

Određivanje antioksidativne aktivnosti različitih vrsta meda

Lončar, Višnja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:622322>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Višnja Lončar

Naziv studija: Zootehnika

Smjer: Specijalna Zootehnika

Određivanje antioksidativne aktivnosti različitih vrsta meda

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Višnja Lončar

Naziv studija: Zootehnika

Smjer: Specijalna Zootehnika

Određivanje antioksidativne aktivnosti različitih vrsta meda

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof.dr.sc. Zlatko Puškadija , predsjednik
2. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo , mentor
3. Prof.dr.sc. Marcela Šperanda , član

Osijek, 2017.

SAŽETAK

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Definicija meda	2
2.1.1. Apis mellifera (pčela medarica)	2
2.1.2. Proizvodnja meda	3
2.1.3. Medonosno bilje i geografski položaj.....	4
Bijela djetelina (Trifolium repens).....	13
2.2. Podjela meda	17
2.2.1. Podjela meda prema porijeklu medonosnog bilja ili medne rose.....	17
2.2.2. Podjela prema načinu proizvodnje i/ ili predstavljanja proizvoda	18
3. Svojstva meda	19
3.1. Fizikalna svojstva meda.....	19
3.1.1. Viskoznost.....	19
3.1.2. Kristalizacija.....	19
3.1.3 Gustoća	20
3.1.4. Higroskopnost	20
3.1.5. Površinska napetost	20
3.1.6. Električna vodljivost.....	20
3.1.7. Optička aktivnost.....	21
3.1.8. Indeks refrakcije	21
3.1.9. Specifična masa	21
3.3. Kemijska svojstva meda	22
3.3.1. Ugljikohidrati	23
3.3.2. Voda.....	24
3.3.3. Proteini i enzimi	24
3.3.4. Minerali.....	25

3.3.5. Vitamini	25
3.3.6. Organske kiseline	25
3.3.7. Dušični spojevi.....	25
3.3.8. Hidroksimetilfurfural (HMF).....	25
3.3.9. Fenolne komponente.....	26
3.3.10. Komponente arome.....	31
3.4. Fiziološki učinci meda.....	31
3.4.1. Probavni trakt	31
3.4.2. Dišni sustav	31
3.4.3. Koža.....	31
3.4.4. Živčani sustav.....	31
3.4.5. Antiseptičko djelovanje	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. Zadatak diplomskog rada.....	32
3.2. MATERIJALI I METODE.....	32
3.2.3. Popis uzoraka	32
3.3. Refraktometrijsko određivanje sadržaja vode u medu digitalnim refraktometrom ..	35
3.4. Priprema uzoraka na određivanje prve grupe parametara (HMF, električna vodljivost, pH, udio pepela)	35
3.4.1. Priprema uzoraka (za sve parametre je priprema uzorka ista)	35
3.4.2. Mjerenje hidroksimetilfurfurata (HMF, mg/kg).....	36
3.4.3 Mjerenje električne vodljivosti.....	37
3.4.4. Mjerenje pH vrijednosti	38
3.4.5. Određivanje sadržaja pepela	38
3.5. Određivanje ukupnih fenola FOLIN- CIOCALTEU METODOM.....	39
3.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH METODOM	42
4. REZULTATI	47

5. RASPRAVA	64
6. ZAKLJUČAK	66
7. LITERATURA	67
8. SAŽETAK	69
9. SUMMARY	70
10. POPIS SLIKA I GRAFOVA	71
11. POPIS TABLICA	74
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	75
BASIC DOCUMENTATION CARD	76

1.UVOD

Moderan način života eksponiran je pojavom raznih bolesti. Užurbanost i nedostatak vremena, čovjeka dovodi u nezavisnu zdravstvenu situaciju u kojoj je primoren posegnuti za sintetičkim rješenjem u obliku lijekova. Lijekovi nude poboljšanje simptoma bolesti, no dugoročno ne rješavaju već nastali problem u organizmu. Određena populacija ljudi danas je svjesna te činjenice i iz tog razloga, lagano ali sigurno, pokreće nov način razmišljanja u kojemu je temelj svega „prirodno i zdravo“.

Najpoznatija kronična bolest 21.stoljeća jest pretilost. Pretilost je pokretač raznih kampanja zdrave prehrane i zdravog načina života. Pad imuniteta kod čovjeka izaziva slijed negativnih biokemijskih reakcija unutar tijela, koje ponekad mogu izazvati čak i smrt. Jačanjem prirodnog imuniteta, tijelo dovodimo u ravnotežu a na taj način liječimo bolesti.

Med je jedan od eliksira zdravlja koji se proizvodi milijunima godina i smatra se „zaboravljenim blagom povijesti“ (<http://antolcic-med.com/pdfovi/O-medu.pdf>).

Stare civilizacije, kao što su stari Grci, pčele su smatrali božanskim bićima koje su hranile Zeusa dok je bio mala beba. Ista civilizacija med je koristila vrlo cijenjeno, ne samo kao prehrambeni proizvod već i kao sredstvo za uljepšavanje i balzamiranje. Specifičan okus meda potječe od velike koncentracije ugljikohidrata a aroma od vrste nektara.

Jedno od najbitnijih kemijskih svojstava meda je njegovo antioksidativno svojstvo koje ovisi o količini antioksidanata a njegova antioksidativna aktivnost ovisi o ukupnoj količini polifenola u medu.

Kemijsko svojstvo meda mijenja se unutar jedne vrste kao i između različitih vrsta meda. Uzrok je vrlo jednostavan, geografski položaj pčelinjaka i medonosno bilje na tom području određuje ne samo kemijski sastav već i fizikalno svojstvo meda.

Cilj rada bio je prikazati različite vrste meda, različite antioksidativne aktivnosti sa različitih geografskih položaja u kojima raste specifično medonosno bilje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Definicija meda

Med je prehrambeni proizvod prirodno slatkog okusa, tekuće, viskozne ili kristalizirane konzistencije. Proizvodnju meda vrše medonosne pčele od nektara cvjetova medonosnih biljaka ili od ekstrakta kukaca. Pčele medarice uz pomoć enzima unutar svojega probavnog trakta prerađuju i isušuju nektar pa potom skladište u voštanim stanicama saće (Mujić i sur., 2014.). Pčele stanicu saće hermetički zatvaraju voštanim poklopcem te na taj način konzerviraju med. Med je spreman za vrcanje kada su saće u košnici popunjena više od 60%. Prije samoga postupka vrcanja moraju se odstraniti voštani poklopci na stanicama saća. Potom se okviri stavljaju u vrcaljku gdje se uz centrifugalnu silu ekstrahira med. Med se filtrira i skladišti na za to propisani način.

2.1.1. *Apis mellifera* (pčela medarica)

U svijetu su dobro poznate četiri vrste medonosnih pčela:

1. *Apis mellifera*: europsko- afrička pčela
2. *Apis dorsata*: velika indijska pčela
3. *Apis indica*: indijska pčela
4. *Apis florea*: mala indijska pčela

Smatra se da je porijeklo medonosnih pčela tropska Afrika, sjeverna Europa, Indija i Kina. Kroz povijest kolonizacijom Amerike medonosne pčele raširile su se diljem svijeta pa tako i u Europu (T.- Borovac i sur., 2006.). Na našim se područjima domesticirala europsko- afrička pčela. Prirodno stanište medonosne pčele šupljina je drveta. Najbitnije je za pčelu da nije izložena nepovoljnim vremenskim uvjetima i da ima dovoljno medonosnog bilja za ispašu (Jovanović, 2015.). U pčelarstvu *Apis mellifera* cijenjena je vrsta pčela jer posjeduje genetsku pojačanu otpornost na neke vrste pčelinjih bolesti i nametnike, vrlo su zahvalne za rad jer nisu pretjerano agresivna vrsta. Europsko- afrička pčela ili siva medonosna pčela ima urođenu sposobnost prilagodbe veličine zajednice u odnosu na dostupnost nektara i peludi u okruženju u kojemu se nalazi. Prigodna je vrsta pčela za područja na kojima zima traje u prosjeku duže. U proljeće se izuzetno brzo razvijaju, donose visok prinos meda, radilice u njihovoj zajednici žive u prosjeku 12% duže od ostalih vrsta (<http://www.pcelarstvo.hr/index.php/pcele/vrste-pcela/301-apis-mellifera-carnica>).

2.1.2. Proizvodnja meda

Medonosne pčele odlaze na ispašu, blizu svojega mjesta boravka, na područje koje sadrži mnogo medonosnog bilja koje je bogato ugljikohidratima (nektar, medljika). Pčele radilice ili letačice sakupljaju nektar u medni mješur u kojemu se odvijaju bikemijsko-enzimatski procesi fermentacije meda. Nakon povratka letačice u zajednicu vrši se primopredaja fermentiranog meda mladim pčelama radilicama. Na taj se način sadržaj mednog mješura jedne pčele letačice podjeli u pčelinjoj zajednici na 50 pčela mladih radilica. Svaka mlada radilica primljeni sadržaj prebacuje u svoj medni mješur te ga konstantno provlači kroz usisni kalan i vraća u medni mješur. Na ovaj način sadržaj mednog mješura miješa se sa sekretom ždrijelne žlijezde i dovodi do zgrušnjavanja. Kada se sadržaj zgusne (med) oko 70% sadržaj postaje gust za mladu radilicu te ju izlučuje u stanicu saće gdje se med mehanički zgušnjava dalje. Kada koncentracija vode u medu padne na 80% radilice zatvaraju stanice saća voštanim poklopcem i na taj način on ostaje konzerviran. Vrijeme zgrušnjavanja meda ovisi o supstratu od kojega je načinjen med, temperature i vlažnosti zrak te o jačine same pčelinje zajednice (Jovanović, 2015.).

2.1.2.1. Pčelinja ispaša

Pčele za ispašu koriste vrlo malo energije za let, svega 0,1 mg meda za 1km leta. Sabirni let traje oko 45 minuta i za to vrijeme pčela može obići oko sto cvjetnih glava koje će dati oko pedeset miligrama nektara što je više od polovine same težine pčele. Jedna pčela uspije obaviti let na sabiranje nektara oko 10 puta u danu kada to učini 10 000 pčela, u košnicu se unese oko 5kg nektara. Nakon fermentacije i prerade meda, u košnici se dobije oko 1,25 kg meda. Naravno, sabirni let pčela ne događa se konstantno već kada su vremenski uvjeti prigodni. U prvoj godini pčelarenja očekuje se oko 18 kg meda (Mujić i sur., 2014.).

Pčelinja ispaša započinje u ožujku kada počinje cvatnja lijeske, kukurijeka, ljubičica i svog proljetnog cvijeća i bilja. U travnju započinje ispaša cvjetova voćki i javora. Svibanj predstavlja mjesec glavne ispaše na kontinentalnim dijelovima Hrvatske, naime, u tom mjesecu cvjeta bagrem, najrasprostranjenije drvo na našim područjima

(<http://blog.dnevnik.hr/apikultura/2014/04/1631755223/kalendar-cvatnje-medonosnog-bilja.html>).

2.1.3. Medonosno bilje i geografski položaj

Klimatska raznolikost ima potencijal proizvodnje specifičnih sorti meda. Samo u Hrvatskoj ima oko 250 biljnih vrsta sa kojih pčele sakupljaju nektar, pelud i propolis. U povoljnim vremenskim uvjetima u godini, pčele sakupljaju i značajnu količinu medljike na područjima crnogoričnih (jela, smreka) i bjelogoričnih (hrast, vrba, lipa) šuma. Klima na određenom području određuje vrstu biljaka koje su pogodne za ispašu pčela. Znatna je razlika kontinentalnog i primorskog dijela Hrvatske, u kontinentalnom dijelu razlikujemo biljne vrste nizinskog i gorskog područja dok u primorskom dijelu mediteransko i submediteransko bilje.

Tablica 1. Kalendar medonosnog bilja

<http://blog.dnevnik.hr/apikultura/2014/04/1631755223/kalendar-cvatnje-medonosnog-bilja.html>

MJESEC CVATNJE	MEDONOSNO BILJE
VELJAČA	- bijela vrba - visibaba - šafran - mišjakinja
OŽUJAK	- jaglac - kukurijek - ljubičica - plućnjak
TRAVANJ	- divlji kesten - drača - mandarina - medvjedi luk - maslačak - jela - smreka - uljana repica
SVIBANJ	- bagrem - hrast - livadna kadulja - grahorica - mak turčinak - crvena i bijela djetelina

LIPANJ	<ul style="list-style-type: none"> - lipa - pitomi kesten - lavanda - korijander
SRPANJ	<ul style="list-style-type: none"> - suncokret - svilenica (Luštrika)
KOLOVOZ	<ul style="list-style-type: none"> - vrijesak - poljska metvica - obična zlatnica

2.1.3.1. VELJAČA

Bijela vrba (*Salix Alba*)

Listopadni grm ili stablo koje može narasti do 20 metara visine. Dobra je medonosna biljka (medljikovac) koja pčelama omogućuje dnevni prinos meda oko 3kg u vrijeme cvatnje. Raste na svijetlim, vlažnim i poplavljenim područjima najčešće uz rijeke, sve od nizina do 1000 metara nadmorske visine (područje Podunavlja- istočna Slavonija, Baranja, zapadni Srijem). Ljekovito je i korisno stablo kojemu se najčešće koristi kora i grane kao analgetik ili kod prehlada i visokih temperatura.



Slika 1. Cvjetovi i list bijele vrbe (https://hr.wikipedia.org/wiki/Bijela_vrba)

Visibaba (*Galanthus nivalis*)

Trajna je zeljasta biljka koja se razmnožava lukovicom, ljekovita je i otrovna. Pčelama u rano proljeće daje mnogo peludi i nektara koje je narančasto- žute boje. Raste na vlažnim, rahlim i blago kiselim tlima u listopadnim, mješovitim, crnogoričnim šumama, proplancima, livadama sve od nizina do 2200 metara nadmorske visine (Slavonija i Baranja). Od visibaba se izrađuju *Bachove cvjetne kapi* koje pomažu osobama u depresiji. Visibaba je od 2006. godine zaštićena cvjetna vrsta u Hrvatskoj.

(<http://upbehar.weebly.com/visibaba.html>)

Šafran proljetni (*Crocus vernus*)

Trajnica koja se razmnožava lukovicom iz porodice perunika. Pčelama pruža, kao i visibaba prvu proljetnu pašu. Raste na vlažnom tlu, prozračnim i svijetlim listopadnim, mješovitim šumama, livadama, travnjacima, voćnjacima. Šafran možemo pronaći i na alpskim i subalpskim područjima. Sadrži puno škroba te se jede kao povrće. Šafranov cvijet može biti raznih boja, od bijele do tamno ljubičaste.

(<http://www.plantea.com.hr/proljetni-safran/>)

Mišjakinja (*Stellaria media*)

Jednogodišnja je jestiva zeljasta biljka iz porodice karanfila. Počinje cvasti od siječnja i cvate cijele godine. Raste na livadama, poljima, vrtovima najčešće u nizinskim neobrađenim područjima. Mišjakinja je biljka bogata vitaminom C, mineralima: Fe, Ca, K, Zn i Cu.



Slika 2. Cvjetovi mišjakinje (<http://www.plantea.com.hr/misjakinja/>)

2.1.3.2. OŽUJAK

Jaglac (*Primula vulgaris*)

Trajna zeljasta biljka iz porodice jaglačevki. Cvjeta krajem veljače sve do svibnja. Raste na suhim livadama, proplancima i svijetlim šumama sve do 1200 metara nadmorske visine. Pčelama od ranog proljeća daje pelud i malo nektara. Cvjetovi jaglaca koriste se za smirivanje kašlja a listovi su bogati vitaminom C. Dolazi u raznim bojama od bijele do ljubičaste.

Kukurijek (*Helleborus*)

Kukurijek je vjesnik proljeća, spada u porodicu žabnjaka i otrovan je. U Europi je najznačajniji velevjetni (crni) kukurijek. Raste na suhim i propusnim tlima, blizu šumaraka i na rubovima bukovih, bukovo-jelovih šuma. Raste do 2000 metara nadmorske visine.



Slika 3. Velevjetni kukurijek (<http://www.plantea.com.hr/kukurijek/>)

Ljubičica mirisna (*Viola Odorata*)

Trajna je zeljasta biljka iz porodice ljubica i smatra se dobrom medonosnom biljkom koja daje manju količinu nektara i peludi. Cvjetovi ljubičica jestivi su i stavljaju se u salate i juhe. Raste u svijetlim listopadnim šumama, među grmljem, uz putove, obale i rijeke. Najviše voli sjenu drveća i raste na svim vrstama tala (Slavonija i Baranja, Mađarska, južni dio Slovenija).

Plućnjak (*Pulmonaria officinalis L.*)

Plućnjak je trajna zeljasta biljka iz porodice boražinovki. Cvjetovi joj dolaze u ljubičastoj ili plavoj boji, mladi listovi ove biljke bogati su vitaminom C i karotinom pa su stoga i jestivi. Raste u svijetlim listopadnim i mješovitim šumama, od nizina do predplaninskih područja.



Slika 4. Plućnjak u cvatu (<http://www.plantea.com.hr/plucnjak/>)

2.1.3.3. TRAVANJ

Divlji kesten (*Aesculus hippocastamus*)

Listopadno je stablo iz porodice divljih kestena. Sjemenke koje se nalaze unutar kestena sadrže saponin escin koji povoljno djeluje na kapilare i vene. Dobra je medonosna biljka, pčelama daje mnogo nektara, peluda i propolisa. Prirodno raste na području jugoistočne Europe. Uzgaja se kao ukrasno drvo u perivojima i parkovima.



Slika 5. Divlji kesten u cvatu (<http://www.plantea.com.hr/divlji-kesten/>)

Drača (*Paliurus spina-christa*)

Drača je bodljikavi listopadni grm iz porodice krkavina. Medonosna je biljka koja medu kada je toplo i vlažno bez vjetra. Med od drače žut je, bez mirisa, slatkotrpkog okusa i brzo se kristalizira. Raste na južnom dijelu Hrvatske uz jadransku obalu u Dalmaciji. Raste u gustim šikarama, na kamenitim obroncima, među stijinama, u listopadnim šumama do 1500 metara nadmorske visine.



Slika 6. Drača (<http://www.plantea.com.hr/draca/>)

Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco)

Mandarina spada u porodicu citrusa, pčelama cvjetovi mandarine daju nektar. Raste na područjima tople klime, najčešće se uzgaja na području Mediterana a kod nas uz Jadransko more.



Slika 7. Cvijet mandarine (<http://www.plantea.com.hr/mandarina/>)

Medvjedi luk (*Allium ursinum*)

Trajna je zeljasta biljka iz porodice lukova. Med od medvjedeg luka žute je boje i miriši na luk. Raste u cijeloj Europi na sjenovitim mjestima listopadnih šuma na visini do 1900 metara nadmorske visine.



Slika 8. Cvjetovi medvjedeg luka (<http://www.plantea.com.hr/medvjedi-luk/>)

Maslačak (*Taraxacum officinale*)

Trajna je zeljasta biljka iz porodice glavočika. Dobra je medonosna biljka koja cvate duže razdoblje što pčelama omogućuje duže skupljanje žutog peluda i nektara. Maslačak je rasprostranjen po cijeloj Europi i raste na pašnjacima, livadama i planinama.

Jela (*Abies alba*)

Obična jela spada u porodicu borovki. Jela obilno praši pelud no siromašan je bjelančevinama pa ga pčele slabije sakupljaju ali sakupljaju velike količine medljike-medne rose koja nastaje izlučivanjem biljnih ušiju, te dosta propolisa. Med od medljike

tamnozeleno je boje s mirisom na smolu i brzo se kristalizira. Raste kao autohtona vrsta jela u Hrvatskoj na brdsko- planinskim područjima uz bukvu i hrast.

Smreka (*Picea abies*)

Obična smreka zimzeleno je stablo iz porodice borovki. Na mladim izbojima u travanju i svibnju uši izlučuju medenu rosu koja privlači pčele. Med medljike od smreke tamne je boje, gust je i brzo kristalizira. Raste u sjevernoj Europi i na brdskim i planinskim područjima srednje i južne Europe.



Slika 9. Obična smreka (<http://www.plantea.com.hr/obicna-smreka/>)

Uljana repica (*Brassica napus*)

Dvogodišnja je zeljasta biljka iz porodice kupusnjača. Vrlo je dobra medonosna biljka, med je nježne svijetložute boje, sadrži više groždanog nego li voćnog šećera i iz tog razloga brže kristalizira i postane sivkaste boje nakon vrcanja. Raste na područjima blage do umjerene klime.



Slika 10. Uljana repica (<http://www.plantea.com.hr/uljana-repica/>)

2.1.3.4. SVIBANJ

Bagrem (*Robinia pseudoacacia*)

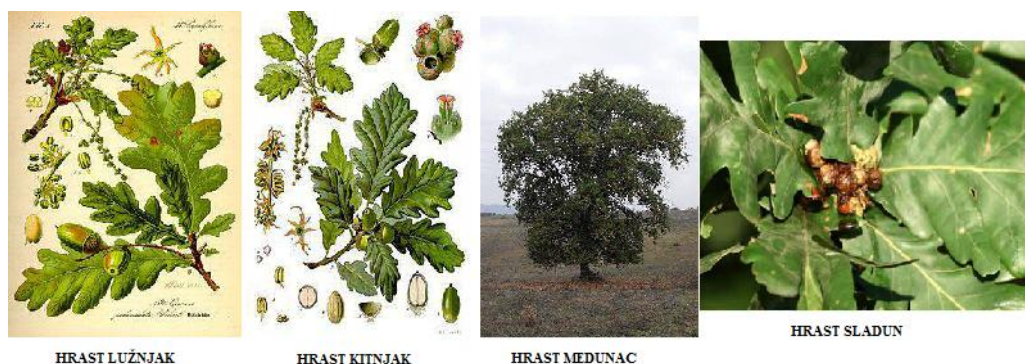
Listopadno je drvo iz porodice mahunarki i smatra se vrhunskom medonosnom biljkom. Stabla u nizinama daju više nektara od onih u planinama, pelud se luči najjače kada nema vjetra i kada je vedro i toplo. Bagremov med sadrži više voćnog šećera nego groždanog pa stoga dugo ostane u nekrystaliziranom stanju. Bagrem raste na umjereno vlažnim tlima šuma i šumaraka. Kod nas u Baranji raste doslovno kao korov. Cvjetovi sadrže mnogo C vitamina a nektar cvijeta ima oko 2mg šećera u sebi.



