice, Primorsko-goranske županije i Međimurske županije.

Kada se uspoređuju dvije vrste meda, uniflorni s multiflornima, primjećuje se značajna razlika u antioksidacijskom profilu. U provedenom istraživanju Flanjak iz 2012. godine, koje obuhvaća uzorke s hrvatskog područja, udio se ukupnih fenola značajno razlikovao ovisno o vrsti meda. Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola meda kestena iznosi $162,1 \pm 21,6 \text{ GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ meda, med kadulje $96,5 \pm 13,6 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ meda, med od bagrema $39,1 \pm 6,8 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ meda, med od medljikovca $318,6 \pm 132,6 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ meda. Istraživanjem iz Bangladeša, gdje se analiziralo pet multiflornih i tri uniflorna meda, dokazano je da su koncentracija i vrsta polifenolnih tvari u medu varijabilne i ovise o cvjetnom podrijetlu meda. Sadržaj se ukupnih fenola kretao od $152,4$ - $688,5 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ meda, s prosjekom od $444 \text{ mg GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ meda. Zaključuju se veća antioksidacijska svojstva u odnosu na med iz Italije ($55,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ili Hrvatske ($31,72 - 80,11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) (BMC, 2013). Kod Malezijskog istraživanja, vidljiva je razlika u ukupnom sadržaju fenola monoflornog u odnosu na multiflorni [bagremov med ($186,70 \pm 0,84$), ananas ($226,29 \pm 1,18$), borneo ($206,33 \pm 1,05$)] (BMC, 2013.). Usporedbom se dobivenih rezultata ovog istraživanja sa rezultatima drugih istraživanja, razlika antioksidacijske aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola pripisuje prvenstveno razlici između botaničkog i geografskog podrijetla meda. Isto tako se utjecaj obrade i skladištenja može uzeti kao uzrok ne podudaranja rezultata, no ne u tolikoj mjeri.

Tablica 3: Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u uzorcima bagremova meda

Uzorak	Masa uzorka(g)	Jednadžba pravca za određivanje IC50	Koeficijent korelacije	IC50 mg·mL ⁻¹
002	15,0873	$Y = -1,0778x + 84,434$	0,9831	31,9484
004	14,9550	$y = -0,998x + 102,74$	0,9998	52,8456
011	14,9854	$Y = -0,8608x + 99,385$	0,9408	57,3710
025	15,0848	$Y = -0,3838x + 98,706$	0,9999	126,9046
034	14,8603	$Y = -0,3882x + 103,35$	0,8791	137,4291
036	15,0566	$Y = -1,1038x + 102,39$	0,9934	47,4633
043	15,0880	$Y = -0,6691x + 107,56$	0,9502	86,0261
045	15,1856	$Y = -0,4329x + 105,89$	0,9622	129,1060
046	15,0500	$Y = -0,7419x + 109,11$	0,8578	79,6738
050	15,1140	$Y = -0,7375x + 65,623$	0,9881	21,1837
055	15,0158	$Y = -0,3562X + 71,471$	0,8495	60,2779
056	14,9213	$Y = -0,805x + 92,582$	0,9641	52,8968
060	15,0669	$Y = -0,3792x + 75,136$	0,8764	66,2869
062	14,9155	$Y = -0,7257x + 81,041$	0,9073	42,7738
063	14,9448	$Y = -1,04x + 76,261$	0,9956	25,2509
064	15,0021	$Y = -1,0747x + 89,462$	0,9969	36,7190
066	14,9578	$Y = -0,6931x + 104,66$	0,9524	78,8630
071	14,9758	$Y = -0,5827x + 79,915$	0,9519	51,3385
074	15,0903	$Y = -0,7079x + 84,276$	0,9959	48,4190
086	15,0543	$Y = -0,7102x + 87,532$	0,9510	52,8470
093	14,9538	$Y = -0,5242x + 100,21$	0,8835	95,7840
101	14,9954	$Y = -0,5583x + 98,413$	0,9037	86,7150

Tablica 3: Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u uzorcima bagremova meda-nastavak

