

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Ana-Marija Cikoš

Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od
uljane repice (*Brassica* sp.)

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

**Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od
uljane repice (*Brassica sp.*)**

Nastavni predmet
Kontrola kakvoće hrane

Student/ica: Ana-Marija Cikoš (MB: 3581/12)

Mentor: dr. sc. Ivana Flanjak, docent

Predano (datum):

Pregledano (datum):

Ocjena:

Potpis mentora:

Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od uljane repice (*Brassica sp.*)

Sažetak:

Zadatak ovog rada bio je karakterizirati med od uljane repice (*Brassica sp.*) s naglaskom na antioksidativni kapacitet. Antioksidativni kapacitet meda ovisi prvenstveno o njegovu botaničkom podrijetlu, a najčešće se povezuje s udjelom fenola i bojom.

Od fizikalno-kemijskih parametara određeni su: udio vode, električna provodnost, boja, aktivnost dijastaze, udio HMF-a, omjer fruktoze i glukoze te njihov zbroj. Udio fenola određen je modificiranom Folin-Ciocalteu metodom dok je antioksidativni kapacitet određen FRAP i DPPH metodama.

Rezultati analiza pokazali su da med od uljane repice karakterizira nizak omjer fruktoze i glukoze s prosječnom vrijednosti $1,00 \pm 0,03$ te da spada u kategoriju jako svijetlo žutih medova prema Pfund-ovoj skali (prosječna vrijednost $37,5 \pm 7,9$ mm Pfund). Udio ukupnih fenola nalazio se u rasponu 108,2-152,6 mg galne kiseline/kg meda, dok je antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom bio 144,6-232,3 μM Fe(II), a onaj određen DPPH metodom 17,51-29,09 mg/ml.

Ključne riječi: med od uljane repice, karakterizacija, antioksidativni kapacitet, fizikalno-kemijski parametri

Antioxidant capacity and physicochemical parameters of rape honey (*Brassica sp.*)

Summary:

The aim of this study was characterisation of rape honey (*Brassica sp.*) with emphasis on antioxidant capacity. Antioxidant capacity of honey primarily depends on its botanical origin and generally is correlated with phenolic content and honey colour.

Following physicochemical parameters were determined: water content, electrical conductivity, colour, diastase activity, HMF content, fructose (F) and glucose (G) ratio and their sum. Total phenolic content was determined by modified Folin-Ciocalteu method while antioxidant capacity of honey was determined by FRAP and DPPH methods.

Results showed that rape honey has low F/G ratio with average value of $1,00 \pm 0,03$ and according to the Pfund scale belongs to category extra light amber (the average value $37,5 \pm 7,9$ mm Pfund). Total phenolic content was 108,2-152,6 mg gallic acid/kg of honey, while antioxidant capacity determined by FRAP method was 144,6-232,3 $\mu\text{M Fe(II)}$ and antioxidant capacity which was determined by DPPH method was 17,51-29,09 mg/ml.

Keywords: rape honey, characterisation, antioxidant capacity, physicochemical parameters

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1.	DEFINICIJA I PODJELA MEDA.....	4
2.2.	KEMIJSKI SASTAV MEDA.....	4
2.2.1.	Šećeri.....	4
2.2.2.	Voda.....	5
2.2.3.	Proteini i aminokiseline.....	5
2.2.4.	Enzimi.....	5
2.2.5.	Kiseline.....	6
2.2.6.	Minerali i vitamini.....	6
2.2.7.	Fenolne komponente.....	6
2.3.	ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA.....	7
2.3.1.	Oksidativni stres i nastajanje slobodnih radikala.....	7
2.3.2.	Antioksidansi.....	8
2.3.3.	Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta.....	8
2.3.3.1.	DPPH metoda.....	9
2.3.3.2.	FRAP metoda.....	10
2.3.3.3.	Određivanje ukupnih fenola.....	10
2.4.	ULJANA REPICA.....	11
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1.	ZADATAK RADA.....	13
3.2.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.2.1.	Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	13
3.2.2.	Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom.....	14
3.2.3.	Određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom.....	14
3.2.4.	Spektrofotometrijsko određivanje boje.....	15

3.2.5. Određivanje boje pomoću Lovibond komparatora	15
3.2.6. Statistička obrada rezultata	15
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA	22
6. ZAKLJUČAK	27
7. LITERATURA.....	29

1. UVOD

Med se konzumira od početka ljudskog postojanja, ali i danas zauzima značajno mjesto u prehrani. Predmet je mnogih istraživanja diljem svijeta što je posljedica njegovog kompleksnog sastava. Pošto je prirodni proizvod može doći do razlike u sastavu unutar pojedinih vrsta meda jer njegov sastav ovisi prije svega o botaničkom podrijetlu, a također utjecaj imaju i zemljopisni položaj, klimatski uvjeti, pasmina pčela te uvjeti procesiranja i daljnjeg rukovanja medom (Lachman i sur., 2010.).