Slika 11. Bagrem u cvatu (<http://www.plantea.com.hr/bagrem/>)

Hrast (*Quercus* spp.)

Postoji puno vrsta hrasta ali su sve vrste listopadna stabla koja narastu do 35 metara visine. Najznačajniji su: hrast lužnjak, kitnjak, medunac i sladun. U svibnju pčele skupljaju pelud a u lipnju medenu rosu. Najčešće raste u Slavoniji (Požeško-Slavonska županija) i Baranji.



Slika 12. Vrste hrasta (<http://up-ulisce.hr/wp-content/uploads/2016/12/medonosno-bilje.pdf>)

Livadna kadulja (*Salvia pratensis*)

Livadna kadulja jestiva je trajna, aromatična zeljasta biljka iz porodice usnatica. Medonosna je biljka koja pčelama daje nektar i cvjetni prah. Nektar ove biljke bogat je voćnih i grožđanim šećerom i sadrži 65,6% saharoze. Raste kao samonikla biljka po cijeloj Europi najčešće na livadama, pašnjacima i rubovima šuma.



Slika 13. Livadna kadulja (<http://www.plantea.com.hr/livadna-kadulja/>)

Grahorica (*Vicia sativa*)

Jednogodišnja je ili dvogodišnja biljka iz porodice leptirnjača. Medonosna je i jestiva biljka. Raste samonikla na livadama, uz puteve i na poljima po cijeloj Europi.



Slika 14. Grahorica (<http://www.plantea.com.hr/grahorica/>)

Mak turčinak (*Papaver rhoeas L.*)

Jednogodišnja je zeljasta, medonosna biljka iz porodice makovki. Cvjetovi su jarko crvene boje a pelud koju pčele sakupljaju dolazi u tamnoplavoj boji. Prirodno raste po cijeloj Europi od nizinskog do planinskog područja.

Bijela djetelina (*Trifolium repens*)

Puzava ili bijela djetelina višegodišnja je zeljasta biljka iz porodice mahunarki. Vrlo je dobra medonosna biljka, pčelama daje pelud (tamne boje) i nektar. Rasprostranjena je po nizinskom do planinskom području.



Slika 15. Bijela djetelina (<http://www.plantea.com.hr/bijela-djetelina/>)

Crvena djetelina (*Trifolium pratense*)

Zeljasta je medonosna i višegodišnja biljka iz porodice mahuna. Pčelama donosi mnogo nektara i peludi. U poljoprivredi, točnije ratarstvu, koristi za obogaćivanje tla dušikom i kao krmno bilje. Raste po cijeloj Europi na livadama i pašnjacima.



Slika 16. Crvena djetelina (<http://www.plantea.com.hr/crvena-djetelina/>)

2.1.3.5. LIPANJ

Lipa (*Tilia*)

Lipa raste u sastavu listopadnih šuma no često se sadi uz ceste i u parkove. Ona je odlična medonosna biljka, pčelama daje puno nektara i peludi. Najbolje luči nektar kada je toplo i vlažno. Prinosi meda su ok 20 kg po košnici, med je vrlo cjenjen na našem području. Drvo lipe raste po cijeloj Europi od nizinskog do planinskog područja.

Pitomi kesten (*Castanea sativa*)

Lipa je listopadno stablo iz porodice bukvi. Drvo pitomog kestena rasprostranjeno je cijelom južnom Europom i oko Sredozemnog mora. Kod nas raste u kontinentalnoj Hrvatskoj sve do 900 metara nadmorske visine. Također se uzgaja kao ukrasno stablo u parkovima, perivojima, voli toplu i blagu klimu sa dovoljno vlage u zraku. Pčele intenzivno posjećuju pitomi kesten početkom cvatnje. Sa ženskih cvjetova stabla pčele sakupljaju nektar a sa muških cvjetova cvjetni prah.



Slika 17. Pitomi kesten (<http://www.plantea.com.hr/pitomi-kesten/>)

Lavanda (*Lavandula*)

Zimzeleni je i mirisni polugrm iz porodice usnača. Raste na suhim i toplim područjima kao što je obala Jadranskog mora i otocima. Danas se uzgaja i kao dekorativna biljka u dvorištima i parkovima. Kod nas se lavanda smatra najmedonosnijom biljkom jer je pčelinja paša uglavnom sigurna i rijetko kada podbaci, jedina mana je nedostatak peludi.

Korijander (*Coriandrum sativum*)

Jednogodišnja je medonosna, zeljasta biljka iz porodice štitarki. Rasprostranjena je diljem srednje i južne Europe. Najčešće raste kao korov na njivama i vinogradima.



Slika 18. Cvjetovi korijandera (<http://www.plantea.com.hr/korijandar/>)

2.1.3.6. SRPANJ

Suncokret (*Helianthus annuus L.*)

Jdnogodišnja je zeljasta biljka iz porodice glavočika. Suncokret raste na osunčanim mjestima, zaštićen od propuha i na vrlo plodnim tlima. Dobro podnosi sušu zbog razvijenog i jakog korijena. Rasprostranjen je po cijeloj Europi posebno na obradivim poljoprivrednim tlima. Suncokret je dobra medonosna biljka, cvjetovi daju velike količine nektara i peludi.

Svilenica- Luštrika (*Periploca graeca*)

Grčka luštrika listopadna je zaštićena biljka iz porodice svilenica. Rasprostranjena je u južnoj i jugoistočnoj Europi. Raste na toplim i sunčanim staništima te na vlažnim i močvarnim područjima (Kopački rit).



Slika 19. Cvijet luštrike (<http://www.plantea.com.hr/lustrika/>)

2.1.3.7. KOLOVOZ

Vrijesak (*Calluna vulgaris*)

Višegodišnja je polugrmolika medonosna biljka iz porodice vrijesova. Vrijesak je rasprostranjen po Europi i raste na siromašnim i blago kiselim tlima na sunčanim livadama i pašnjacima i svijetlim šumama.



Slika 20. Vrijesak u cvatu (<http://www.plantea.com.hr/vrijesak/>)

Poljska metvica (*Mentha arvensis*)

Višegodišnja je zeljasta medonosna biljka iz porodice usnača. Rasprostranjena je po Europi i raste kao korov na oranicama, travnjacima, uz potoke i rijeke od nizinskog do planinskog područja. Pčelama daje mnogo nektara i nešto manje peludi.



Slika 21. Poljska metvica (<http://www.plantea.com.hr/poljska-metvica/>)

Obična zlatnica (*Solidago virgaurea*)

Višegodišnja je medonosna zeljasta biljka iz porodice glavočika. Rasprostranjena je na većem dijelu Europe, raste uz obale, rijeke i na šumskim čistinama.



Slika 22. Obična zlatnica (<http://www.plantea.com.hr/obicna-zlatnica/>)

2.2. Podjela meda

Med se može podijeliti u dvije kategorije:

1. Podjela prema porijeklu medonosnog bilja ili medne rose
2. Podjela prema načinu proizvodnje i/ ili predstavljanja proizvoda

2.2.1. Podjela meda prema porijeklu medonosnog bilja ili medne rose

Nektarni med

Nektarni med proizvod je medonosnih pčela od nektara cvjetova medonosnog bilja i može biti:

1.) Sortni ili monoflorni med

Med je u kojemu udio peludnog zrnca određene biljne vrste (medonosnog bilja) daje specifičan okus i miris toj vrsti meda.

Najmanji postotak peludnih zrnaca određene medonosne biljke u medu kako bi on bio med te medonosne biljke:

- Bagrem 20%
- Lipa 25%
- Suncokret 40%
- Kadulja 15%
- Kesten 85%
- Vrijes 20%
- Ružmarin 30%
- Lavanda 20%
- Drača 20% (Mujić i sur., 2014.)

2.) Cvjetni ili poliflorni med

2.1. Mješani med

Proizvod je koji u svom sastavu ima cvjetnog ili nektarnog meda i medljikovca.

2.2. Medljikovac

Proizvod je kojega medonosne pčele proizvode od medene rose crnogoričnih i bjelogoričnih biljaka ili iz ekstrakata kukaca roda *Hemiptera*, koji sišu žive dijelove biljaka.

2.2.2. Podjela prema načinu proizvodnje i/ ili predstavljanja proizvoda

- *Med u saću*

Med je kojega pčele čuvaju u stanicama saća kao hranu

- *Med u komadima saća ili rezano saće u medu*

Med koji sadrži jedan ili više komada meda u saću.

- *Cijeđeni med*

Med koji se dobije cijeđenjem otvorenog meda u saću bez legla

- *Vrcani med*

Med dobiven centrifugiranjem otvorenog meda u saću bez legla

- *Kremasti med*

Vrcani je med dobiven ubrzanim procesom kristalizacije

- *Topljeni med*

Med dobiven postupkom hladnog gnječanja saća koji ne sadrži leglo uz ili bez primjene postupka umjerenog zagrijavanja (najviše 45C°) s naknadnim brzim hlađenjem

- *Filtrirani med:*

Med dobiven postupkom odstranjivanja stranih anorganskih ili organskih tvari kao rezultat značajnog smanjenja udjela peludi u medu.

- *Industrijski med ili med za preradu*

Med je koji se koristi isključivo u industrijske svrhe ili kao sastojak hrane koja se nadalje prerađuje a nije prikladan za neposrednu prehranu ljudi zato što:

- može imati nesvojstven miris ili okus
- može doći do početka procesa fermentacije ili potpune fermentacije
- je zagrijavan na temperaturi iznad 45 C° (Mujić i sur., 2014.)

3. Svojstva meda

Med kao i svaki proizvod ima svoja fizikalna, senzorna i kemijska svojstva koja određuju proizvod kao takav.

3.1. Fizikalna svojstva meda

Fizikalna svojstva vrlo su bitna kod provjere sigurnosti proizvoda i temeljne su karakteristike meda. U fizikalna svojstva meda ubrajamo: viskoznost, kristalizaciju, gustoću, higroskopnost, površinsku napetost, električnu vodljivost, optička aktivnost, indeks refrakcije i specifična masa. Svi ovi parametri usko su povezani sa kemijskim svojstvima meda i međusobno utječu jedan na drugoga.

3.1.1. Viskoznost

Viskoznost meda označava stupanj likvidnosti i utječe na daljnje postupanje s medom tijekom dorade i skladištenja. Na viskoznost meda utječe više različitih faktora: sastav samoga meda i gustoća, podrijetlo nektara, koncentracija vode u medu, temperatura te broj i veličina kristala. Što je veći udio vode u medu manja je viskoznost dok se povećanjem temperature pri konstantnom udjelu vode viskoznost također smanjuje jer ima manje molekularnog trenja te su manje hidrodinamičke sile (Vahčić i Matković, 2009.). Što je veća relativna gustoća a manji je postotak vode veća je viskoznost meda. Sam porast temperature smanjuje viskoznost a smanjenje temperature povećava viskoznost meda. Svi parametri međusobno ovise jedan o drugome, stoga je bitno tijekom analize uzeti u obzir sve utjecaje koji mogu promijeniti karakteristiku samoga proizvoda.

3.1.2. Kristalizacija

Mnogi kupci misle da je kristalizirani med pokvaren ili mu je naknadno dodan šećer, naravno, to su priče koje nisu točne. Kristalizacija je prirodno svojstvo meda i razlog je vrlo jednostavan, naime, med je sam po sebi prezasićena otopina glukoze i spontano prelazi u stanje ravnoteže kristalizacijom suvišne količine glukoze u otopini (Vahčić i Matković, 2009.). Glavni uzročnik kristalizacije je sadržaj vode u medu no neizostavni faktor je i temperatura. Med ne kristalizira iznad 25 C° kao niti ispod 5C° (Mujić i sur., 2014.). Kristalizacija je je proces oslobađanja vode i kao rezultat dobije se veći sadržaj vode u medu te se time povećava opasnost od fermentacije i kvarenja. Stoga je vrlo bitno med ostaviti da u potpunosti kristalizira jer se time med konzervira. Bitno je naglasiti da kristalizacija ne utječe na promjenu kvalitete niti vrijednosti meda.

3.1.3 Gustoća

Gustoća meda izražava se kao specifična težina i veća je od gustoće vode no ovisi o sadržaju vode u medu.

3.1.4. Higroskopnost

Higroskopnost nekog proizvoda jest sposobnost upijanja, otpuštanja ili zadržavanja vode iz svoje okoline. Med je proizvod koji je osjetljiv na relativnu vlažnost zraka okoline u odnosu na koncentraciju vode koju sadrži. Visok udio fruktoze čini med higroskopnim jer npr. tijekom kristalizacije ona ostaje u tekućem stanju i higroskopnija je od glukoze. Normalan med sa sadržajem vode od 18,3% ili manje upija vlagu iz zraka pri 60% relativne vlage zraka, no ukoliko je postotak vode ispod 18% neće doći do fermentacije niti do kvarenja meda (Mujić i sur., 2014.).

3.1.5. Površinska napetost

Med ima malu površinsku napetost i viskoznost što mu omogućuje upijanje vode a time dobijemo efekt pjenušavosti koji se dobro iskorištava u kozmetičke svrhe (Mujić i sur., 2014.).

3.1.6. Električna vodljivost

Električna vodljivost je svojstvo i sposobnost nekog materijala da provede električnu struju. U medu električnu struju provode disocirane kiseline i minerali koji se nalaze u ionskom obliku. Što je veća koncentracija disociranih kiselina i minerala u medu električna vodljivost je veća. Kod provjere meda radi se električna vodljivost kako bi se odredilo botaničko porijeklo meda a time i vrsta meda.

Vrsta meda	El. vodljivost (mS/cm)
Repica	0,09 – 0,27
Kesten	0,80 – 2,07
Vrijesak	0,42 – 1,40
Eukalptus	0,19 – 1,33
Suncokret	0,20 – 0,60
Lavanda	0,12 – 0,60
Ružmarin	0,10 – 0,35
Lipa	0,33 – 1,15
Djetelina	0,13 – 0,25
Cvjetni	0,10 – 0,70
Medljikovac	0,80 – 2,11

Slika 23. Električna vodljivost različitih vrsta meda (Vahčić i Matković, 2009.).

3.1.7. Optička aktivnost

Med ima sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti što bi značilo da je vodena otopina meda optički aktivna. Fruktaza je monosaharid (nektarni med) koji zakreće polariziranu svjetlost u lijevo a glukoza kao i ostali disaharidi, trisaharidi i viši oligosaharidi (medljikovac) u desnu stranu (Vahčić i Matković, 2009.).

3.1.8. Indeks refrakcije

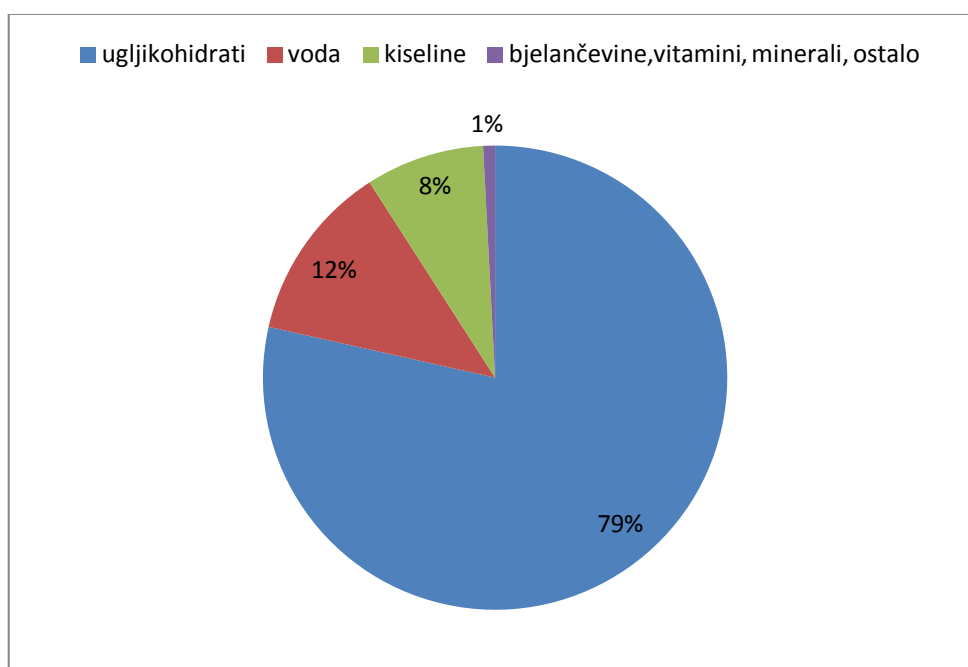
Indeks refrakcije predstavlja udio topljive tvari (vode) u medu. Mjerenje se provodi refraktometrom koji radi na principu loma svjetlosti kad ona prolazi kroz otopinu.

3.1.9. Specifična masa

Specifična masa meda predstavlja omjer mase meda u odnosu na masu iste količine vode, a time ovisi o udjelu vode u medu (Vahčić i Matković, 2009.).

3.3. Kemijska svojstva meda

Medonosno bilje, geografski položaj i medonosne pčele medu daju specifičnost kao i samo zrenje meda. Kemijski sastav meda iz tog razloga razlikuje se, ne samo između vrsta, već i unutar jedne vrste. Med je namirnica koja sadrži oko 70 različitih kemijskih sastojaka. Najzastupljeniji sastojak je invertni šećer, odnosno smjesa jednakih količina glukoze i fruktoze nastale hidrolizom saharoze i voda (Mujić i sur., 2014.). Ostali sastojci u medu su proteini (uključujući enzime), mineralne tvari, vitamini, organske kiseline, dušični spojevi, hidroksimetilfurfural, fenolne komponente, komponente arome. U medu prosječno 95-97% zauzimaju ugljikohidrati, 15-23 % voda, 10% kiseline i 1% bjelančevine, vitamini, minerali i ostali kemijski sastojci (Mujić i sur., 2014.).



Slika 24. Prosječan postotni kemijski sadržaj meda (podjela na 100%)

3.3.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su glavni sastojci meda i zauzimaju 95-97% od toga većinu šećera zauzimaju glukoza i fruktoza između 85-95% od ukupnog postotka šećera. Saharoza je bitna tijekom provjere meda jer odaje patvoreni med kao takav (hranjenje pčela šećerom).

Tablica 2. Udio pojedine vrste šećera u medu (Mujić i sur., 2014.).

fruktoza	33,3- 40,0%
glukoza	25,2- 35,3%
saharoza	0,4- 10,1%
Ostali disaharidi	41,1%- 14,6%

Većina disaharida i oligosaharida nalazi se u nektaru te ih medonosne pčele svojim enzimima i organskim kiselinama reduciraju na jednostavne šećere, iz tog razloga u medu ima puno fruktoze i glukoze.

Tablica 3. 11 Disaharida i 12 oligosaharida u medu (Vahčić i Matković, 2009.).

DISAHARIDI	OLIGOSAHARIDI
Saharoza	Erloza
Maltoza	Melecitoza
Izomaltoza	α - izomaltozilglukoza
Nigeroza	β - izomaltozilglukoza
Turanoza	Maltotrioza
Kobioza	1-kestoza
Laminoriboza	Panoza
α - trehaloza	Centozza
β - trehaloza	Izopanoza
gentiobioza multuloz	Rafinoza
izomaltuloza melibioza	Izomaltotetroza
	izomaltopentoza

3.3.2. Voda

Sadržaj vode u medu najvažniji je parametar kakvoće meda budući da kakvoća određuje stabilnost meda i otpornost na mikrobiološko kvarenje, odnosno, fermentaciju tijekom čuvanja. Isto tako voda određuje stabilnost meda, to jest utječe na kristalizaciju, viskoznost i specifičnu težinu meda. Zbog higroskopskog svojstva meda voda nije stalan i ujednačen parametar. Udio vode u medu kreće se od 13- 25%, glavni čimbenici koji utječu na količinu prisutne vode u medu jesu: klimatski uvjeti, podrijetlo i sastav nektara te uvjeti procesiranja i skladištenja meda. Med koji sadrži više od 20% vode skloniji je fermentaciji.

3.3.3. Proteini i enzimi

Proteini koji se nalaze u medu preteča su medonosnih pčela ili peludi. Proteini u medu mogu biti u obliku prave otopine aminokiselina ili u obliku koloida, malih laganih čestica proteina koje lebde u medu a utječu na formiranje nekih spojeva u medu kao što je pjena, mjehurići, tamnjenje, zamućenje ili kristalizacija (Belčić i sur., 1979.). Udio proteina u medu iznosi oko 0-1,7%, neki su u vezanom obliku a neki dolaze kao slobodne aminokiseline. Udio ukupnih proteina vrlo je malen i sastoji se od 18 esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina: prolin, lizin, histidin, arginin, asparaginska kiselina, treonin, serin, glutaminska kiselina, glicin, alanin, cistein, valin, metionin, izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin i triptofan. Najzastupljenija aminokiselina je prolin 80-90% od svih ukupnih aminokiselina (Batinić i Palinić, 2014.).

Enzime u medu dodaju medonosne pčele prilikom prerade nektara dok neki potječu iz peludi ili kvasaca i bakterija koje se nalaze u medu. Enzimi su vrlo bitni jer kataliziraju određene reakcije i one se sintetičkim putem ne mogu nadomjestiti u medu.

Tablica 4. Enzimi prisutni u medu (Škenderov i Ivanov, 1986.).