Uzorak	Masa uzorka(g)	Jednadžba pravca za određivanje IC50	Koeficijent korelacije	IC50 mg·mL ⁻¹
103	14,9984	$Y = -0,5302x + 93,466$	0,9992	81,9803
109	14,9491	$Y = -0,5303x + 93,549$	0,9986	82,1214
110	15,0463	$Y = -1,2249x + 104,74$	0,8463	44,6893
113	14,8526	$Y = -0,8409x + 107,01$	0,9662	67,7964
119	14,9609	$Y = -0,5551x + 68,512$	0,9869	33,3489
128	15,0173	$Y = -0,3821x + 67,135$	0,9899	44,8442
129	14,9366	$Y = -0,4744x + 65,327$	0,8942	32,3081
132	14,9021	$Y = -0,4713x + 65,099$	0,8794	32,0369
134	15,0968	$Y = -0,3867x + 69,768$	0,8059	51,1197
138	14,8508	$Y = -0,5566x + 68,662$	0,9881	33,5285
139	15,0084	$Y = -0,7022x + 72,965$	0,9120	32,7043
144	15,0101	$Y = -0,6401x + 71,832$	0,9256	34,1071
146	15,0810	$Y = -0,6117x + 86,158$	0,9413	59,1106
150	14,8836	$Y = -0,5385x + 88,408$	0,9750	71,3240
151	14,9113	$Y = -0,7502x + 83,715$	0,9590	44,9413
152	15,0153	$Y = -0,4782x + 86,038$	0,9555	75,3617
153	15,1010	$Y = -0,6285x + 94,162$	0,9671	70,2657
154	14,8434	$Y = -0,5295x + 92,143$	0,9693	79,5901
164	14,8952	$Y = -0,5284x + 91,982$	0,9592	79,4511

Za određivanje sposobnosti „hvatanja“ slobodnih radikala, odnosno određivanje antioksidacijske aktivnosti, korištena je DPPH metoda. Izražava se kao IC50, što predstavlja količinu antioksidanasa u medu koji smanjuju koncentraciju DPPH za 50%. Dodatkom se antioksidanasa smanjuje apsorbanacija, tj. IC50.

Dobiveni su rezultati prikazani u tablici 3., u kojoj se može vidjeti da najniža vrijednost IC₅₀ iznosi 21,18 mg·mL⁻¹ u uzorku 050, najviša vrijednost 137,43 mg·mL⁻¹ u uzorku 034, srednja vrijednost 61,43 mg·mL⁻¹. Ako bi se usporedila dobivena srednja vrijednost ovog istraživanja s rezultatima i srednjim vrijednostima (Bertoncelj i sur., 2007) gdje se vrijednosti kreću između 33,9 mg·mL⁻¹ i 63,9 mg·mL⁻¹ (prosjeak: 53,8 mg·kg⁻¹) i rezultatima (Berette i sur., 2005) čije se vrijednosti kreću između 45,45 kao srednje vrijednosti, uočava se da navedeni rezultati pokazuju nešto višu aktivnost.

Slične vrijednosti antioksidacijske aktivnosti bagremova meda određene ovom metodom, zabilježene su u istraživanju Güla i Pehlivana, gdje se prosječna vrijednost rezultata kreće oko 12,72 mg·mL⁻¹, što nije u skladu s dobivenim vrijednostima ovog istraživanja. Gotovo potpuno poklapanje dobivenih rezultata s rezultatima Krpan i suradnika, koji su dobili vrijednosti IC₅₀ 61,28 mg·mL⁻¹ - 253, 47 mg·mL⁻¹, može se zaključiti da se analiza antioksidacijske aktivnosti meda može koristiti kao jedan od parametara identifikacije geografskog i botaničkog porijekla meda. (Gül i Pehlivan, 2018; Krpan i sur., 2009).

Primjenom DPPH metode ispitivanih vrsta, najniži antioksidacijski kapacitet zabilježen je kod meda od bagrema (73,50 – 201,36 mg·mL⁻¹), dok su tamne vrste poput kestena (11,34 – 21,36 mg·mL⁻¹) i medljikovca (3,46 – 14,14 mg·mL⁻¹) imale najviši kapacitet.

Kod multiflornih se medova primjećuje da širok raspon antioksidacijske aktivnosti dolazi od biološke raznolikosti regije i klimatskih uvjeta u kojima pčele stvaraju med (Ruiz-Navaja i sur., 2011). Tako se DPPH metodom kod istraživanja iz Bangladeša rezultati IC 50 kreću od 33,6 mg·mL⁻¹ – 97,5 mg·mL⁻¹, od kojih četiri uzorka pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost, multiflorni su i tamnije su boje. Također, veće DPPH vrijednosti u odnosu na dobivene rezultate monoflornog meda od bagrema, pokazuju prosječne vrijednosti multiflornih medova iz Alžira (44,55 mg·mL⁻¹) i Indije (57, 5 mg·mL⁻¹) (BMC, 2012).