Uz šećere kao glavni sastojak, sadrži i razne minerale, vitamine, proteine, kiseline, enzime, antibakterijske tvari, flavonoide i druge fitokemikalije. Istraživanja su pokazala da se u medu nalazi velik broj fitokemikalija koje pomažu u očuvanju našeg zdravlja. Antioksidansi, koji pripadaju skupini fitokemikalija, smanjuju rizik od štetnih oksidativnih promjena u našem organizmu hvatajući i uklanjajući slobodne radikale (Bobis i sur., 2011.).

Antioksidativni kapacitet meda je rezultat sinergističkog djelovanja različitih komponenata poput fenolnih komponenti, peptida, aminokiselina, organskih kiselina, enzima, produkata Maillardovih reakcija, derivata karotenoida, askorbinske kiseline i drugih komponenti prisutnih u tragovima. Istraživanja su pokazala da je antioksidativni kapacitet meda u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola u medu (Vit i sur., 2010.; Bertonecelj i sur., 2007.; Alvarez-Suarez i sur., 2010.).

Med od uljane repice karakterizira brza kristalizacija što je posljedica visokog udjela glukoze. Može se koristiti kao "starter za kristalizaciju" koji dodan u druge medove potiče bolju i lakšu kristalizaciju (Persano Oddo i sur., 2004.).

Zadatak ovog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola, antioksidativni kapacitet i boju meda od uljane repice kako bi se utvrdile specifičnosti što će značajno pridonijeti potpunijem opisu hrvatskih vrsta meda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA I PODJELA MEDA

Prema Pravilniku o medu, med je sladak, gust, viskozni, tekući ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja. Može se podijeliti s obzirom na podrijetlo i način proizvodnje. Prema podrijetlu ga dijelimo na cvjetni ili nektarni, proizveden od nektara različitih medonosnih biljaka, te medljikovac ili medun, dobiven od izlučevina kukaca koji žive na živim dijelovima biljaka ili od njihovog sekreta. Prema načinu proizvodnje razlikujemo: med u saću, med sa saćem ili med s dijelovima saća, cijeđeni med, vrcani med, prešani med i filtrirani med (MPRRR, 2015.).

Sastav meda i njegova svojstva ovise prije svega o botaničkom podrijetlu, ali utjecaj imaju i zemljopisni položaj, klimatski uvjeti, pasmina pčela te uvjeti procesiranja i daljnjeg rukovanja medom (Flanjak, 2012.).

2.2. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med ima vrlo kompleksan sastav, a najvećim dijelom sadrži šećere i to glukozu i fruktozu, dok su u manjim količinama prisutna najmanje 22 kompleksna šećera. (White i Doner, 1980.).

U malim količinama nalaze se i organske kiseline, pigmenti, komponente arome, proteini i fenolne komponente koji su bitni za karakterizaciju meda i njegova nutritivna svojstva. Kompleksan kemijski sastav meda, ali i klimatski uvjeti te zemljopisno podrijetlo mogu uzrokovati varijacije u sastavu i unutar iste vrste meda (Anklam, 1998.).

2.2.1. Šećeri

Glavninu čine monosaharidi D-fruktoza i D-glukoza, 85-95% ukupnih ugljikohidrata, koji su odgovorni za fizikalne karakteristike, energetska vrijednost i slatkoću meda. U medu su identificirani i drugi šećeri poput disaharida, trisaharida i oligosaharida. U većini medova ima više fruktoze nego glukoze, no postoje vrste kod kojih je obrnuto poput meda od uljane repice (White i Doner, 1980.).

Omjer fruktoze i glukoze primjenjuje se kao jedan od parametara identifikacije meda i u većini slučajeva je on veći od 1 (Flanjak, 2012.).

2.2.2. Voda

Voda se nalazi na drugom mjestu po zastupljenosti u medu (Vit i sur., 2010.). Udio vode u medu kreće se od 13% do 25%, a Pravilnik o medu propisuje najviše 20% vode uz iznimku meda od vrijeska (*Calluna vulgaris* L.) i pekarskog meda kod kojih je maksimalno dozvoljeni udio vode veći od 20% (MPRRR, 2015.).

Čimbenici koji utječu na količinu prisutne vode su klimatski uvjeti, podrijetlo i sastav nektara te uvjeti procesiranja i skladištenja meda. Ima veliki utjecaj na samu kakvoću meda pa su tako oni medovi koji sadrže veći udio vode skloniji fermentaciji. Također, udio vode utječe i na ostale fizikalne parametre poput indeksa refrakcije, kristalizacije, viskoznosti i specifične težine (Flanjak, 2012.).