ENZIM	REAKCIJA KOJU KATALIZIRA
Dijastaza (α - i β - amilaza)	Razgrađuje škrob na druge ugljikohidrate
Invertaza (α - glukozidaza)	Razgrađuje saharozu na glukozu i fruktozu uz nastajanje manje količine kompleksnih šećera
Glukoza oksidaza	Oksidira glukozu u glukolakton
Kisela fosfataza	Hidrolizira estere fosfatne kiseline
Proteaze	Hidroliziraju proteine i polipeptide na manje peptide
Esteraza	Hidrolizira esterske veze
β - glukozidaza	Prevodi β - glukane u oligosaharide i glukozu

3.3.4. Minerali

Najzastupljeniji minerali u medu su: K, P, S, Cl, Mg, Fe, Al a neznatne količine minerala dolaze u obliku Cu, Zn, Ar. Tamnije vrste meda bogatije su mineralima jer imaju veliki udio pepela u sebi. Udio minerala u medu ovisi o botaničkom porijeklu i sastavu tla na kojemu je biljka rasla i klimatskim uvjetima.

3.3.5. Vitamini

Med sadrži iznimno male količine vitamina i to one topive u vodi kao što su vitamin C i vitamine B skupine (Mujić i sur., 2014.).

3.3.6. Organske kiseline

Organske kiseline medu daju kiselost i specifičan okus. Veliki broj organskih kiselina u medu nalazi se u obliku estera i u med dospijevaju nektarom, medljikom ili dugotrajnim skladištenjem. Najzastupljenija je glukonska kiselina koja je rezultat razgradnje glukoze a pored nje prisutne su još i mravlja, oksalna, ćilibarna, limunska, vinska, mliječna, jabučna, valerijanska, benzojeva, pirogroždana i druge. Kiselost meda pokazatelj je kakvoće meda i kreće se od 3,2- 6.5 pH (Mujić i sur., 2014.). Visoka kiselost ukazuje na fermentaciju gdje je alkohol kao produkt fermentirao u organsku kiselinu.

3.3.7. Dušični spojevi

Med sadrži dušične spojeve u tragovima i u medu su zastupljeni u obliku aminokiselina i bjelančevina različitog porijekla (nektar, pelud) (Mujić i sur., 2014.).

3.3.8. Hidroksimetilfurfural (HMF)

Hidroksi-2-furaldehid ili hidroksimetilfurfuralciklički je aldehid koji nastaje dehidracijom fruktoze i glukoze u kiselom mediju. Hidroksimetilfurfural se dalje razlaže na levulinsku i mravlju kiselinu. Pri povišenoj temperaturi brža je reakcija nastajanja što bi značilo da temperatura utječe na nastajanje HMF-a, ma da skladištenje meda na nižim temperaturama također povećava udio HMF-a ali sporije. HMF je prirodno prisutan u medu u svježem medu njegov je udio dosta nizak i to ispod 1 mg/kg dok je visok u medu tretiranom indirektnim zagrijavanjem tijekom prerade meda (10 mg/kg). HMF se koristio za utvrđivanje patvorenog meda no danas se osim toga koristi i kao parametar pomoću kojega se prikazuje neprikladno skladištenje meda. Na pojavu i udio HMF-a u medu utječe vrsta meda, njegov pH, udio kiselina, vlaga i izloženost svjetlosti. Prema pravilniku maksimalni udio HMF-a u hrvatskim medovima iznosi 40mg/kg što je sukladno preporukama Codex Alimentarius Europske komisije, iznimke su medovi proizvedeni u tropskim uvjetima koji imaju do 80 mg/kg HMF-a (Vahčić i Matković, 2009.).

3.3.9. Fenolne komponente

Fenolne komponente nastaju u biljkama kao sekundarni produkt njihova metabolizma i obično su uključene u obrambeni mehanizam biljke.

Podijeljene su u četiri velike skupine:

1. fenolne kiseline
2. antioksidansi i polifenoli (flavonoidi)
3. stilbeni
4. lignani

3.3.9.1. Antioksidansi i antioksidativni kapacitet meda

Antioksidansi su fitokemikalije koje u maloj koncentraciji sprječavaju oštećenje biološkog materijala od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. U zdravom organizmu postoji ravnoteža između nastajanja slobodnih radikala i antioksidanata do trenutka kada tijelo doživi oksidativni stres. Glavna karakteristika antioksidanata jest da neutraliziraju nastale slobodne radikale, djeluju preventivno ili razarajuće.

Antioksidativni kapacitet je mjera kojom se pokazuje sposobnost reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija kako u hrani tako i u organizmu. Med je proizvod koji ima antioksidativna svojstva upravo zbog određene količine polifenola (flavonoida) u sebi. Na antioksidativni kapacitet meda najviše utječe botanički sastav meda, klimatski uvjeti, prerada i skladištenje proizvoda.

Oksidativni stres izazivaju reaktivne kisikove vrste, slobodni radikali, kao što su superoksidni radikal, hidrokilni radikal, peroksidni radikal, alkoksilni radikal, hipokloritna kiselina, ozon, singletni kisik i vodikov peroksid, svi oni u svojoj vanjskoj ljusci imaju jedan ili više ne sparenih elektrona a time su vrlo reaktivni i nestabilni pa se u organizmu vežu „na što stignu“ a time poremete metabolizam.

Najčešći slobodni radikali su reaktivni kisikovi radikali (ROS) i reaktivni dušikovi radikali (RNS). ROS (eng. *reactive oxygen species*) je superoksidni radikal (O_2^{\bullet}), hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$), peroksilni radikal ($R^{\bullet}O_2$), alkoksilni (RO^{\bullet}), hipokloritna kiselina (HClO), ozon (O_3), singletni kisik ($^1\Delta_g O_2$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Hidroksilni radikal je najreaktivniji, odnosno odlikuje se niskom specifičnošću prema supstratu i kratkim vremenom polu života. Slikovito rečeno, najlakše oduzima elektron od okolnih molekula. Važan je inicijator lipidne peroksidacije. RNS (eng. *reactive nitrogen species*) su reaktivne vrste koje u svojem sastavu osim kisika sadrže i dušik, primjerice dušikov monoksid (NO) dušikov dioksid (NO_2), peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) i dr. dušikov monoksid (NO) stvaraju

različite izoforme enzima NOS (dušikov-oxid sintetaza) (Smith C M i sur. - 2004). U niskim koncentracijama esencijalan je kao neurotransmiter i hormon koji uzrokuje radikalom i stvara RNS, čiji je učinak na stanice sličan učinku ROS-a (Lončar, 2015.).

U živom organizmu slobodni kisikovi radikali stvaraju se na nekoliko načina:

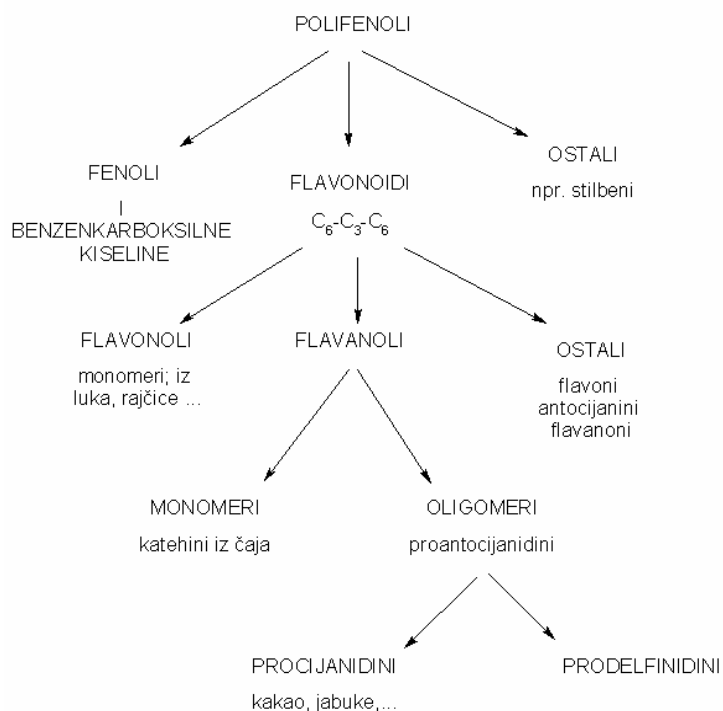
1. djelovanjem ionizirajućeg zračenja na biološke molekule
2. tijekom procesa staničnog disanja, zbog «bijega» pojedinih elektrona u transportnom lancu elektrona i nepotpune redukcije kisika
3. sintezom u stanicama imunološkog sustava, neutrofilima i makrofazima, posredstvom

Antioksidanti mogu biti:

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

3.3.9.1.1. Polifenoli

Polifenoli skupina neenzimatskih antioksidanata, sekundarni su metaboliti koji su široko rasprostranjeni u biljkama pa i u medu. U medu se mjeri ukupna količina polifenola kako bi se odredio antioksidativni kapacitet.



Slika 25. Podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008.)

Funkcija polifenola u biljkama je raznolika, zaštita od patogenih mikroorganizama (bakterija, virusa) i UV zračenja, razvijanje boje kako bi se privukli kukci za oprašivanje (medonosne pčele). Polifenoli mogu djelovati kao antioksidanti preko dva glavna načina djelovanja.

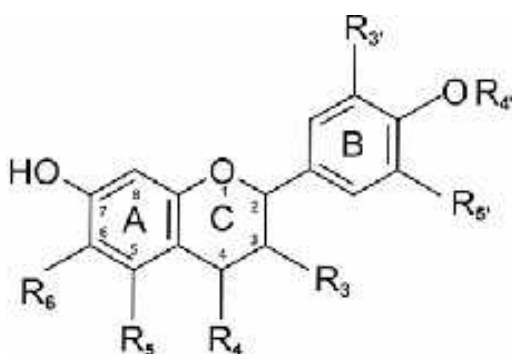
Prvi, stupaju u reakciju sa ROS. Antioksidativno djelovanje polifenola prvenstveno se pripisuje nazočnosti benzenskom prstena na koji je vezana hidroksilna skupine koje su sposobne donirati ili jedan vodik atom ili jedan elektron na ROS. Kao posljedica toga, fenoksil radikal polifenola se generira, a nakon reakcije s drugim radikalom, dobije se stabilna strukturna formula. Valja napomenuti, međutim, da *in vitro* neki polifenoli (kao što su kvercetin, miricetina, galna kiselina i epigalokatehingalat) također mogu djelovati kao pro-oksidansi, ovisno o njihovoj koncentraciju.

Drugi, stanje u kojem postoji osnovana vjerojatnost da prirodni polifenola mogu stupiti u *in vivo* uvjetima kao antioksidans izravno se vežu za ROS (tj. kvercetin i epigalokatehin-3-galat) koji su dokazani da izravno ulaze u mitohondrije (Lončar, 2015.).

3.3.1.1.2. Flavonoidi

Med upravo zbog prisutnosti flavonoida ima antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno svojstvo. Sva ta svojstva rezultat su sposobnosti flavonoida da „hvataju“ slobodne radikale, inhibiraju specifične enzime i stimuliraju neke hormone i neurotransmitere.

Kemijska struktura flavonoida kostur je od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena povezana heterocikličkim piranskim prstenom. Flavonoidi se mogu podijeliti u različite kategorije i strukturalna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture. Oko 90% flavonoida u biljkama nalazi se u obliku glikozida.



Slika 26. Osnovna kemijska struktura flavonoida

(<http://digre.pmf.unizg.hr/3324/1/SVEU%C4%8CILIC5%A0TE%20U%20ZAGREBU.pdf>)

U skupinu flavonoida ubrajamo antocijanidine, izoflavone, izoflavonole, aurone, flavone, flavonone, flavonole i dihidro-flavone (Berend i Grabarić, 2008.). Oni pripadaju skupini polifenolnih spojeva koji imaju različite terapijske učinke.

Najčešći flavonoidi u medu su: pinocembrin, apigenin, kamferol, kvercetin, galangin, krisin, binobanksin, luteolin, hesperidin (Petričko, 2015.).

U gotovo svakoj biljci pronađeni su flavonoli i u manjoj mjeri flavoni. Najpoznatiji flavonoli su apigenin i luteolin. Najvažniji izvori flavona su masline, peršin i celer. Najrašireniji flavonoli su kvercetin, kempferol i miricetin. Glavni izvor flavonola su luk, kelj, jabuke i crveno vino. Flavonoli i flavoni najčešće dolaze zajedno uglavnom u agrumima.

Antibakterijsko djelovanje flavonoida (apigenin, galangin, flavonski i flavonolski glikozidi, izoflavoni, flavanoni i kalnon) događa se na način da flavonoidi inhibiraju ionske kanale i metalo- enzime koji su zajednički i bakterijama i životinjskim stanicama. Njihovo antibakterijsko djelovanje može biti povezano i sa njihovom sposobnošću da inaktiviraju

mikrobne adhezije, enzime i transportne proteine stanične membrane stvaranjem kompleksa sa proteinima bakterija vodikovim, kovalentnim vezama i hidrofobnim učinkom.

Flavonoidi kao antioksidanti štite stanične membrane i organele od oštećenja uzrokovanih štetnim učincima reaktivnih kisikovih spojeva. Najveću sposobnost obrane od ROS-a imaju flavoni i katehini. Zahvaljujući visoko reaktivnim hidroksilnim skupinama flavonoidi mogu direktno reagirati sa slobodnim radikalima pri čemu nastaju manje reaktivni i stabilniji fenolni radikali. Flavonoidi (kvercetin) također mogu stvarati kelatne skupine s ionima metala (Fe). Naime, slobodni ioni metala formiraju reaktivne kisikove spojeve i tako reduciraju vodikov peroksid pri čemu nastaju visoko reaktivni hidroksilni radikali. Flavonoidi isto tako mogu međudjelovati i sa drugim fiziološkim antioksidantima kao što je vitamin C ili E a time se pojačava njihovo antioksidativno djelovanje (<http://digre.pmf.unizg.hr/3324/1/SVEU%C4%8CILIC5%A0TE%20U%20ZAGREBU.pdf>). Protuupalno djelovanje flavonoida djeluje na način da flavonoidi imaju sposobnost utjecati na različite stadije u ciklusu replikacije virusa a time ih zaustavljaju tj. inhibiraju.

Maksimalna količina polifenola u medu je 6000 µg/kg, dok je njihov udio puno veći u peludi i propolisu. Osim flavonoida med sadrži i određenu količinu fenolnih kiselina poput galne, kumarinske, kafeinske, elaginske i furelične skupa sa njihovim esterima (Vahčić i Matković, 2009.).

3.3.1.1.2.1. Galna kiselina

Galna kiselina polihidroksifenolna je sastavnica koja je široko rasprostranjena u različitim biljkama, voću i hrani. Galna je kiselina prisutna ili u slobodnom obliku ili kao sastavnica tanina (galotanini). Glavno djelovanje galne kiseline jest antitumorsko djelovanje.

Apoptoza inducirana galnom kiselinom povezana je s oksidativnim stresom uzrokovanim ROS-om, disfunkcijom mitohondrija i povišenom razinom unutarstaničnog Ca²⁺ (<http://digre.pmf.unizg.hr/5429/1/Diplomski%20rad-%20Josipa%20Dragun.pdf>).

3.3.10. Komponente arome

Količina aromatskih komponenata u proizvodu kao što je med, ovisi o količini hlapljivih organskih spojeva u medu te o prostoru oko njega. Aromatske komponente u medu su polifenoli (fenoli). Aromatski profil meda nije konstantan i on ovisi o botaničkoj preteče meda kao i načina skladištenja.

3.4. Fiziološki učinci meda

Med se od davnina smatrao ljekovitom vrstom hrane koja pridonosi dobrobiti ljudskog organizma (Mujić i sur.,2014.). On je ljekovita višenamjenska namirnica koja poboljšava stanje u organizmu.

3.4.1. Probavni trakt

Med poboljšava asimilaciju hrane, koristi kod kroničnih i infektivnih probavnih problema.

3.4.2. Dišni sustav

Med ima antiseptičko djelovanje zahvaljujući visokoj koncentraciji fruktoze i pomaže kao lijek prilikom prehlade, bolova u grlu i infekcija.

3.4.3. Koža

Med se u kozmetičkim preparatima koriste za tkivnu regeneraciju i smanjenje ožiljaka. Farmakološki preparati sa medom upotrebljavaju se direktno na otvorene rane, čireve, dekubituse, venskih proširenja i opekotina (Buljeta, 2015.).

3.4.4. Živčani sustav

Med sadrži visoku koncentraciju fosfora, željeza i eteričnih ulja. Fosfor u medu dolazi u najpogodnijem obliku i zbog toga on predstavlja odlično sredstvo za nadoknadu utrošenog fosfora u živčanim stanicama.

3.4.5. Antiseptičko djelovanje

Med ima visoko antibakterijsko djelovanje zahvaljujući svojem aciditetu (pH 3,5-5), visokoj koncentraciji šećera, vodik peroksidu, i proteinskim komponentama. Kiselost meda onemogućuje rast bakterija.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak diplomskog rada

Zadatak ovog diplomskog rada bio je odrediti na 73 uzorka meda različitog geografskog položaja i kemijskog sastava sadržaj vode, pH, električnu vodljivost, hidroksimetilfurfurol (HMF), sadržaj pepela, ukupni sadržaj polifenola i antioksidacijsku aktivnost.

3.2. MATERIJALI I METODE

Analizirano je 73 uzorka meda sa različitih geografskih područja (Hrvatska, Srbija, Mađarska, Bosna i Hercegovina i Slovenija) i sa različitim botaničkim izvorima. Refraktometrijski smo odredili sadržaj vode u medu, pH metrom pH, konduktometrijski električnu vodljivost u mS/cm, spektrofotometrijski hidroksimetilfurfurol (HMF), sadržaj pepela u medu, spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteuovim reagensom odredili smo ukupni sadržaj polifenola i metodom DPPH antioksidacijsku aktivnost meda za svaki uzorak zasebno.

3.2.3. Popis uzoraka

Tablica 5. Popis uzoraka

BROJ UZORKA	VRSTA MEDA	PROIZVOĐAČ	PODRUČJE
1.	livadni	Pčelarstvo Pislak-Bali	Slovenija
2.	livadni	Slobodan Jevtić	Srbija (Stari kostolac)
3.	šumski	Pčelarstvo Pislak-Bali	Slovenija
4.	medljikovac	Ivan Kolić	Ogulin
5.	šumski	OPG Kata Grgić	Vinkovci
6.	medljikovac	Ivan Mišković	Županija
7.	medljikovac	Slobodan Jevtić	Srbija (Stari kostolac)
8.	kesten	Pčelarstvo Pislak-Bali	Slovenija
9.	kesten	Mira Velturski	Daruvar
10.	kesten	Milan Maligec	Općina Jesenje (Krapinsko-zagorska županije)
11.	kesten	OPG Kata Grgić	Vinkovci
12.	kesten	Valerijan Tolić	Slavonski brod
13.	bagrem	Biserka Ivančić	Vinkovci
14.	bagrem	OPG Ana Surop	Čakovci
15.	bagrem	Ratko Mirkajlović	Slatina
16.	bagrem	Mira Velturski	Daruvar
17.	bagrem	Božo Đurđević	Garešnica
18.	bagrem	OPG Kata Grgić	Vinkovci
19.	bagrem	Andrija Volarić	Đurđevac

20.	bagrem	OPG Branko Slijepčević	Glina
21.	bagrem	József Dömötör	Mađarska (Nemesnadudvar)
22.	bagrem	Benjamin Gégény	Mađarska (Baja)
23.	bagrem	Slobodan Jevtić	Srbija (Stari kostolac)
24.	bagrem	Zoltán Tojzán	Mađarska (Pecsward)
25.	bagrem	Bukalo Nikola	Beli Manastir
26.	cvjetni	Sinaj Bulimbašić	Zadar
27.	cvjetni	Zoran Vazdar	Ernestinovo
28.	cvjetni	Dalibor Gici	Antunovac
29.	cvjetni	Josip Bazina	Antunovac
30.	cvjetni	Mira Velturski	Daruvar
31.	cvjetni	Niko Vezilić-Novaković	Konavle
32.	cvjetni	Marija Bojanović	Rijeka
33.	cvjetni	Ivica Modrić	Obrovac
34.	cvjetni	Jože Štimec	Slovenija (Osilnica)
35.	cvjetni	Miljenko Bušelić	Sjeverna strana Biokova
36.	cvjetni	Mate Bušelić	Makarska
37.	cvjetni	Stanko Čuljak	Cerić
38.	cvjetni-ljeto	Milan Crevar	Tenja
39.	cvjetni- proljeće	Milan Crevar	Tenja
40.	cvjetni	Predrag Krička	Tenja
41.	cvjetni	Marin Jelinić	Benkovac
42.	cvjetni	Željko Bulog	Vrgorac (Kokorić)
43.	cvjetni	OPG Branko Slijepčević	Glina
44.	cvjetni	Milenko Omazić	Osijek
45.	cvjetni	Darko Ham	Aljmaš
46.	cvjetni (Pavitina)	József Dömötör	Mađarska (Nemesnadudvar)
47.	cvjetni	Zlatko Crnčan	Josipovac
48.	cvjetni	Ivica Butić	Škabrnja
49.	cvjetni	Zlatko Đukić	Petrinja
50.	cvjetni	Ivan Mazur	Orlonjak (pustara Tenje)
51.	cvjetni	Petar Bošnjaković	Vukovar
52.	cvjetni	Valerijan Tolić	Slavonski brod
53.	cvjetni	Enes Mujčin	Bosna i Hercegovina (Kolibe Gornje)
54.	suncokret	Domagoj Trampus	Bijelo brdo (Mišino brdo)
55.	suncokret	Dániel Vadas	Mađarska
56.	suncokret	Jakim Rac	Srbija (Ruski krstur-Kula)
57.	suncokret	Bukalo Nikola	Beli Manastir

(kristalizirani)			
58.	suncokret (nekristalizirani)	Bukalo Nikola	Beli Manastir
59.	amorfa	Juraj Cvetičanin	Greda
60.	vrijesak	OPG Stijepo Radić	Kučišće
61.	kadulja	Mate Šimčević	Zadar
62.	kadulja	Nikica Pehar	Jelsa
63.	drača	Mate Šimčević	Zadar
64.	drača	Juraj Rubin	Jelsa
65.	lipa	Milan Kos	Kostajevac (Garešnica)
66.	lipa	Ivan Šoštarić	Rogoža (podnožje Male gorice)
67.	lipa	Szabados Miklós	Mađarska (Batmonostor)
68.	lipa	Slobodan Jevtić	Srbija (Stari kostolac)
69.	lipa	Zoltán Tojzán	Mađarska (Pecsvar)
70.	mandarina	Ivan Bašić	Dubrava (Splitsko- dalmatinska županija)
71.	lavanda	Nevena Pehar	Jelsa
72.	svilenica	József Dömötör	Mađarska (Nemesnadudvar)
73.	medvjedi luk	Zoltán Tojzán	Mađarska (Pecsvar)



Slika 27. Naša 73 uzorka spremna na analizu

3.3. Refraktometrijsko određivanje sadržaja vode u medu digitalnim refraktometrom



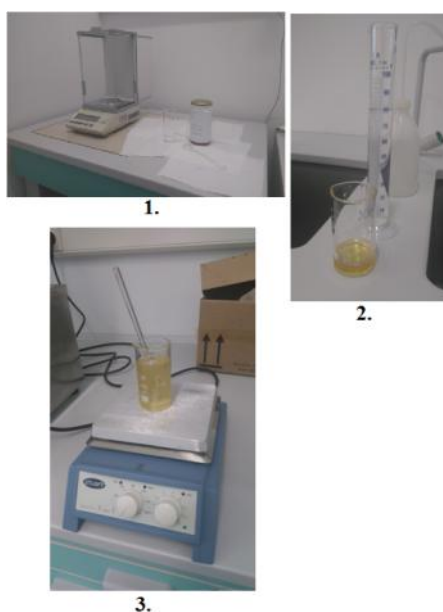
Slika 28. Mjerenje udjela vode u medu

(<http://www.pcelarstvo.hr/index.php/radovi/pcelarska-radionica/94-odredivanje-vlage-u-medu>)

3.4. Priprema uzoraka na određivanje prve grupe parametara (HMF, električna vodljivost, pH, udio pepela)

3.4.1. Priprema uzoraka (za sve parametre je priprema uzorka ista)

1. Izvagali smo 20 g meda
2. Izvagani uzorak meda otopili smo do pola u 80 ml destiliranom vodom
3. 20g meda i 80 ml destilirane vode otopi se uz pomoć miješalice (3000 okretaja/ minuti) i staklenog štapića (Slika 29.)