Tablica 4: Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u uzorcima bagremovog meda

Uzorak	A 593 nm	Prosječna FRAP vrijednost ($\mu\text{M Fe (II)}$)
002	0,568	112,2758
004	0,599	119,5172
011	0,683	152,0459
025	0,856	211,5862
034	0,768	181,2413
036	0,906	228,8275
043	0,712	161,9310
045	0,679	150,5517
046	0,782	186,0689
050	0,893	224,3448
055	0,610	126,7586
056	0,879	219,5172
060	0,760	178,7126
062	0,577	115,4942
063	0,521	96,2988
064	1,011	265,1493
066	0,788	188,1379
071	0,901	227,2183
073	0,803	192,8505
086	1,021	268,3677
093	0,738	186,4137
101	0,985	255,8390

Tablica 4: Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u uzorcima bagremovog meda-nastavak

Uzorak	A 593 nm	Prosječna FRAP vrijednost($\mu\text{M Fe (II)}$)
103	0,691	154,4579
109	0,798	191,7011
110	0,579	116,0689
113	0,974	252,1608
119	0,810	195,6092
128	0,568	112,1608
129	0,625	131,7011
132	0,800	192,1608
134	0,524	97,1034
138	0,750	175,0344
139	0,962	234,1379
144	0,794	190,4367
146	0,802	192,9655
150	1,085	290,4367
151	1,060	282,0459
152	0,851	209,8620
153	0,799	191,5861
154	1,112	300,0919
164	1,031	271,8160

Druga korištena metoda određivanje antioksidacijske aktivnosti u ovom istraživanju je FRAP metoda. Rezultati se izražavaju kao $\mu\text{M Fe(II)}$ 10 %-tne otopine meda. Rezultati su prikazani u tablici 4. Najviša FRAP vrijednost iznosi 300,0919 $\mu\text{M Fe(II)}$ u uzorku 154, a najniža je FRAP vrijednost zabilježena kod uzorka 063 i iznosi 96,2988 kao $\mu\text{M Fe(II)}$. Srednja vrijednost iznosi 186,45 $\mu\text{M Fe(II)}$.

Prema dostupnim literaturnim podacima usporedbom se može primjetiti da dobiveni rezultati imaju nešto više vrijednosti, to jest ispitivani medovi imaju veću antioksidacijsku aktivnost. U istraživanjima slovenskog i talijanskog bagremovog meda (Bertoncelj i sur., 2007.) FRAP vrijednost iznosi 71,0 kao $\mu\text{M Fe(II)}$, dok kod (Beretta i sur., 2015) s FRAP vrijednost iznosi 79,5 $\mu\text{M Fe(II)}$. U istraživanju (Krpan i sur., 2009) rezultati se kreću do maksimalne vrijednosti 142, 43 $\mu\text{M Fe(II)}$, koje se izvrsno poklapa s rezultatima ovog istraživanja što je i za očekivati budući da se radi o bagremovom medu s područja Hrvatske.

Zabilježene se FRAP vrijednosti iz Bangladeša kreću od 772,4 $\mu\text{M Fe(II)}$ kod multiflornog meda do 140,23 $\mu\text{M Fe(II)}$ kod uniflornog meda. Rezultati za slovensku jelu (478,5 $\mu\text{M Fe(II)}$) i šumski med (426, 4 $\mu\text{M Fe(II)}$) pokazuju znatno viša antioksidacijska svojstva u odnosu na dobivene rezultate meda od bagrema (BMC 2012). Nešto niže vrijednosti za multiflorni med bilježe Alvarez- Suarez s vrijednostima između 13,5 – 196,7 $\mu\text{M Fe(II)}$, kao i Beretta i sur., sa vrijednostima od 72,8 – 151,2 $\mu\text{M Fe(II)}$.

Također FRAP je metodom izmjeren najniži antioksidacijski kapacitet kod meda od bagrema (6,5 – 61,2 $\mu\text{M Fe(II)}$), a najviši kod medljikovca (286,0 – 1175,7 $\mu\text{M Fe(II)}$).