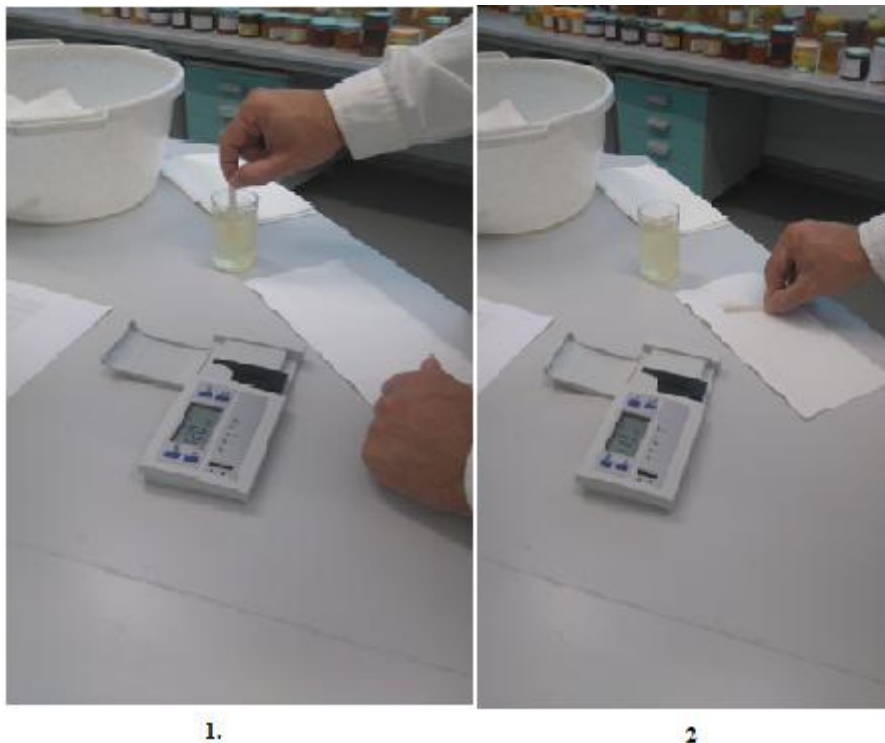
Slika 29. Priprema uzoraka za analizu

3.4.2. Mjerenje hidroksimetilfurfurata (HMF, mg/kg)

- HMF parametar koji nam ukazuje na kvalitetu i nutritivnu vrijednost meda
- HMF je faktor koji nastaje kao posljedica zagrijavanja meda tj. dehidracije šećera
- HMF je nepoželjan u medu jer mu daje specifičan ukus i kancerogen je
- HMF se određuje na RQfleX 10 uređaju uz pomoć trakica (hladnjak).

Mjerenje HMF-a:

1. Trakica se uroni u razrijeđeni med na 10 sekundi
2. Trakica se malo ocijedi na ubrusu te se stavlja na očitavanje. Rezultat se očitava zadnjih 10 sekundi (Slika 30.).



Slika 30. Mjerenje HMF-a

HMF se izračunava:

npr. $HMF = 1,2 \times 4 / 1,4 = 3,43 \text{ mg/kg}$

3.4.3 Mjerenje električne vodljivosti

- Električna vodljivost dobar je pokazatelj o samom porijeklu meda (medljikovac- livadni med)
- Električna vodljivost linearno je zavisna od količine pepela pa se na taj način i izračunava.

Mjerenje električne vodljivosti:

1. Električnu vodljivost mjerili smo uređajem Mettler Toledo, na način da se u razrijeđeni med uroni čitat i stisne se READ. Rezultat se pokaže na digitalnom ekranu čitača (Slika 31.)



Slika 31. Mjerenje električne vodljivosti

Izračunavanje električne vodljivosti:

npr. $511\mu\text{S po cm} / 1000 = 0,511$

3.4.4. Mjerenje pH vrijednosti

- Med je relativno kiseli proizvod. Prosječan pH meda je između 3,2 – 4,5.
- Kiselost meda uzrok je organskih kiselina koje se nalaze unutar njega (glukonska, mravlja, octena, limunska, mliječna)
- Kiselost meda jedan je od ključnih parametara njegovog antibakterijskog svojstva
- pH meda mjeri se pH metrom M. Tollo (Five Easy. FE20/EL20). Čitač pH metra drži se u otopini KCL- a.

Mjerenje pH:

1. Prije svakog korištenja čitač se opere destiliranom vodom i uranja se u razrijeđenu otopinu meda. Stisne se READ i očitava rezultat (Slika 32.)



Slika 32. Mjerenje pH meda

3.4.5. Određivanje sadržaja pepela

Sadržaj pepela izračunava se prema formuli :

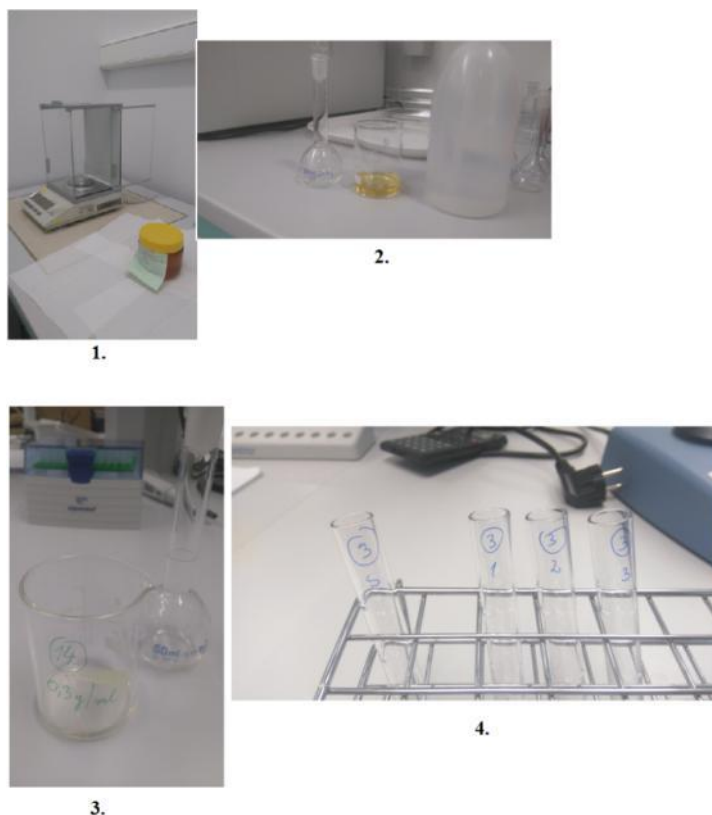
(Električna vodljivost) 0,14 / 1,74

3.5. Određivanje ukupnih fenola FOLIN- CIOCALTEU METODOM

Ukupni fenoli određuju semodificiranol Folin- Ciocalteu metodom na način da se Folin-Ciocalteu reagens , koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, u reakciji s fenolnim komponentama reducira i promjeni svoju prirodno žutu boju (med) u plavu boju. Intenzitet plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih komponenti, a promjena boje prati se pri valnoj duljini od 745- 765 nm. Ovako dobiveni rezultat predstavlja redukcijsku sposobnost uzorka, unatoč nekim nefenolnim komponentama mogu reducirati reagens ali samo u određenim uvjetima.

3.5.1. Priprema uzoraka za određivanje ukupnih fenola

1. Izvažemo 15 g meda
2. Izvagani uzorak otopimo u malo destilirane vode, te ga presipamo u tikvicu od 50 ml te na dosipamo destilirane vode do oznake
3. Uzorak iz tikvice presipamo u označenu čašicu 0,3g/ ml
4. Pripremimo epruvete za ukupne fenole. Broj uzorka na svaku epruvetu, **OBAVEZNO!** (Slika 33.)



Slika 33. Priprema uzorka za određivanje ukupnih fenola

3.5.2. Postupak rada

1. U epruvete označene kao probe dodali smo 0,1 ml (100 μ l) 0,3g/ml razrijeđenog uzorka
2. Nakon toga u probe sa uzorkom dodajemo 1ml F-C reagensa (10%)
 - U epruvetu za slijepu probu dodajemo 1ml F-C reagensa i 0,1 ml destilirane vode
 - Sve epruvete promiješamo na vorteksu (1400 okretaja/minuti)
3. U sve epruvete mikropipetom dodamo 1ml Na₂CO₃ (7,5%)
4. Mjerenje se vrši na spektrofotometru na valnoj duljini od 750 nm nakon što su epruvete stajale 30 min na tamnom mjestu (Slika 34.)



Slika 34. Postupak rada F-C metodom

Koncentracija ukupnih fenola izračunava se pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline, a rezultati su izraženi kao mg galne kiseline/ kg meda.

3.5.2.1. Postupak dobivanja apsorbance za Galnu kiseline

Napravili smo deset razrjeđenja Galne kiseline kao i destilirane vode. Svakoj epruveti smo dodali 1m F-C reagens promiješali, te potom dodali 1ml Na₂CO₃. Uzorci su stajali 30 minuta nakon čega smo absorbance očitali spektrofotometrijski na 750 nm.

Tablica 6. Postupak dobivanja absorbance Galne kiseline

Galna kiselina	Destilirana voda (μ l)	Proba 1. (absorbanca)	Proba 2. (apsorbanca)	Prosjek (apsorbanca)
0,02	100 + 900	0,126	0,127	0,126
0,04	200 + 800	0,246	0,242	0,244
0,06	300 + 700	0,361	0,355	0,358
0,08	400 + 600	0,461	0,473	0,467
0,10	500 + 500	0,569	0,566	0,567
0,12	600 + 400	0,681	0,693	0,687
0,14	700 + 300	0,778	0,781	0,779
0,16	800 + 200	0,888	0,888	0,888
0,18	900 + 100	0,982	0,983	0,982
0,20	1000 + 0	1,077	1,083	1,080

Kada smo izmjerili apsorbancu uzoraka radimo sljedeće kako bi dobili x os na grafu:

Npr. Uzorak 1.

Slijepa proba = 0,001

Epruveta 1 = 0,552

Epruveta 2 = 0,577

Epruveta 3 = 0,564

Epruveta 1 + Epruveta 2 + Epruveta 3 / 3 = 0,564 – 0,001 = 0,563

Y = 5,2945x + 0,0352

0,563 = 5,2945x + 0,0352

- 5,2945x = - 0,563 + 0,0352

x = - 0,528 / (-5,2945)

x = 0,099

3.6. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH METODOM

Metoda se temelji na reakciji DPPH (2,2- difenil-1-pikril-hidrazil) koji je jedan od rijetkih dušikovih radikala (slobodni radikal) u stabilnom obliku i donora vodika (npr. fenolna skupina). On se u reakciji sa antioksidantima reducira u hidrazin pri čemu se mijenja boja iz ljubičaste u žutu. Mjeri se promjena apsorbancije (redukcija DPPH radikala) pri 517 nm, spektrofotometrijski. Rezultat mjerenja izražava se preko postotka DPPH radikala na sljedeći način:

$$\text{Preostali DPPH (\%)} = 100 \times \frac{^{(\text{DPPH})}_{\text{preostali}}}{^{(\text{DPPH})}_{T=0}}$$

Rezultat je proporcionalan koncentraciji antioksidanata, dok se sam antioksidativni kapacitet izražava preko IC_{50} . IC_{50} predstavlja onu koncentraciju antioksidanata potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH za 50%. Veće IC_{50} vrijednosti predstavljaju manji antioksidativni kapacitet tako da je to nedostatak ovakvog načina izražavanja.

3.6.1. Izrada DPPH reagensa

1. Izvaži se 4g DPPH u prahu
2. DPPH otopi se u odmjernoj tikvici od 100 ml sa 96% etanolom i presipa u dozator (Slika 35.)



1.

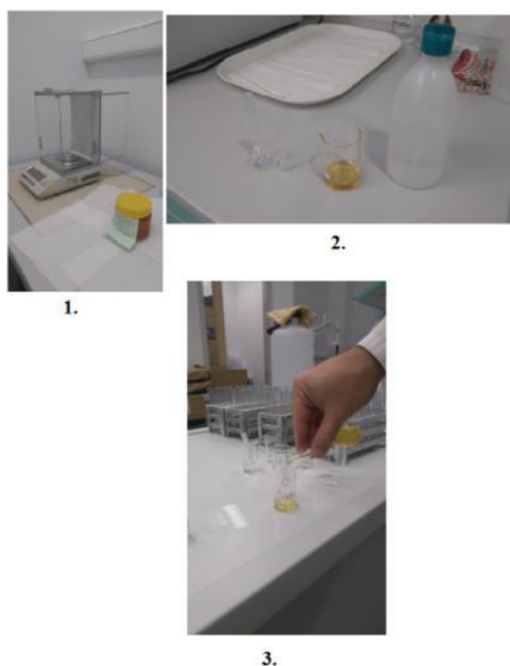


2.

Slika 35. Izrada DPPH reagensa

3.6.2. Priprema uzoraka

1. Izvaže se 15 g meda
2. Uzorak otopimo u malo destilirane vode te ga usipamo u tikvicu od 25ml. Sipamo destilirane vode do oznake na tikvici gledajući doljnji meniskus
3. Uzorak iz tikvice presipamo u označenu čašicu 0,6 g/ml (Slika 36.)



Slika 36. Priprema uzoraka za DPPH metodu

4. Označimo male ependorfice sa razrjeđenjima: 30, 60, 100, 200, 300, 400, 500, 600 (Tablica 6.)

Tablica 7. Razrjeđenja

30	60	100	200	300	400	500	600
50 μ l uzorka 0,6g/ml	100 μ l uzorka 0,6g/ml	167 μ l uzorka 0,6g/ml	333 μ l uzorka 0,6g/ml	500 uzorka 0,6g/ml	667 μ l uzorka 0,6g/ml	833 uzorka 0,6g/ml	1ml uzorka 0,6g/ml 1
950 μ l destiliran e vode	900 μ l destiliran e vode	833 μ l destiliran e vode	667 μ l destiliran e vode	500 μ l destiliran e vode	333 μ l destiliran e vode	334 μ l destiliran e vode	0

3.6.3. Postupak rada

1. Ependorfice izmiješamo na vorteksu i pipetiramo u označene epruvete
2. Označavanje epruveta. Broj uzorka na svaku epruvetu, OBAVEZNO!
3. Razrijeđene uzorke iz ependorfica pipetiramo 0,1 ml (100 μ l) uzorka u identično označene epruvete. U A_0 umjesto uzorka pipetiramo 0,1ml destilirane vode
4. U sve epruvete i A_0 pipetiramo 1ml (1000 μ l) acetatnog pufera (pH 5,5)
5. U osam epruveta označenima kao probe dodajemo 1,9 ml etanola
6. U epruvete označene kao probe i u A_0 dodamo 1,9 DPPH (130mM) otopljenog u etanolu
7. Uzorci se ostave 90 minuta na tamnom mjesto. Nakon 90 minuta uzorci se mjere na spektrofotometru na 517 nm (Slika 37.)

Tablica 8. Oznake na epruvetama

8 epruveta	8 epruveta	A_0
30	30 slijepa proba	
60	60 slijepa proba	
100	100 slijepa proba	
200	200 slijepa proba	
300	300 slijepa proba	
400	400 slijepa proba	
500	500 slijepa proba	
600	600 slijepa proba	

Dakle, iz polaznih otopina meda pripravljena su razrjeđenja. U alikvotni dio svakog razrjeđenja dodan je natrijev acetatni pufer i DPPH reagens. Usporedno za svaku otopinu priređena je slijepa proba koja je sadržavala otopinu meda iste koncentracije i natrijev acetatni pufer bez DPPH reagensa kako bi se eliminirao utjecaj boje. Pripremljenim se otopinama nakon stajanja na sobnoj temperaturi i tami mjerila absorbanca (fotometrijski). Nakon toga računala sam IC_{50} svakog uzorka posebno.

Primjer: UZORAK 1.

A ₀	0,693		
Razrjeđenje	Proba	Slijepa proba	Rezultat
30	0,688	0,001	0,687
60	0,675	0,002	0,673
100	0,645	0,003	0,642
200	0,580	0,009	0,571
300	0,507	0,017	0,490
400	0,451	0,025	0,426
500	0,380	0,034	0,346
600	0,311	0,042	0,269

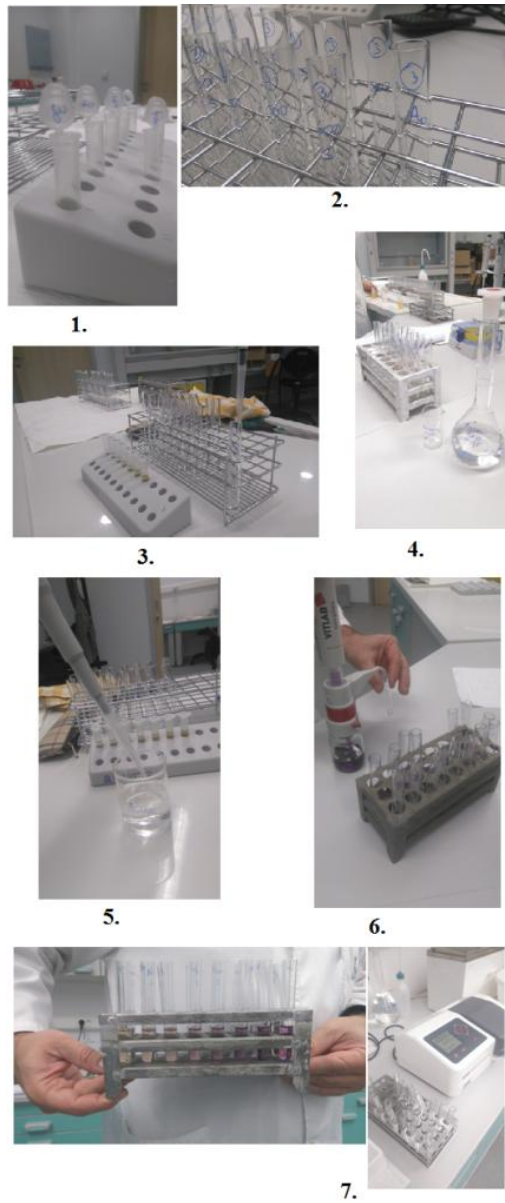
Proba- slijepa proba = rezultat

Npr. $0,688 - 0,001 = 0,687$

IC₅₀ računa se na način da A₀ podijelimo sa dva i dobijemo 50 % ukupne vrijednosti tj. mg galne kiseline i kg meda pri određenom razrjeđenju.