Tablica 5: Deskriptivna statistika podataka o udjelu ukupnih fenola

	FENOLI	DPPH	FRAP
Prosječna vrijednost	88,33 mg·kg ⁻¹	61,43 mg·mL ⁻¹	186,45 μM Fe(II)
Standardna devijacija	27,1057	52,8456	55,5670
Koeficijent varijacije	31%	86%	29%
Minimum	34,75 mg·kg ⁻¹	21,1873 mg·mL ⁻¹	96,2988 μM Fe(II)
Maksimum	157, 25 mg·kg ⁻¹	137,4291 mg·mL ⁻¹	300,0919 μM Fe(II)

Najveće razlike vidljive su u rezultatima antioksidacijske aktivnosti mjerene pomoću FRAP metode i DPPH metode. Velike razlike vidljive su i u antioksidacijskom kapacitetu meda kod različitih vrsta medova, multiflornih u odnosu na uniflorne, što bi mogao biti jedan od razlikovnih parametara u određivanju botaničkog i geografskog porijekla.

5. ZAKLJUČCI

Obzirom na prikazane rezultate i navedenu raspravu zaključuje se sljedeće:

1. Od ukupno 41-og uzorka bagremova meda, od kojih je jedan s područja Bosne i Hercegovine a ostatak s područja Hrvatske, udio ukupnih fenola kreće se od 34,75 do 157,25 mg·kg⁻¹ i sukladan je ranijim istraživanjima meda od bagrema na hrvatskom području. U odnosu na druga istraživanja, rezultati pokazuju nešto viši udio ukupnih fenola.
2. Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, dobiveni faktori IC₅₀ 21,1837 mg·mL⁻¹ do 137,4291 mg·mL⁻¹ pokazuju slične vrijednosti s istraživanjima na području Hrvatske, no nešto niže vrijednosti u odnosu na preostala istraživanja.
3. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom kreću se od 96,2988 μM Fe (II) do 300,0919 μM Fe(II). Pokazuju nešto niže vrijednosti u odnosu na ostala slična istraživanja.
4. Razlike u dobivenim vrijednostima između ukupnih fenola i FRAP metode, mogu se pripisati razlici u botaničkom i geografskom podrijetlu meda. Neki od faktora koji mogu utjecati na tu razliku su: metoda obrade, način skladištenja, tip tla i klima, sezona i čimbenici okoliša te genetski faktori.
5. Usporedbom uniflornog s multiflornim medom, velike se razlike antioksidacijskog kapaciteta mogu pripisati ponajviše razlikama u botaničkom i geografskom podrijetlu meda. Stoga bi određivanje antioksidacijske aktivnosti moglo poslužiti kao jedan od parametara pri identifikaciji i određivanju istih.

6. LITERATURA

Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damian, E., Astolfi, P., Bompadre, S., Battino, M. (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2490-2499.

Ammar, R.B., Bhourri, W., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Bouhlef, I., Kilani, S., Mariotte, A.M., Chekir – Ghedira, L., Dijoux – Franca, M.G., Ghedira, K. (2009) Antioxidant and free radical – scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure – activity relationship study. *Food Chem.* **116**, 258 – 264.

Anklam, E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **63**, 549-562.

Anonymous 1 (2019) Aktualna problematika karakterizacije meda na hrvatskom tržištu, <<https://www.bib.irb.hr/254856>>.

Anonymous 2 (2019) Osnovno o Hidroksimetilfurfural-u (HMF-u), < <http://pu-cvijet.hr/osnovno-o-hidroksimetilfurfural-u-hmf-u/> >.

Anonymous 3 (2019) Nastajanje HMF-a tijekom skladištenja i termičke obrade, < [Barhate, R. S., Subramanian, R., Nandini, K. E., Hebbar, H. U. \(2003\) Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. *J. Food Eng.* **60** \[online\], 49-54, < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877403000177>>.](https://www.google.com/search?q=Nastajanje+HMF-a+tijekom+skladi%C5%A1tenja+i+termi%C4%8Dke+obrade&safe=active&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi24ZWbkpvjAhUQxYsKHS3SCxsQ_AUIECgB&biw=1366&bih=625#imgsrc=> .</p></div><div data-bbox=)

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli M., Facino, R.M. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **533**, 185-191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010> .

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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060> .

BMC (2012) BMC Complementary and Alternative Medicine **12**,177. < <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-12-177>>.

BMC (2013) BMC Complementary and Alternative Medicine **13**.< <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/43> >.