Npr. $0,693 / 2 = 0,347$

IC₅₀ = 0,347



Slika 37. Postupak rada DPPH metodom

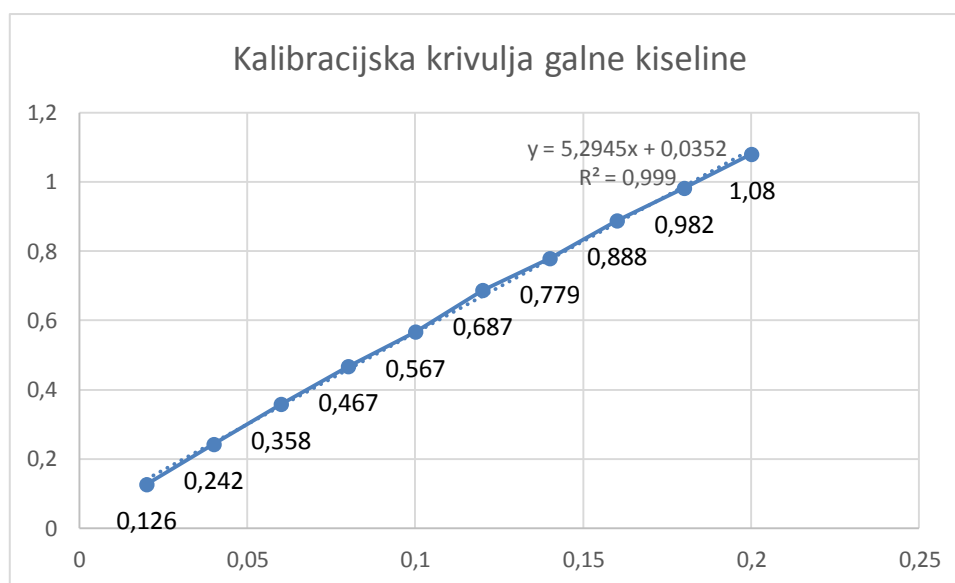
4. REZULTATI

Tablica 9. Određeni fizikalno- kemijski parametri ispitivanih uzoraka

UZORAK	SADRŽAJ VODE (%)	pH	ELEKTRIČNA VODLJIVOST (mS/cm)	HMF (mg/kg)	Sadržaj pepela (%)
U1	14,8	4,16	0,409	6,57	0,155
U2	16,7	3,70	0,617	6,86	0,274
U3	14,3	4,56	0,928	0	0,848
U4	16,3	4,73	1,053	0	0,525
U5	15,7	5,58	2,430	0	1,316
U6	15,2	4,75	1,537	4	0,803
U7	15,8	4,72	1,406	37,14	0,728
U8	14,9	4,80	1,305	2,57	1,225
U9	16,9	4,72	1,458	0	0,757
U10	15,3	4,12	0,830	0	0,397
U11	17,4	4,96	1,367	7,71	0,705
U12	17,8	4,94	1,942	0	1,036
U13	17,9	3,59	0,158	2,29	0,078
U14	19,9	3,47	0,175	0	0,020
U15	18,4	3,71	0,133	5,71	0
U16	16,8	3,49	0,234	3,71	0,054
U17	15,5	3,87	0,117	0	0
U18	16,1	3,84	0,145	0	0,003
U19	14,3	3,71	0,242	3,43	0,059
U20	16,4	3,68	0,305	0	0,095
U21	19,2	3,26	0,189	0	0,028
U22	18,3	3,69	0,142	0	0,001
U23	19,7	3,62	0,173	3,43	0,019
U24	14,7	3,53	0,190	0	0,029
U25	14,5	3,96	0,276	12,50	0,195
U26	18,5	4,02	0,689	6,29	0,316
U27	15,9	3,72	0,383	12,57	0,140
U28	17,2	3,95	0,364	10,29	0,129
U29	18,7	3,96	0,356	6,50	0,124
U30	15,4	3,55	0,255	8,86	0,066
U31	16,8	4,19	0,860	11,14	0,414
U32	16,5	4,03	0,820	7,71	0,391
U33	16,3	5,05	0,944	0	0,462
U34	17,6	4,11	0,855	3,14	0,411
U35	16,5	4,07	0,817	4,86	0,389
U36	17,5	4,41	0,978	0	0,482
U37	16,7	3,68	0,582	4,57	0,254

U38	17,6	3,81	0,621	4,86	0,276
U39	18,8	3,73	0,278	25,14	0,079
U40	18,9	3,72	0,275	24,30	0,070
U41	16,0	4,48	0,650	4,86	0,293
U42	16,1	4,42	1,153	4,00	0,582
U43	17,6	3,79	0,808	0	0,384
U44	18,5	3,73	0,739	2,86	0,344
U45	17,7	3,49	0,455	0	0,181
U46	21,1	3,29	0,311	0	0,098
U47	16,9	4,03	0,821	0	0,391
U48	16,1	4,90	0,750	0	0,351
U49	18,4	3,43	0,402	2,86	0,151
U50	20,3	3,69	0,563	2,86	0,243
U51	18,6	3,77	0,570	7,71	0,247
U52	17,5	4,21	0,463	5,71	0,186
U53	17,6	3,57	0,423	6,00	0,167
U54	18,8	3,44	0,511	3,43	0,213
U55	16,3	3,59	0,381	0	0,139
U56	17,5	3,62	0,332	3,14	0,11
U57	15,1	3,54	0,399	8,57	0,318
U58	16,0	3,56	0,407	9,64	0,326
U59	15,7	4,05	0,521	4,86	0,219
U60	17,0	4,25	0,806	16,00	0,383
U61	15,8	3,93	0,558	8,29	0,240
U62	16,5	4,10	0,638	24,57	0,286
U63	15,9	5,79	1,072	0	0,536
U64	16,0	4,16	0,799	20,00	0,379
U65	18,6	3,86	0,651	0	0,294
U66	17,7	4,19	0,842	0	0,403
U67	16,4	3,89	0,428	14,9	0,166
U68	15,8	4,77	0,773	0	0,364
U69	16,0	4,33	0,705	2,86	0,325
U70	16,8	4,19	0,329	0	0,109
U71	15,7	3,73	0,578	14,29	0,252
U72	18,1	3,35	0,219	0	0,045
U73	16,5	4,01	0,341	4,29	0,116
PROSJEK	16,9	4,03	0,633	5,19	0,304
MIN - MAX	14,3 - 21,1	3,26 - 5,58	0,117 - 1,942	0 - 37,14	0 - 1,316

Graf 1. Kalibracijska krivulja Galne kiseline



Tablica 10. Određivanje x osi uzoraka na grafu, kao mg Galne kiseline u kg meda

Uzorak	Apsorbanca (y)	mg Galne kiseline/ kg meda (x)
U1	0,563	0,099
U2	0,871	0,158
U3	0,607	0,108
U4	0,782	0,119
U5	1,141	0,209
U6	1,038	0,189
U7	1,474	0,272
U8	0,719	0,129
U9	0,706	0,127
U10	0,535	0,094
U11	0,985	0,179
U12	1,001	0,182
U13	0,272	0,045
U14	0,278	0,046
U15	0,250	0,040
U16	0,329	0,055
U17	0,196	0,030

U18	0,258	0,042
U19	0,374	0,064
U20	0,505	0,089
U21	0,284	0,047
U22	0,263	0,043
U23	0,290	0,048
U24	0,357	0,060
U25	0,498	0,087
U26	0,925	0,168
U27	0,760	0,137
U28	0,585	0,104
U29	0,567	0,100
U30	0,406	0,070
U31	0,815	0,147
U32	0,780	0,140
U33	0,823	0,149
U34	0,814	0,147
U35	0,864	0,156
U36	0,676	0,121
U37	0,611	0,109
U38	0,942	0,171
U39	0,692	0,124
U40	0,649	0,116
U41	0,689	0,123
U42	1,012	0,184
U43	0,707	0,127
U44	0,855	0,155
U45	0,536	0,094
U46	0,651	0,116
U47	0,791	0,143
U48	0,749	0,135
U49	0,544	0,096
U50	0,709	0,127
U51	0,693	0,124
U52	0,710	0,127

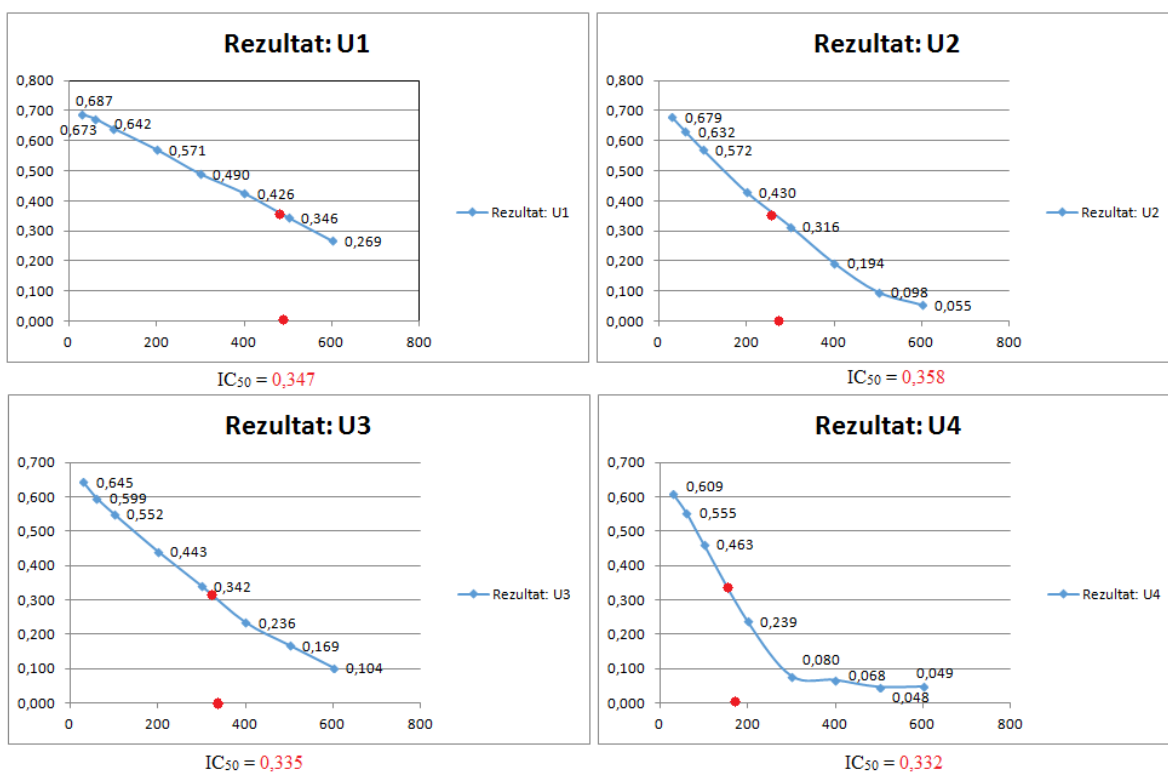
U53	0,542	0,095
U54	0,503	0,088
U55	0,463	0,080
U56	0,377	0,064
U57	0,455	0,080
U58	0,475	0,083
U59	0,689	0,123
U60	1,186	0,217
U61	0,881	0,160
U62	0,956	0,174
U63	0,877	0,159
U64	1,090	0,199
U65	0,467	0,081
U66	0,563	0,099
U67	0,475	0,083
U68	0,407	0,070
U69	0,468	0,081
U70	0,529	0,093
U71	0,881	0,159
U72	0,366	0,062
U73	0,555	0,098
MIN - MAX	0,196 – 1,474	0,030 – 0,272

Tablica 11. Rezultati IC₅₀ svih uzoraka

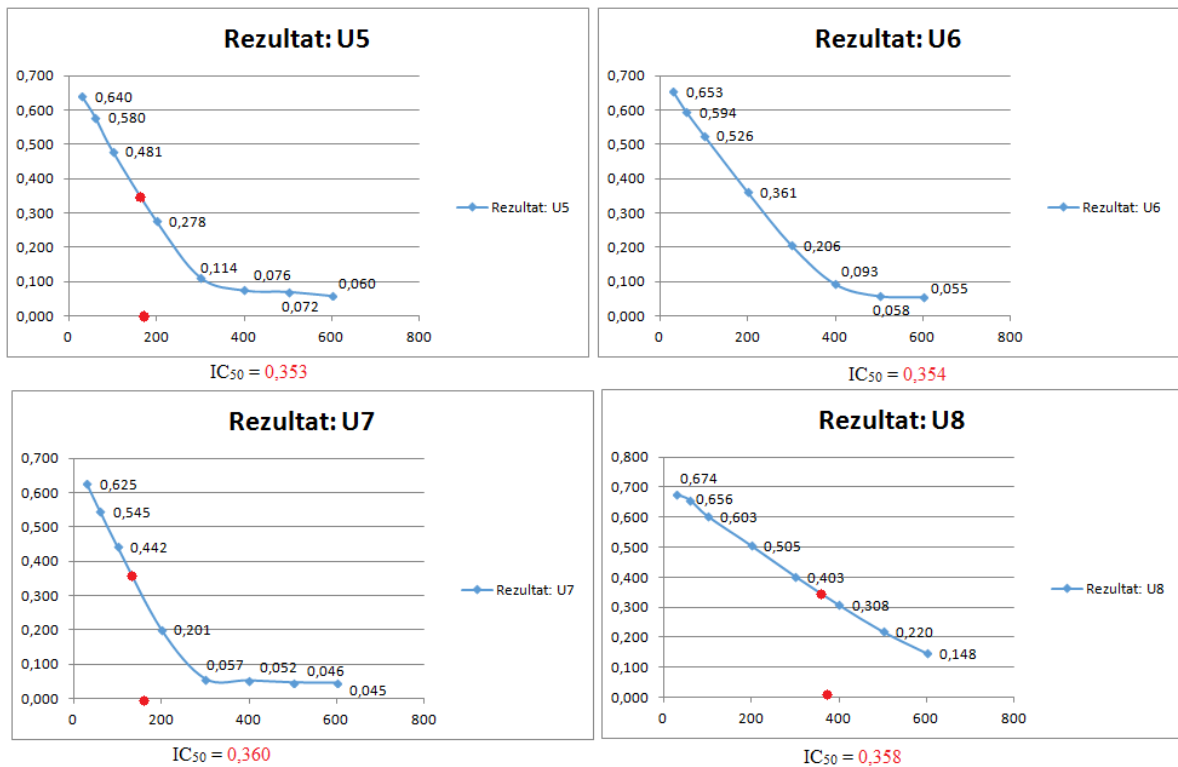
Uzorak	A ₀	IC ₅₀ (mg/ml)
U1	0,693	0,347
U2	0,716	0,358
U3	0,670	0,335
U4	0,664	0,332
U5	0,706	0,353
U6	0,708	0,354
U7	0,720	0,360
U8	0,716	0,358
U9	0,680	0,340
U10	0,680	0,340
U11	0,702	0,351
U12	0,717	0,358
U13	0,708	/
U14	0,680	/
U15	0,681	/
U16	0,669	/
U17	0,669	/
U18	0,714	/
U19	0,706	/
U20	0,723	/
U21	0,707	/
U22	0,697	/
U23	0,720	/
U24	0,720	/
U25	0,684	/
U26	0,707	0,353
U27	0,675	0,337
U28	0,668	0,334
U29	0,671	0,335
U30	0,666	/
U31	0,665	0,332

U32	0,668	0,334
U33	0,683	0,341
U34	0,674	0,337
U35	0,676	0,338
U36	0,666	0,333
U37	0,710	0,355
U38	0,697	0,348
U39	0,695	0,347
U40	0,694	0,347
U41	0,698	0,349
U42	0,709	0,354
U43	0,704	0,352
U44	0,711	0,355
U45	0,714	0,357
U46	0,699	0,349
U47	0,735	0,367
U48	0,726	0,363
U49	0,734	0,367
U50	0,719	0,359
U51	0,725	0,362
U52	0,715	0,357
U53	0,710	/
U54	0,680	0,340
U55	0,715	/
U56	0,713	/
U57	0,684	0,342
U58	0,684	0,342
U59	0,681	0,340
U60	0,683	0,341
U61	0,672	0,336
U62	0,704	0,352
U63	0,671	0,335
U64	0,696	0,348
U65	0,681	0,340
U66	0,707	0,353

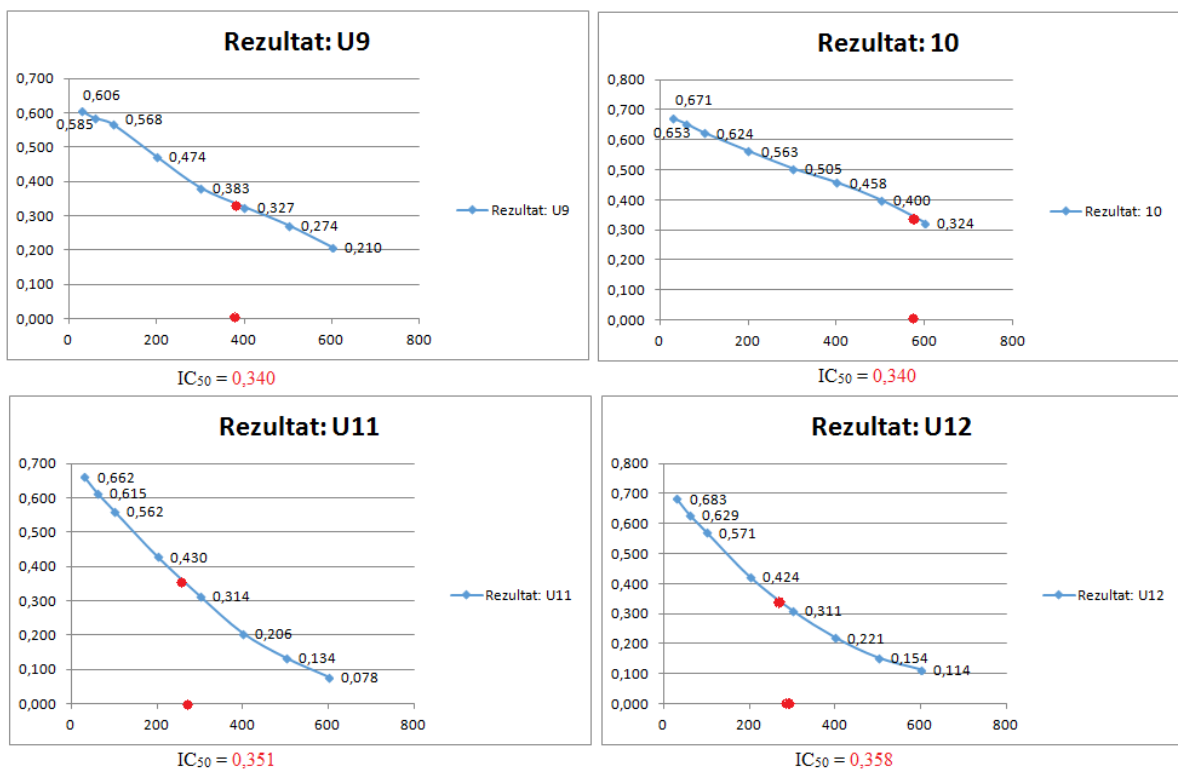
U67	0,698	0,349
U68	0,724	/
U69	0,715	/
U70	0,663	/
U71	0,706	0,353
U72	0,724	/
U73	0,720	0,360
MIN - MAX	0,663 – 0,735	0,332 – 0,367



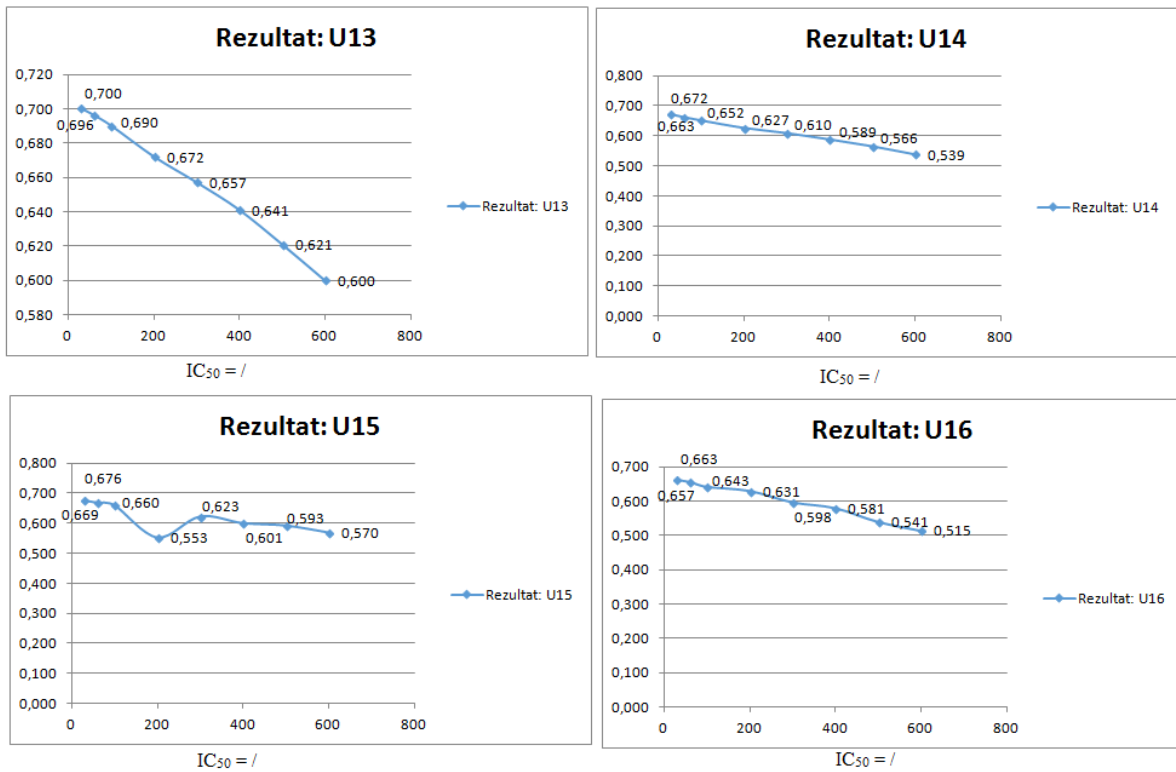
Slika 38. Rezultati IC_{50} od uzorka 1. do 4.



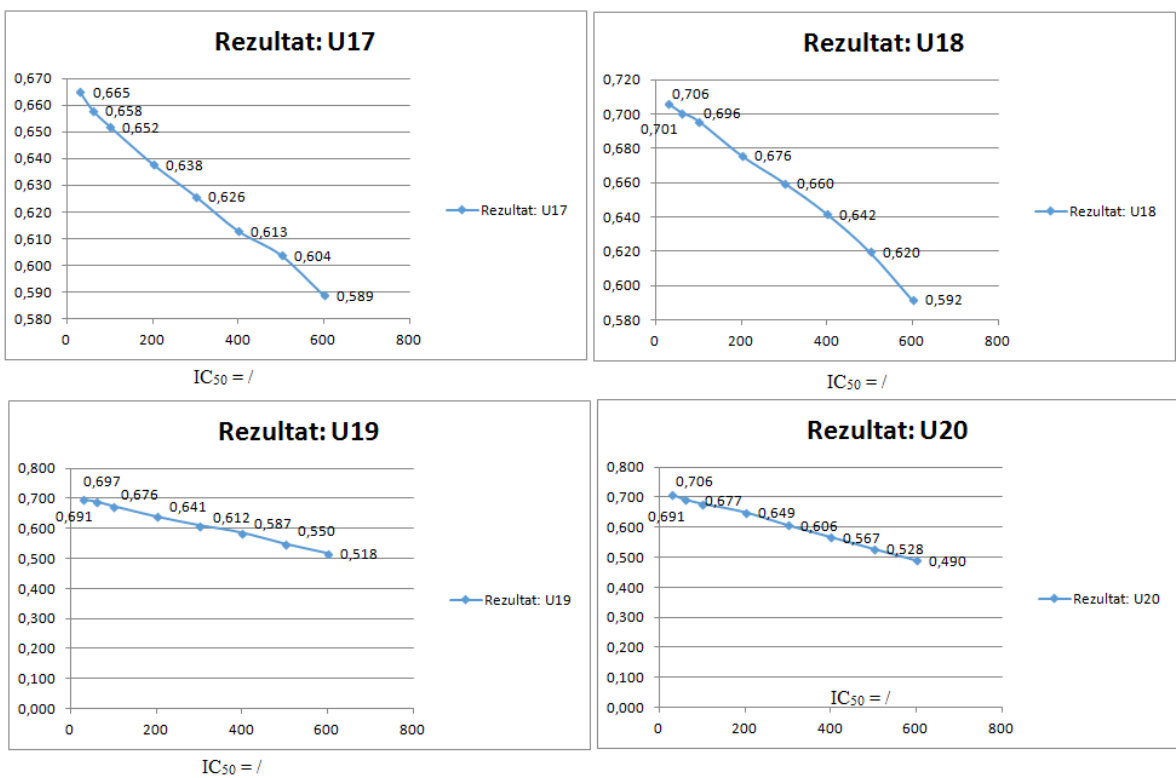
Slika 39. Rezultati IC_{50} od uzorka 5. do 8.



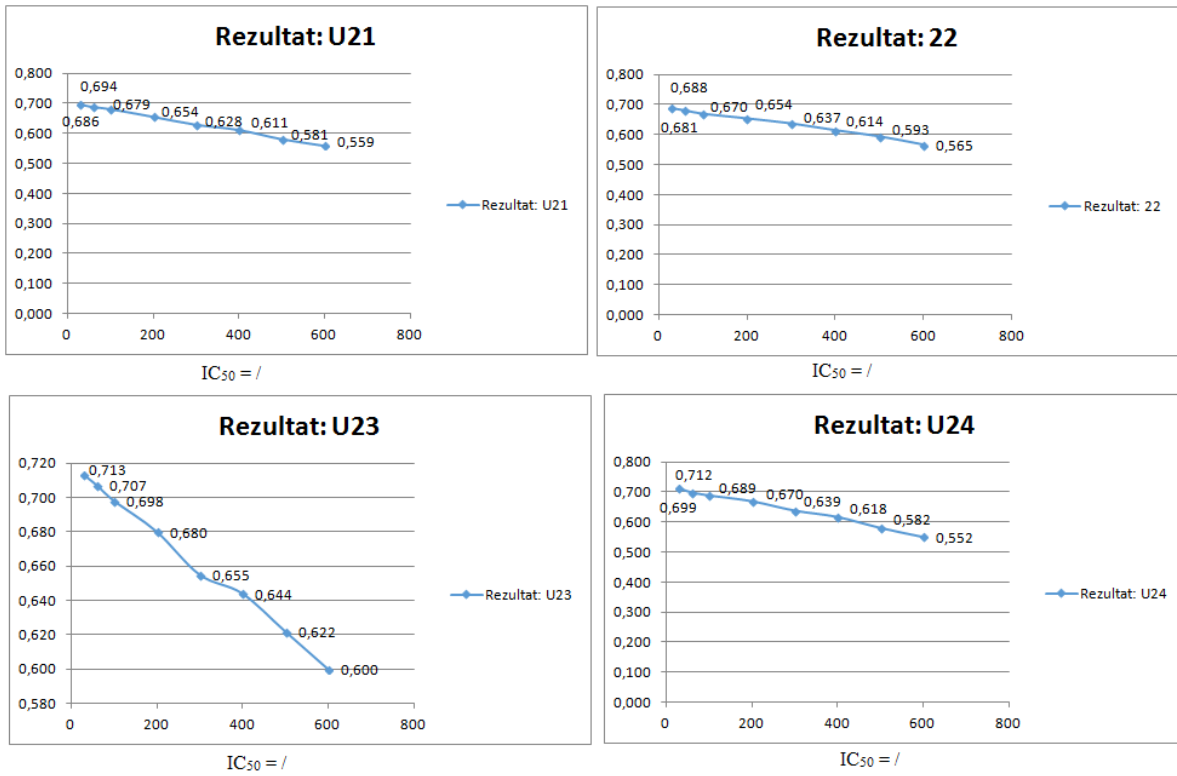
Slika 40. Rezultati IC_{50} od uzorka 9. do 12.



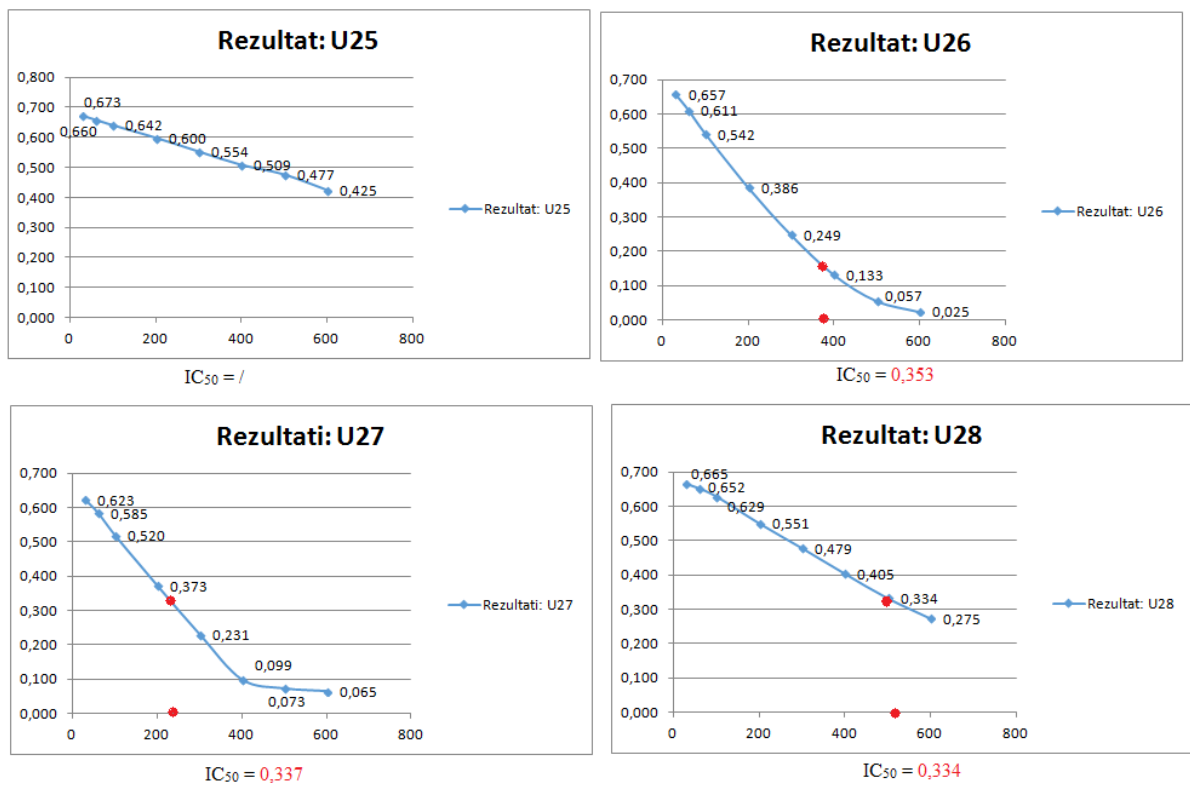
Slika 41. Rezultati IC₅₀ od uzorka 13. do 16.



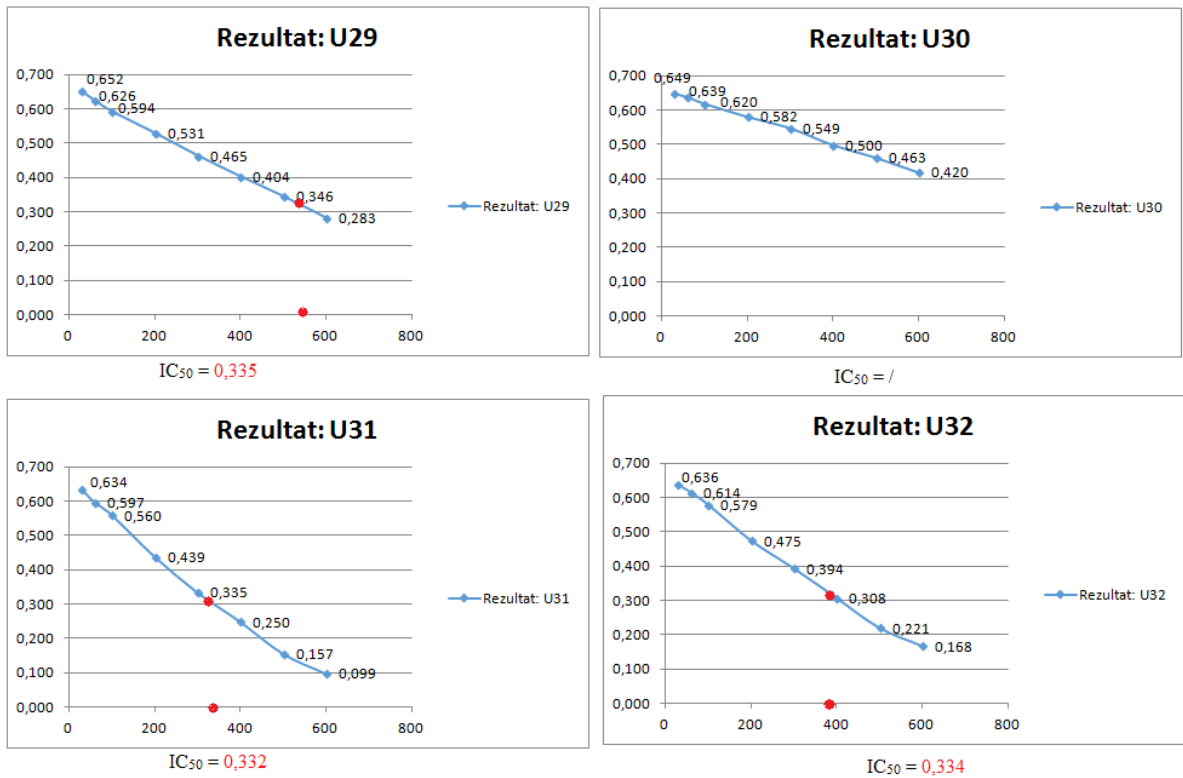
Slika 42. Rezultati IC₅₀ od uzorka 17. do 20.



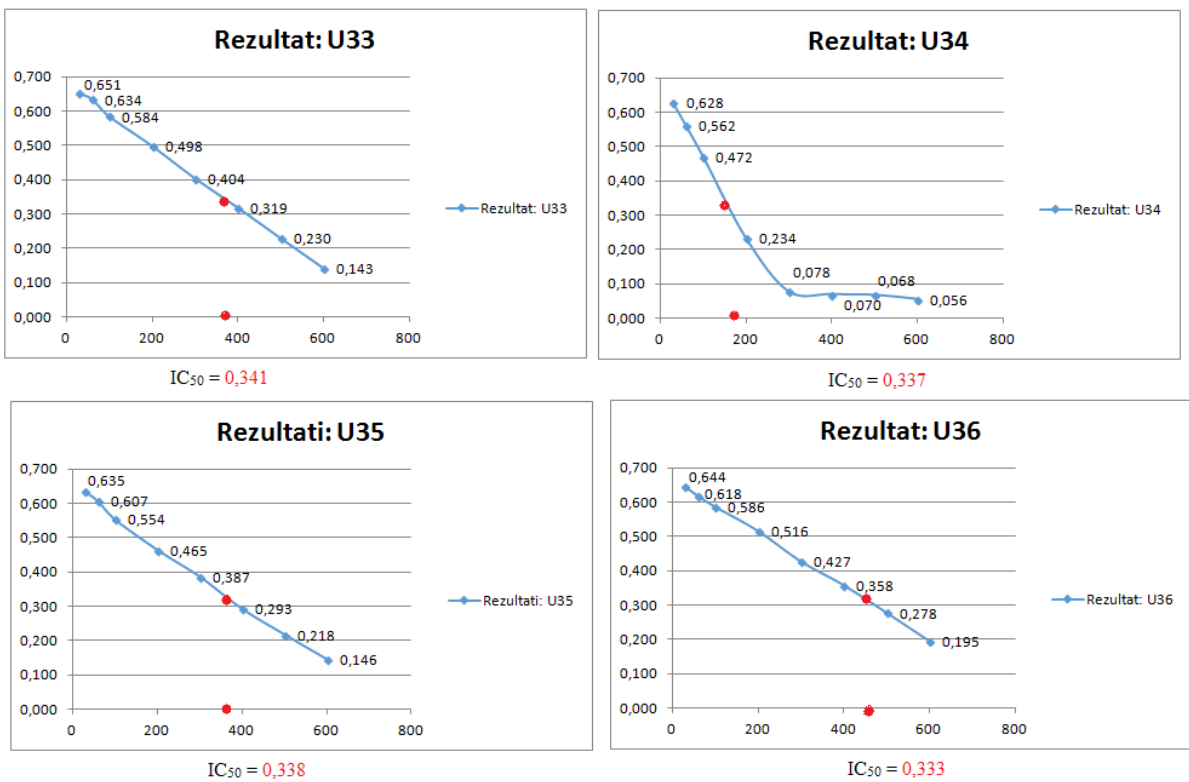
Slika 43. Rezultati IC₅₀ od uzorka 21. do 24.



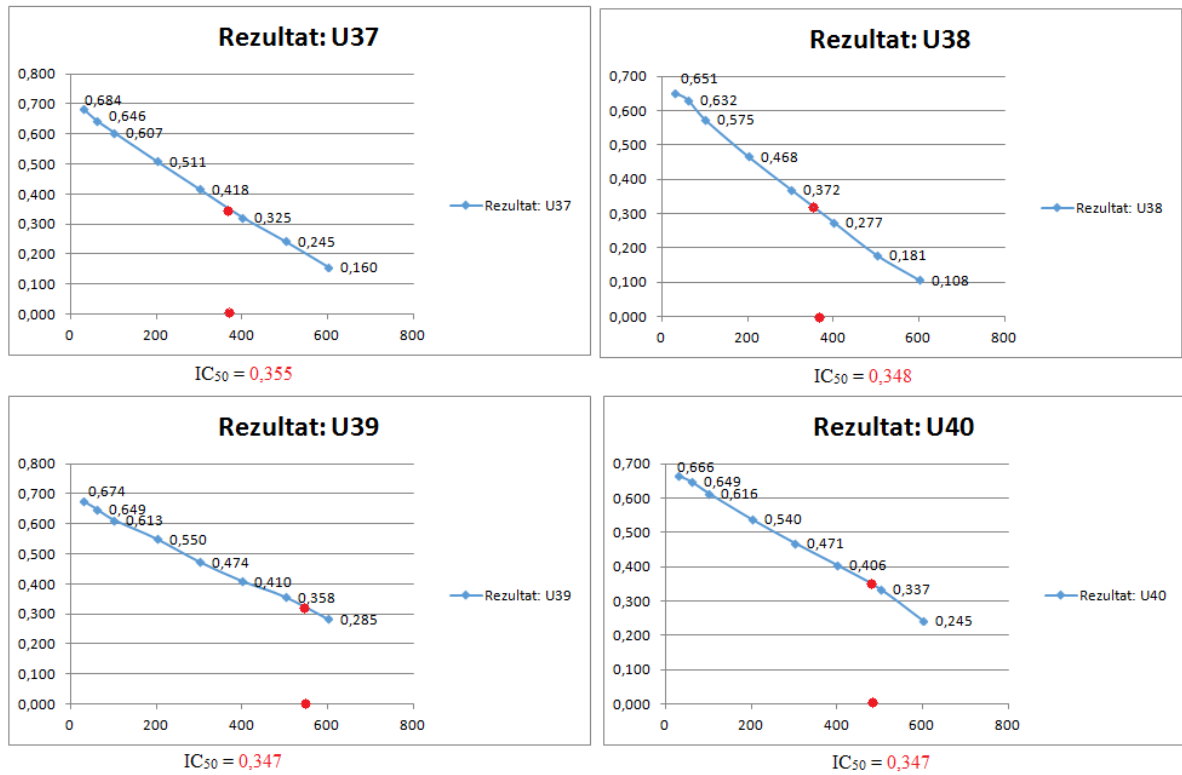
Slika 44. Rezultati IC₅₀ od uzorka 25. do 28.



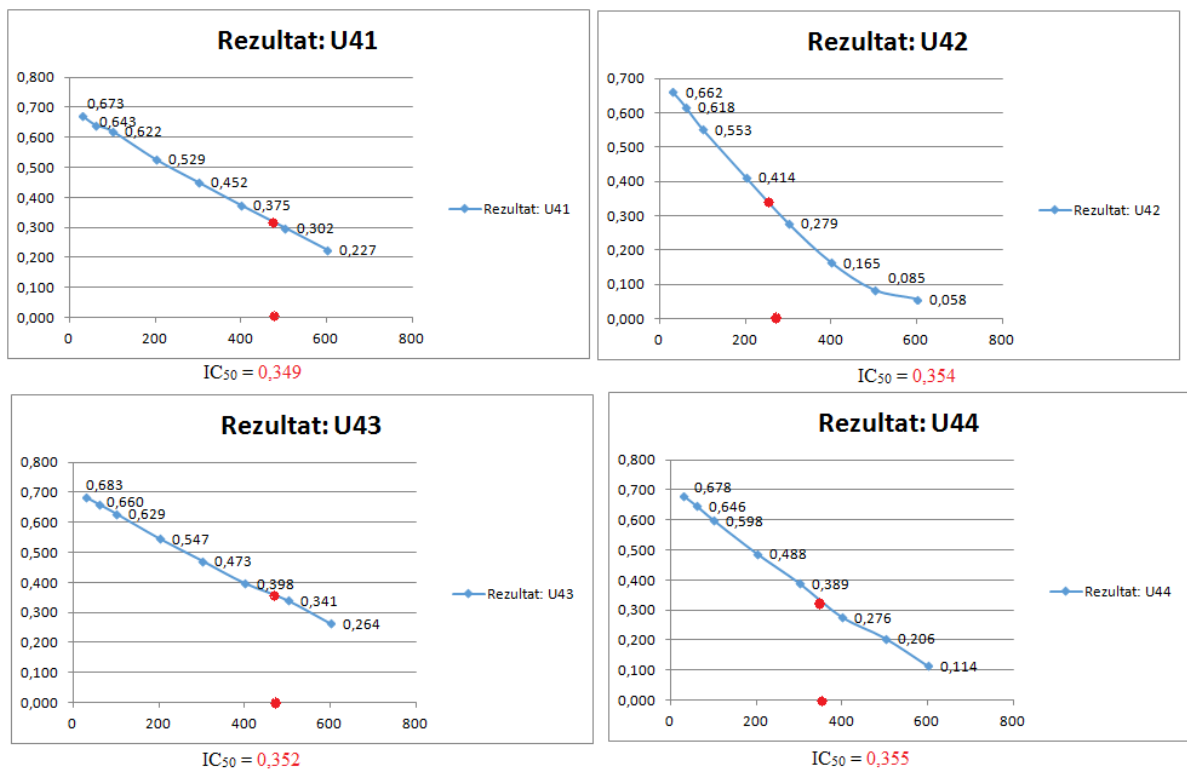
Slika 45. Rezultati IC₅₀ od uzorka 29. do 32.