Bogdanov , S., Rouff, K., Oddo, L.P. (2004) Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honey: a review *Apidologie*, **35**, 275-282. doi: 10.1051/apido:2004047 .

Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., Gallmann, P. (2007) Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *J.Apicul. Reser.* **46**, 269-275. doi: 10.1080/00218839.2007.11101407 .

Bogdanov, S., Lüllmnn, C., Martin, P. (1999) Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Commission. *Mitteil. aus LIMS und Hyg.* **90**, 108-125.

Bonvehí, J.S., Torrento, M.S., Raich, J.M.(2000) Invertase activity in fresh and processed honeys. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 507-512.

CXS 12-2019, STANDARD FOR HONEY, 1.3 Hydroxymethylfurfural Content

Consuelo, P. C. and Vázquez, M. (2018) Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origin. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 2523-2537. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05807> .

Ferreres, F., Giner, J.M., Tomás-Barberán, F.A. (1994) A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *J. Sci. Food Agric.* **65**, 371-372. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650316> .

Ferreres, F., Juan, T., Pérez-Arquillué, C., Herrera-Martech, A., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A. (1998) Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *J. Sci. Food Agri.* **77**, 506-510. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199808\)77:4%3C506::AID-JSFA71%3E3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199808)77:4%3C506::AID-JSFA71%3E3.0.CO;2-Y) .

Flanjak, I. (2012) Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja.

Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek

Ghendolf, N., Wang, X.-H., Engeseth, N.J. (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 5870-5877. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0256135> .

Gül, A., Pehlivan, T. (2018) *S. J. Bio. Sci.* **25**, 1056–1065. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.011> .

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals In Biology and Medicine*, 2. izd., Clarendon, Oxford, UK, str. 22-85.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856. doi: <https://doi.org/10.1021/jf030723c> .

Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009) Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food An. Met.* **2**, 41-60. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750> .

Kumar, S., Pandey, A.K., (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci.W.J.* **2013**, 1-16. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750> .

Krpan, M., Marković, D., Šarić, G., Skoko, B., Hruškar, M., Vahčić, N. (2009) Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey. *Cz. J. Food Sci.* **27**, S245-S247.

Laktić, Z., Šekulja, D. (2008) *Suvremeno pčelarstvo*, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidant nutraceuticals. *Co. Rev. Food Sci. Food Saf.* **3**, 21-32. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x> .

Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 523-530.

Missio da Silva, P., Cony, G., Valdemiro Gonzaga, L., Oliveira Costa, A.C., Fett, R.(2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity: A review. *Food Chem.* **196**, 309-323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051> .

Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Food Sci. Techn.* **26**, 211-219.

Naczka, M., Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromat.* **1054**, 95-111. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059> .

Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042. doi: <https://doi.org/10.1021/np9904509> .

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

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardised methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agri. and Food Chem.* **53**, 4290-4302. doi:[10.1021/jf0502698](https://doi.org/10.1021/jf0502698)

Riethop, M. L., Subers, M. H., Kushnir, I. (1962) Composition of American honeys. US. Department of Agriculture Technical Bulletin 1261.

Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Zaldivar-Cruz, J.M., Kuri, V., Pérez-Álvarez, J.A. (2011) Antioxidant Activity of Artisanal Honey From Tabasco, Mexico, *Inter. J. Food Prop.*, **14**, 459-470. doi: <https://doi.org/10.1080/10942910903249480>.

Singhal, R. S., Kulkarni, P.R., and Rege D.V. (1997) Honey: quality criteria. Handbook of indices of food quality and authenticity, WOODHEAD PUBLISHING LIMITED, Cambridge England, str. 358-385.

Šimić, F. (1980) Naše medonosno bilje, Znanje, Zagreb, str.42.

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

Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E., Lucero, H. (2002) Honey heating treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chem.* **77**, 71-74. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00325-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00325-9).

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

Uršulin- Trstenjak, N. (2012) Makro i mikro elementi u kategorizaciji bagremovog meda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek

Weston, R. (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. *Food Chem.* **71**, 235-239.

White, J.W., (2000) Honey. In *The Hive and the Honey Bee*, Dadant&Sons, Hamilton, Illinois, str. 869- 918.

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 glucose-oxidase system. *Bioch. Bioph. Acta* **73**, 57-70.

Zdravlje iz košnice: med i drugi pčelinji proizvodi (2013), Parad Rijeka, str.24-25.