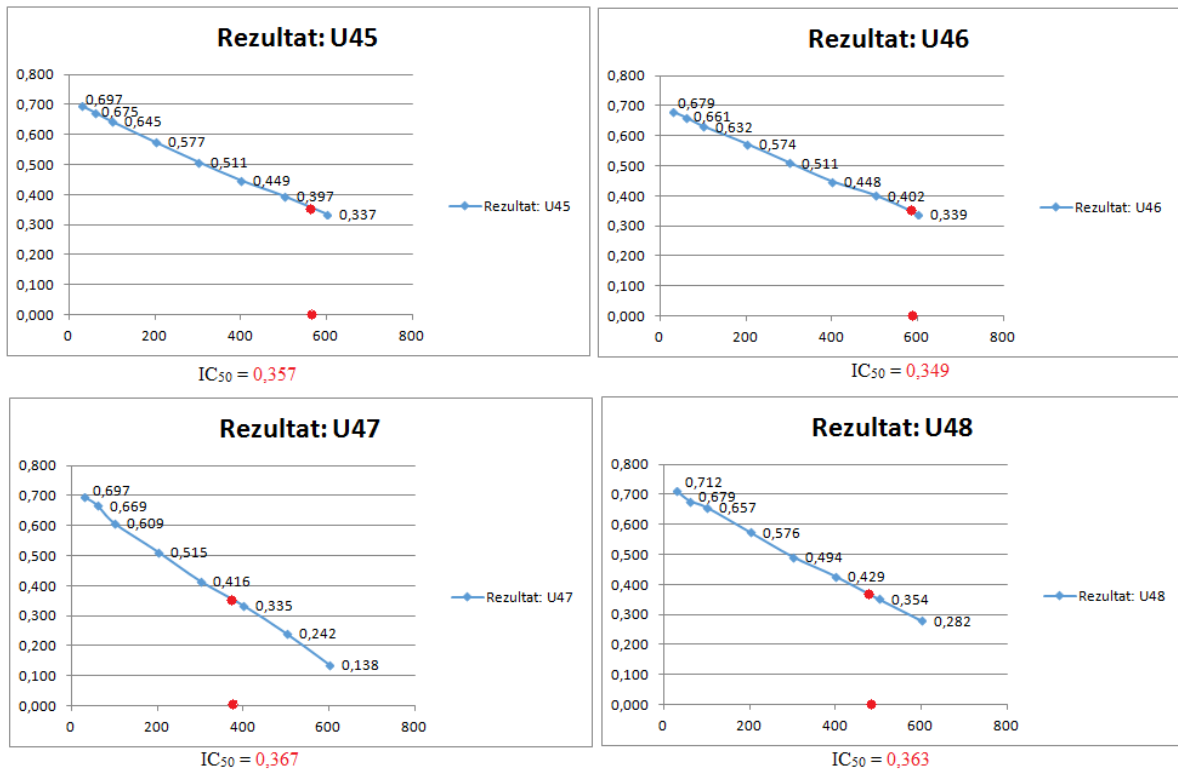
Slika 46. Rezultati IC₅₀ od uzorka 33. do 36.



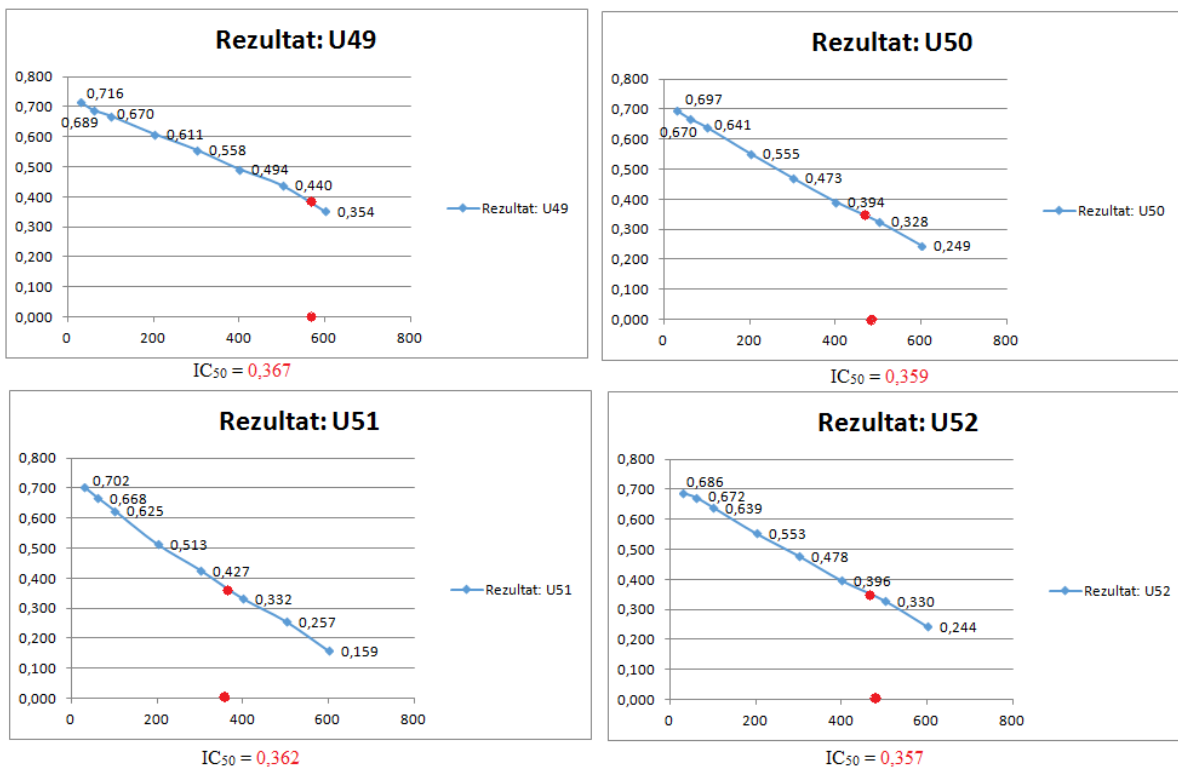
Slika 47. Rezultati IC_{50} od uzorka 37. do 40.



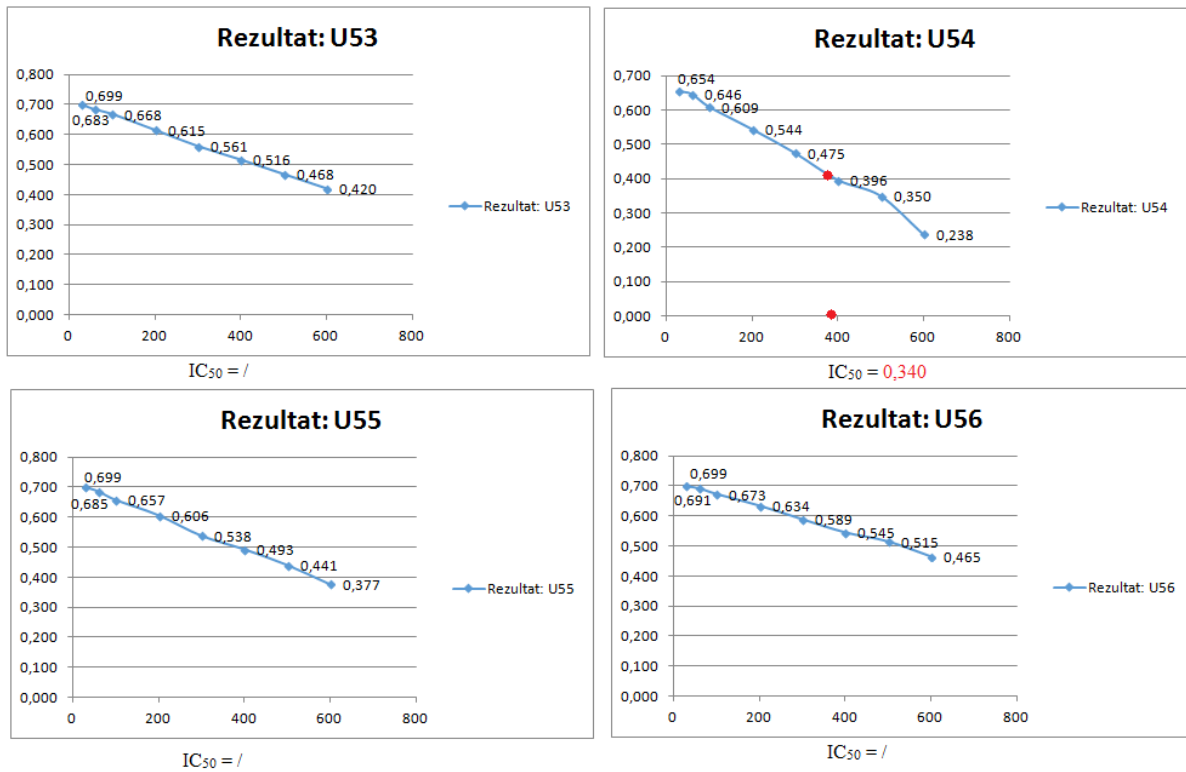
Slika 48. Rezultati IC_{50} od uzorka 41. do 44.



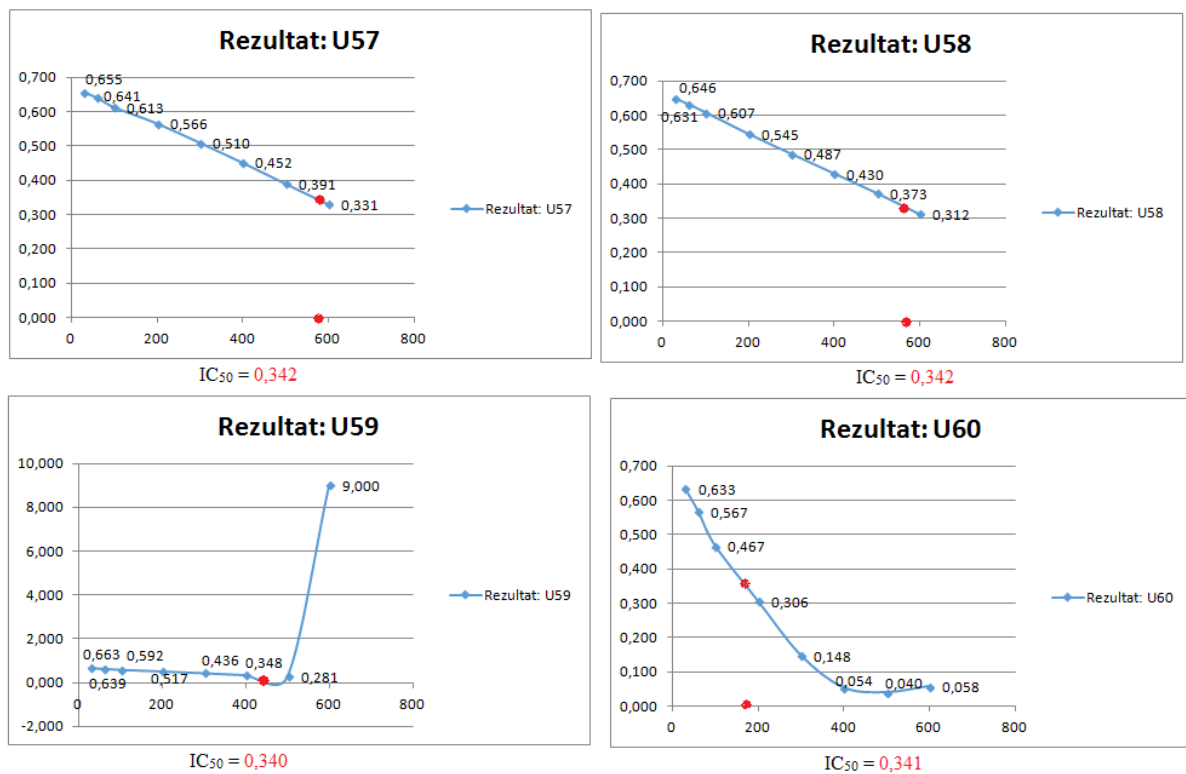
Slika 49. Rezultati IC_{50} od uzorka 45. do 48.



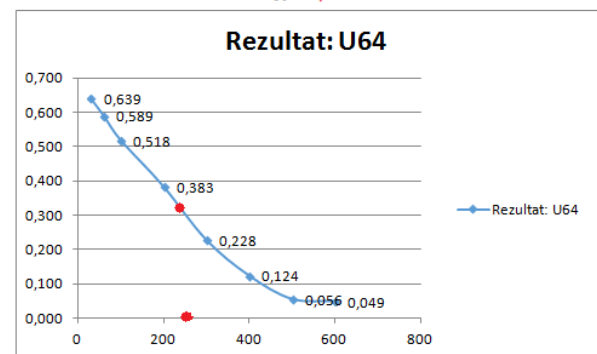
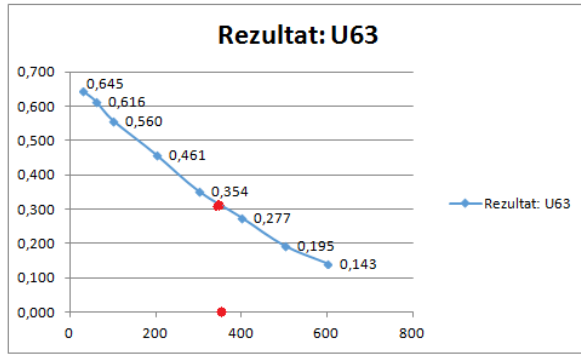
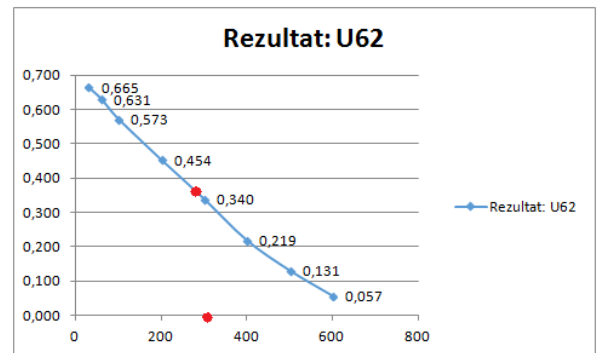
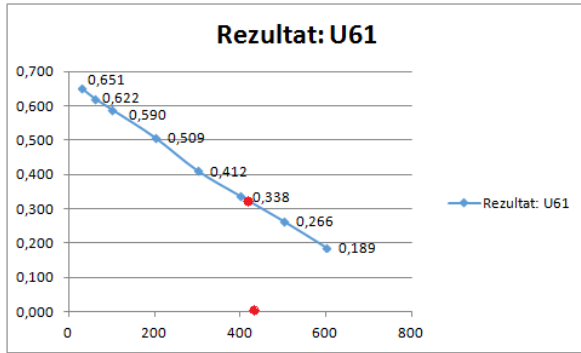
Slika 50. Rezultati IC_{50} od uzorka 49. do 52.



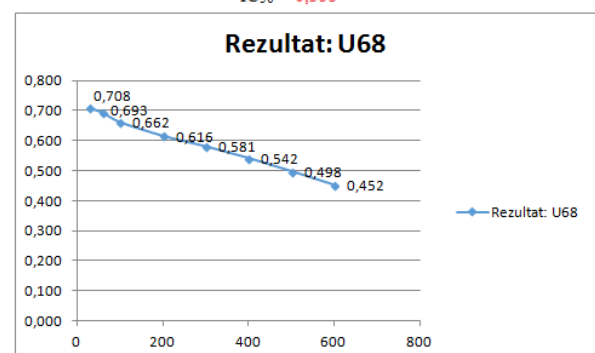
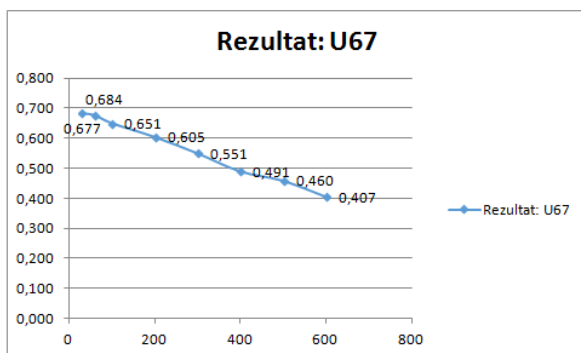
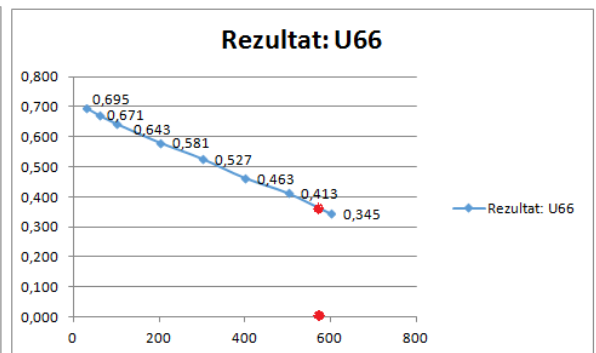
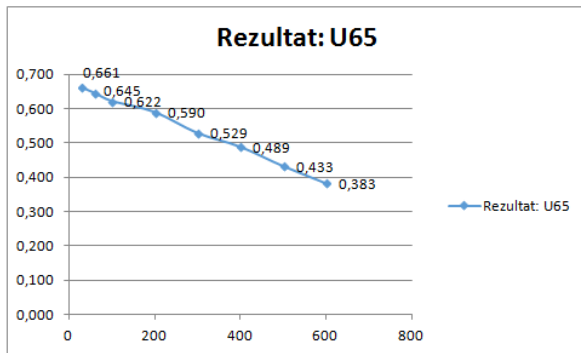
Slika 51. Rezultati IC₅₀ od uzorka 53. do 56.



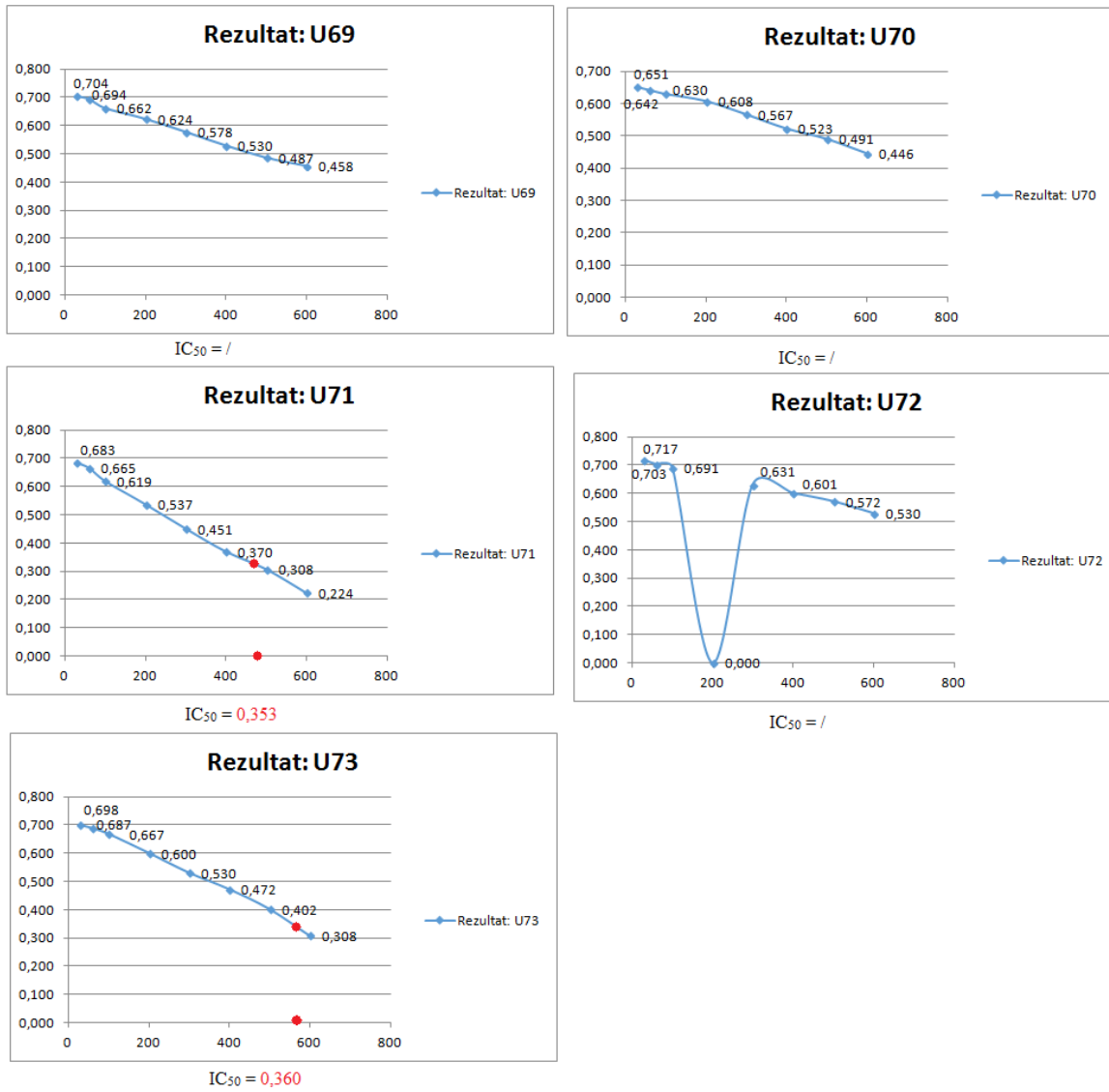
Slika 52. Rezultati IC₅₀ od uzorka 57. do 60.



Slika 53. Rezultati IC_{50} od uzorka 61. do 64.



Slika 54. Rezultati IC_{50} od uzorka 65. do 68.



Slika 55. Rezultati IC₅₀ od uzorka 69. do 73.

5. RASPRAVA

Zadatak rada bio je analizirati 73 uzorka različitih vrsta meda sa različitih geografskih položaja kako bi se utvrdila antioksidativna aktivnost istih. Prvo smo odredili fizikalno kemijske parametre: udio vode, električnu provodljivost, udio hidroksimetilfurfurala (HMF), udio pepela te smo dobivene rezultate prikazali u **Tablici 9**.

Prema pravilniku Ministarstva poljoprivrede i šumarstva pod člankom 7. med koji se stavlja na tržište mora udovoljavati sljedeće uvjete:

Točka : 3. da ne sadrži više od 20% vode;

http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2000_02_20_280.html

Kao što vidimo iz **Tablice 9**. uzorak 46 (pavitina- cvjetni med, Mađarska) i uzorak 50 (cvjetni med, Orlovnjak) odstupaju od graničnog udjela vode u medu. Visoki udio vode u medu može biti uzrok lošeg skladištenja proizvoda, naime med je higroskopan i lako apsorbira vlagu iz okoline. Autori Vahčić i Matković (2009.) smatraju kako med koji u sebi sadrži 17,1% vode i manje, isto tako nije siguran ako temperatura meda nije zadovoljavajuća, naime, smatraju kako uvjeti okoline zajedno sa višim udjelom vode mogu dovesti med do fermentacije i kvarenja. Kvalitetniji med podrazumijeva vrlo nizak udio vode u medu, kod naših uzoraka najniža vrijednost bila je 14,3% (**Tablica 9**).

pH vrijednost meda kreće se od 3,2 do 6,5. Kod naših uzoraka pH vrijednost kreće se od 3,26 do 5,58 što zadovoljava idealne pH vrijednosti (**Tablica 9**).

Električna provodljivost meda ne smije prelaziti 0,800 mS/cm, medljikovac i med od kestena jedini imaju više vrijednosti. Kod naših uzoraka električna provodljivost dolazi u rasponu od 0,117 do 1,952. Uzorci 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 42 i 63 imaju vrlo visoku električnu provodljivost što znači da sadrže visoki udio mineralnih tvari i kiselina. Za uzorak 5. sa sigurnošću možemo reći da je medljikovac bez da pogledamo u **Tablicu 9**. Električna provodljivost usko je povezana sa udjelom pepela u medu. Tako naš uzorak 5. ima i najviši udio pepela u sebi (1,316 %).

Prema pravilniku o medu (MPRRR, 2015.) vrijednost HMF ne smije prelaziti 40 mg/kg meda. HMF je parametar koji nam pokazuje svježinu, prekomjerno zagrijavanje i starenje meda. U **Tablici 9**. vidljivo je da se uzorci kreću u rasponu od 0 do 37,14 mg/kg.

Ukupni fenoli izražavaju se prema mg galne kiseline u kg meda (**Tablica 10.**). Najviše galne kiseline u sebi imao je medljikovac (uzorak 7.) 0,272 mg/kg. Rezultati svih uzoraka kreću se od 0,030 do 0,272 mg/kg (**Tablica 10.**).

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta koristili smo DPPH metodu. Rezultati dobiveni DPPH metodom izraženi su kao IC_{50} (mg/ml), tj. kao koncentracija meda (mg/ml) potrebna za 50% smanjenje početne vrijednosti DPPH. To znači da je antioksidativni kapacitet viši što je niža vrijednost IC_{50} analiziranog uzorka. Vrijednosti dobivenih rezultata kreću se od 0,332 do 0,367 mg/ml (**Tablica 11.**). Na slikama sam prikazala krivulje na kojima je puno ljepša vidljivost IC_{50} svih 73 uzorka.

6. ZAKLJUČAK

Fizikalno - kemijskim parametrima utvrdili smo starost i kvalitetu meda. Hidroksimetil furfurat najpouzdaniji je za utvrđivanje kvalitete meda. Mjerenjem HMF-a dobili smo rezultate u kojima se ističu 26 uzoraka kojima je HMF bio jednak nuli, što znači da su ti medovi prirodni bez dodataka i zagrijavanja te su isto tako i svježi. Najviše uzoraka potječe iz Hrvatske i to njih 19 (vrste: medljikovac, kesten, bagrem, cvjetni, drača, lipa, mandarina), jedan uzorak potječe iz Srbije (vrsta: lipa), jedan iz Slovenije (vrsta: šumski med) i pet iz Mađarske (vrste: bagrem, cvjetni, suncokret).

Antioksidanti u medu pri određenoj koncentraciji smanjuju početnu koncentraciju DPPH (slobodni dušikov radikal) na 50%. Svaki med sa našim razrjeđenjima dao je različite ili nikakve rezultate. Najboljim se pokazao uzorak broj 4. (0,332 mg/ml), koji je dao IC_{50} na najmanjem razrjeđenju. Govorimo o hrvatskom medljikovcu (Ogulin) koji je vrlo bogat mineralima i antioksidantima i ovim putem to smo i dokazali.

Med se ne može smatrati značajnim izvorom antioksidanata u prehrani ljudi no svakako ga treba uključiti kao blagotvorni proizvod koji pridonosi dobrobiti ljudskog organizma.

7. LITERATURA

1. Batinić K. i Palinić D. (2014.) Priručnik o medu, Federalni agromediteranski zavod Mostar.
(http://www.faz.ba/sites/default/files/publikacije/Prirucnik%20o%20Medu_2014.pdf)
(17.03.2017.)
2. Belčić J., Katalinić J., Loc D., Lončarević S., Peredin L., Šimunić F., Tomašec I. (1979.) Pčelarstvo, 4 izdanje, Nakladni zavod Znanje, Zagreb
3. Berend S. i Grabarić Z. (2008.) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, 59:205-212. (<http://hrcak.srce.hr/26607>) (17.03.2017.)
4. Buljeta I. (2015.) Završni rad, Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od vriska (*Satureja montana L.*), Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek.
(<https://zir.nsk.hr/en/islandora/object/ptfos%3A633>) (17.03.2017.)
5. Jovanović N. (2015.) Master rad: antimikrobna i antioksidativna aktivnost različitih uzoraka meda iz okoline Niša, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet.
(<http://www.pmf.ni.ac.rs/pmf/master/biologija/doc/2015/2015-02-26-jn.pdf>) (17.03.2017.)
6. Lončar V. (2015.) Završni rad, Nastajanje i izlučivanje slobodnih radikala kod životinja pri stresnim uvjetima, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
7. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Pravilnik o medu. Narodne novine 53/15, 2015.
8. Mujić I., Alibabić V., Travnjanin D. (2014.) Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda, ISBN 978-953-6911-76-9
9. Petričko P. (2015.) Završni rad, Fizikalno- kemijski parametri cvjetnog meda kontinentalne Hrvatske, Veleučilište u Karlovcu.
(<https://repositorij.vuka.hr/islandora/object/vuka%3A169/datastream/PDF/view>)
(17.03.2017.)
10. Štenderov S., Ivanov C. (1986.) Pčelinji proizvodi i njihovo korištenje, Nolit, Beograd
11. Trožić- Borovac S., Rifat Š., Alijagić S. (2006.) Karakteristike medonosne pčele (*Apis mellifera L.*) na području Unsko- sanskog kantona,
UDK 638.12(497.6). (<http://sfsa.unsa.ba/nauka/dokumenti/Radovi-2006/Trozic-Borovac-Medonosna-pcela-Unsko-sanski-kanton.pdf>) (17.03.2017.)
12. Vahčić N. i Matković D. (2009.) Kemijske, fizikalne i senzorne značajke meda.
(<http://www.pcelinjak.hr/OLD/index.php/Prehrana-i-biotehnologija/kemijske-fizikalne-i-senzorske-znaajke-med.html>) (20.03.2017.)

13. <http://antolcic-med.com/pdfovi/O-medu.pdf> (20.03.2017.)
14. <http://www.pcelarstvo.hr/index.php/pcele/vrste-pcela/301-apis-mellifera-carnica>
(22.03.2017.)
15. <http://blog.dnevnik.hr/apikultura/2014/04/1631755223/kalendar-cvatnje-medonosnog-bilja.html> (22.03.2017.)
16. <http://www.plantea.com.hr/drijen/> (22.03.2017.)
17. <http://upbehar.weebly.com/visibaba.html> (17.05.2017.)
18. <http://www.plantea.com.hr/proljetni-safran/> (17.05.2017.)
19. <http://digre.pmf.unizg.hr/3324/1/SVEU%C4%8CILI%C5%A0TE%20U%20ZAGREBU.pdf> (21.05.2017.)
20. <http://digre.pmf.unizg.hr/5429/1/Diplomski%20rad-%20Josipa%20Dragun.pdf>
(22.05.2017.)
21. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2000_02_20_280.html (23.05.2017.)

8. SAŽETAK

Med je prirodni prehrambeni proizvod i njegova antioksidativna aktivnost isključivo ovisi o njegovom kemijskom sastavu. Antioksidanti prisutni u medu mogu biti enzimski i neenzimski i oni ovise o porijeklu medonosnog bilja ili medne rose. Neizbježna je poveznica između kemijskih i fizikalnih svojstava meda, tj. utjecaj jednog svojstva utječe na drugo svojstvo. Neenzimatske antioksidativne komponente kao što su ukupni fenoli ili bolje rečeno polifenoli (flavonoidi i galna kiselina) utječu na antioksidativnu aktivnost meda.

Antioksidativna aktivnost meda određuje se metodom koja se temelji na reakciji DPPH (2,2- difenil-1-pikril-hidrazil) koji je jedan od rijetkih dušikovih radikala (slobodni radikal) u stabilnom obliku i donora vodika (npr. fenolna skupina). On se u reakciji sa antioksidantima reducira u hidrazin pri čemu se mijenja boja iz ljubičaste u žutu. Mjeri se promjena apsorbancije (redukcija DPPH radikala) pri 517 nm, spektrofotometrijski. Rezultat je proporcionalan koncentraciji antioksidanata, dok se sam antioksidativni kapacitet izražava preko IC_{50} .

IC_{50} predstavlja onu koncentraciju antioksidanata potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH za 50%. Veće IC_{50} vrijednosti predstavljaju manji antioksidativni kapacitet tako da je to nedostatak ovakvog načina izražavanja.

Promjene u antioksidativnoj aktivnosti meda rezultat su kemijskih promjena unutar samoga meda. Promjene se odnose na supstance od kojih je med sačinjen kao i od njegovih antagonističkih i sinergičkih djelovanja i stupanja antioksidativne aktivnosti svake pojedine supstance u medu ali i ukupna antioksidativna aktivnost meda.

Ključne riječi: med, antioksidanti, antioksidativna aktivnost

9. SUMMARY

Honey is a natural nutritional product and its antioxidant activity depends solely on its chemical composition. The antioxidants present in the honey may be enzymatically and non-enzymatic and depend on the origin of medullary or medullary roses. An inevitable connection between the chemical and physical properties of honey, ie, the effect of one property affects another property. Non-enzymatic antioxidant components such as total phenols or, better to say, polyphenols (flavonoids and gallic acids) affect the antioxidant activity of honey.

Antioxidant activity of honey is determined by a method based on the reaction of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) which is one of the rare nitrogen radicals (free radical) in stable form and hydrogen donor (eg. phenolic group). In reaction with antioxidants it is reduced to hydrazine, which changes the color of the purple into yellow. The change in absorbance (DPPH radical reduction) is measured at 517 nm, spectrophotometric. The result is proportional to the concentration of antioxidants, while the antioxidant capacity itself is expressed through IC50.

The IC50 represents the concentration of antioxidants required to reduce the initial DPPH concentration by 50%. Larger IC50 values represent a lower antioxidant capacity so that this is a lack of such a way of expression.

Changes in the antioxidant activity of honey are the result of chemical changes within the honey itself. The changes relate to the substances from which honey is made, as well as from its antagonistic and synergistic infants and to the antioxidative activity of each substance in the honey, but also the total antioxidant activity of honey.

Keywords: honey, antioxidants, antioxidant activity

10. POPIS SLIKA I GRAFOVA

1. Slika 1. Cvjetovi i list bijele vrbe, izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Bijela_vrba (17.05.2017.)
2. Slika 2. Cvjetovi mišjakinje, izvor: <http://www.plantea.com.hr/misjakinja/> (17.05.2017.)
3. Slika 3. Velecvjetni kukurjek, izvor: <http://www.plantea.com.hr/kukurijek/> (17.05.2017.)
4. Slika 4. Plućnjak u cvatu, izvor: <http://www.plantea.com.hr/plucnjak/> (18.05.2017.)
5. Slika 5. Divlji kesten u cvatu, izvor: <http://www.plantea.com.hr/divlji-kesten/> (18.05.2017.)
6. Slika 6. Drača, izvor: <http://www.plantea.com.hr/draca/> (18.05.2017.)
7. Slika 7. Cvijet mandarine, izvor: <http://www.plantea.com.hr/mandarina/> (18.05.2017.)
8. Slika 8. Cvjetovi medvjedeg luka, izvor: <http://www.plantea.com.hr/medvjedi-luk/> (18.05.2017.)
9. Slika 9. Obična smreka, izvor: <http://www.plantea.com.hr/obicna-smreka/> (18.05.2017.)
10. Slika 10. Uljana repica, izvor: <http://www.plantea.com.hr/uljana-repica/> (18.05.2017.)
11. Slika 11. Bagrem u cvatu, izvor: <http://www.plantea.com.hr/bagrem/> (18.05.2017.)
12. Slika 12. Vrste hrasta,
izvor: <http://up-ulisce.hr/wp-content/uploads/2016/12/medonosno-bilje.pdf> (18.05.2017.)
13. Slika 13. Livadna kadulja, izvor: <http://www.plantea.com.hr/livadna-kadulja/> (19.05.2017.)
14. Slika 14. Grahorica, izvor: <http://www.plantea.com.hr/grahorica/> (19.05.2017.)
15. Slika 15. Bijela djetelina, izvor: <http://www.plantea.com.hr/bijela-djetelina/> (19.05.2017.)
16. Slika 16. Crvena djetelina, izvor: <http://www.plantea.com.hr/crvena-djetelina/> (19.05.2017.)
17. Slika 17. Pitomi kesten, izvor: <http://www.plantea.com.hr/pitomi-kesten/> (20.05.2017.)
18. Slika 18. Cvjetovi korijandera, izvor: <http://www.plantea.com.hr/korijandar/> (20.05.2017.)
19. Slika 19. Cvijet luštrike, izvor: <http://www.plantea.com.hr/lustrika/> (20.05.2017.)
20. Slika 20. Vrijesak u cvatu, izvor: <http://www.plantea.com.hr/vrijesak/> (20.05.2017.)
21. Slika 21. Poljska metvica, izvor: <http://www.plantea.com.hr/poljska-metvica/> (20.05.2017.)

22. Slika 22. Obična zlatnica, izvor: <http://www.plantea.com.hr/obicna-zlatnica/> (20.05.2017.)
23. Slika 23. Električna vodljivost različitih vrsta meda (Vahčić i Matković, 2009.).
24. Slika 24. Prosječan postotni kemijski sadržaj meda (podjela na 100%)
25. Slika 25. Podjela polifenola, izvor: Berend i Grabarić, 2008.
26. Slika 26. Osnovna kemijska struktura flavonoida
(<http://digre.pmf.unizg.hr/3324/1/SVEU%C4%8CILIC5%A0TE%20U%20ZAGREBU.pdf>) (21.05.2017.)
27. Slika 27. Naša 73 uzorka spremna za analizu
28. Slika 28. Mjerenje udjela vode u medu
(<http://www.pcelarstvo.hr/index.php/radovi/pcelarska-radionica/94-odredivanje-vlage-u-medu>) (22.05.2017.)
29. Slika 29. Priprema uzoraka za analizu
30. Slika 30. Mjerenje HMF-a
31. Slika 31. Mjerenje električne vodljivosti
32. Slika 32. Mjerenje pH meda
33. Slika 33. Priprema uzorka određivanje ukupnih fenola
34. Slika 34. Postupak rada F-C metodom
35. Slika 35. Izrada DPPH reagensa
36. Slika 36. Priprema uzoraka za DPPH metodu
37. Slika 37. Postupak rada DPPH metodom
38. Slika 38. Rezultati IC₅₀ od uzorka 1. do 4.
39. Slika 39. Rezultati IC₅₀ od uzorka 5. do 8.
40. Slika 40. Rezultati IC₅₀ od uzorka 9. do 12.
41. Slika 41. Rezultati IC₅₀ od uzorka 13. do 16.
42. Slika 42. Rezultati IC₅₀ od uzorka 17. do 20.
43. Slika 43. Rezultati IC₅₀ od uzorka 21. do 24.
44. Slika 44. Rezultati IC₅₀ od uzorka 25. do 28.
45. Slika 45. Rezultati IC₅₀ od uzorka 29. do 32.
46. Slika 46. Rezultati IC₅₀ od uzorka 33. do 36.
47. Slika 47. Rezultati IC₅₀ od uzorka 37 do 40.
48. Slika 48. Rezultati IC₅₀ od uzorka 41. do 44.
49. Slika 49. Rezultati IC₅₀ od uzorka 45. do 48.
50. Slika 50. Rezultati IC₅₀ od uzorka 49. do 52.

51. Slika 51. Rezultati IC_{50} od uzorka 53. do 56.
52. Slika 52. Rezultati IC_{50} od uzorka 57. do 60.
53. Slika 53. Rezultati IC_{50} od uzorka 61. do 64.
54. Slika 54. Rezultati IC_{50} od uzorka 65. do 68.
55. Slika 55. Rezultati IC_{50} od uzorka 69. do 73.
56. Graf 1. Kalibracijska krivulja Galne kiseline i rezultati ukupnih fenola po uzorcima

11. POPIS TABLICA

1. Tablica 1. Kalendar medonosnog bilja
(<http://blog.dnevnik.hr/apikultura/2014/04/1631755223/kalendar-cvatnje-medonosnog-bilja.html>) (16.05.2017.)
2. Tablica 2. Udio pojedine vrste šećera u medu (Mujić i sur., 2014.)
3. Tablica 3. 11 Disaharida i 12 oligosaharida u medu (Vahčić i Matković, 2009.)
4. Tablica 4. Enzimi prisutni u medu (Škenderov i Ivanov, 1986.)
5. Tablica 5. Popis uzoraka
6. Tablica 6. Postupak dobijanja absorbance Galne kiseline
7. Tablica 7. Razrjeđenja
8. Tablica 8. Oznake na epruvetama
9. Tablica 9. Određeni fizikalno- kemijski parametri ispitivanih uzoraka
10. Tablica 10. Određivanje x osi uzoraka na grafu kao, mg Galne kiseline u kg meda
11. Tablica 11. Rezultati IC₅₀ svih uzoraka

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij Zootehnike
Smjer Specijalna Zootehnika

Diplomski rad

Određivanje antioksidativne aktivnosti različitih vrsta meda

Višnja Lončar

Sažetak

Med je prirodni prehrambeni proizvod i njegova antioksidativna aktivnost isključivo ovisi o njegovom kemijskom sastavu. Antioksidanti prisutni u medu mogu biti enzimski i neenzimski i oni ovise o porijeklu medonosnog bilja ili medne rose. Neizbježna je poveznica između kemijskih i fizikalnih svojstava meda, tj. utjecaj jednog svojstva utječe na drugo svojstvo. Neenzimatske antioksidativne komponente kao što su ukupni fenoli ili bolje rečeno polifenoli (flavonoidi i galna kiselina) utječu na antioksidativnu aktivnost meda. Antioksidativna aktivnost meda određuje se metodom koja se temelji na reakciji DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) koji je jedan od rijetkih dušikovih radikala (slobodni radikal) u stabilnom obliku i donora vodika (npr. fenolna skupina). On se u reakciji sa antioksidantima reducira u hidrazin pri čemu se mijenja boja iz ljubičaste u žutu. Mjeri se promjena apsorbancije (redukcija DPPH radikala) pri 517 nm, spektrofotometrijski. Rezultat je proporcionalan koncentraciji antioksidanata, dok se sam antioksidativni kapacitet izražava preko IC50. IC50 predstavlja onu koncentraciju antioksidanata potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH za 50%. Veće IC50 vrijednosti predstavljaju manji antioksidativni kapacitet tako da je to nedostatak ovakvog načina izražavanja. Promjene u antioksidativnoj aktivnosti meda rezultat su kemijskih promjena unutar samoga meda. Promjene se odnose na supstance od kojih je med sačinjen kao i od njegovih antagonističkih i sinergičkih djeovanja i stupanja antioksidativne aktivnosti svake pojedine supstance u medu ali i ukupna antioksidativna aktivnost meda.

Rad je izraden pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo

Broj stranica: 76

Broj grafikona: 1

Broj slika: 55

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 21

Broj priloga: 10

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: med, antioksidanti, antioksidativna aktivnost

Datum obrane: 07.07. 2017. godine

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr.sc. Zlatko Puškadija
2. Izv. prof. dr.sc. Drago Bešlo
3. Prof. dr.sc. Marcela Šperanda

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies Zootehnika
Course Specijalna Zootehnika

Graduate thesis

Determination of antioxidant activity of different types of honey

Višnja Lončar

Abstract:

Honey is a natural nutritional product and its antioxidant activity depends solely on its chemical composition. The antioxidants present in the honey may be enzymatically and non-enzymatic and depend on the origin of medullary or medullary roses. An inevitable connection between the chemical and physical properties of honey, ie, the effect of one property affects another property. Non-enzymatic antioxidant components such as total phenols or, better to say, polyphenols (flavonoids and gallic acids) affect the antioxidant activity of honey. Antioxidant activity of honey is determined by a method based on the reaction of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) which is one of the rare nitrogen radicals (free radical) in stable form and hydrogen donor (eg. phenolic group). In reaction with antioxidants it is reduced to hydrazine, which changes the color of the purple into yellow. The change in absorbance (DPPH radical reduction) is measured at 517 nm, spectrophotometric. The result is proportional to the concentration of antioxidants, while the antioxidant capacity itself is expressed through IC50. The IC50 represents the concentration of antioxidants required to reduce the initial DPPH concentration by 50%. Larger IC50 values represent a lower antioxidant capacity so that this is a lack of such a way of expression. Changes in the antioxidant activity of honey are the result of chemical changes within the honey itself. The changes relate to the substances from which honey is made, as well as from its antagonistic and synergistic infants and to the antioxidative activity of each substance in the honey, but also the total antioxidant activity of honey.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo

Number of pages: 76

Number of figures: 1

Number of tables: 11

Number of references: 21

Number of appendices: 10

Original in: Croatian

Key words: honey, antioxidants, antioxidant activity

Thesis defended on date: 07.07. 2017.

Reviewers:

1. Prof. dr.sc. Zlatko Puškadija
2. Izv. prof. dr.sc. Drago Bešlo
3. Prof. dr.sc. Marcela Šperanda

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.