2.2.3. Proteini i aminokiseline

Med sadrži male količine proteina koji većinom potječu od pčele, no dio dopijeva iz biljke tj. nektara i peludi. Proteini se mogu koristiti kao parametar za određivanje botaničkog podrijetla, no bolji pokazatelj su slobodne aminokiseline u medu. Najzastupljenija aminokiselina u medu je prolin te čini od 50% do 85% ukupnih aminokiselina. Uz prolin, identificirano je još 26 esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina. Aminokiseline u med dopijevaju većinom iz nektara, a manjim dijelom iz peludi i od samih pčela (Flanjak, 2012.; Anklam, 1998.).

2.2.4. Enzimi

Enzimi čine najveći udio proteina u medu te se njihova aktivnost smatra kao jednim od pokazatelja kakvoće meda, stupnja zagrijavanja i uvjeta skladištenja. Tijekom procesiranja i skladištenja meda dolazi do promjene aktivnosti enzima. U medu su prisutni slijedeći enzimi: dijastaza, invertaza, glukoza-oksidaza, katalaza i kisela fosfataza (White i Doner, 1980.; Flanjak, 2012.).

2.2.5. Kiseline

Iako su prisutne u malim količinama, kiseline su odgovorne za stabilnost meda te za njegov miris i okus. Najzastupljenija je glukonska kiselina koja nastaje djelovanjem pčelinjeg enzima glukoza-oksidaze na glukozu. U medu su prisutne i druge kiseline poput mravlje, octene, maslačne, jabučne i druge. Kiselost meda ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu pa je tako pH nektarnog meda u rasponu od 3,3 do 4,6, dok je za medljikovac i med kestena od 4,5 do 6,5 (Flanjak, 2012.).

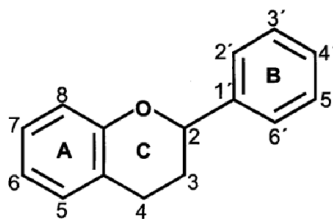
2.2.6. Minerali i vitamini

Mineralne tvari važan su parametar kakvoće, a mogu biti i pokazatelj botaničkog podrijetla pošto u med uglavnom dospjevaju od same biljke s koje pčela skuplja nektar. Najzastupljeniji mineral je kalij, a u manjim količinama prisutni su i natrij, magnezij, kalcij, mangan, željezo i drugi. Tamniji med ima više mineralnih tvari od svjetlijih vrsta. Udio mineralnih tvari u korelaciji je s električnom provodnosti čije vrijednosti doprinose karakterizaciji nektarnih medova jer je ona jedan od pokazatelja razlikovanja nektarnog meda od medljikovca (Flanjak, 2012.).

Poput minerala, i vitamini se nalaze u malim količinama u medu te dospjevaju iz nektara. Identificirani su vitamin C, B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin), B₅ (pantotenska kiselina), B₆ (piridoksin) i vitamin K (White i Doner, 1980.; Flanjak, 2012.).

2.2.7. Fenolne komponente

Fenolne komponente su sekundarni produkti metabolizma biljaka i uključene su u obrambene mehanizme biljke. Općenito, dijele se na 4 skupine s obzirom na broj fenolnih prstena i strukturnih oblika koji se vežu na te prstene, a to su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Bravo, 1998.). U medu prisutne fenolne komponente dijele se na 3 skupine: flavonoidaglikoni, benzojeva kiselina i njezini esteri te cimetna kiselina i njezini esteri. One dospjevaju u med iz cvjetnog nektara i propolisa, a u manjoj mjeri i iz peludi. Osnovna struktura flavonoida je sačinjena od 2 aromatska prstena (A- i B-prsten) koji su povezani mostom od tri ugljikova atoma (C-prsten) (Flanjak, 2012.).



Slika 1: Osnovna struktura flavonoida (Bravo, 1998.)

Istraživanja su pokazala da postoji korelacija između sadržaja ukupnih fenola prisutnih u medu i antioksidativnog kapaciteta meda te da tamnije vrste meda imaju veći udio fenolnih komponenti od svjetlijih vrsta (Lachman i sur., 2010.; Bobis i sur., 2011.).

2.3. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET MEDA

Antioksidativni kapacitet je mjera kojom se pokazuje sposobnost reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija u hrani, tako i u organizmu. Istraživanja su pokazala kako med posjeduje antioksidativna svojstva i da može smanjiti štetne oksidativne reakcije koje bi prouzrokovale gastrointestinalne bolesti i različite oblike karcinoma kod ljudi (Vit i sur., 2010.).

Iako je poznato da med nije značajan izvor antioksidanasa u prehrani, njegovom konzumacijom osigurati ćemo organizmu energiju zbog visokog udjela šećera, ali unijeti i druge nutritivno vrijedne komponente, uključujući i antioksidanse.

2.3.1. Oksidativni stres i nastajanje slobodnih radikala

Dokazano je kako slobodni radikali prouzrokuju oksidativne promjene na lipidima, proteinima, ugljikohidratima i nukleinskim kiselinama. Nastanak reaktivnih kisikovih vrsta poput superoksid aniona ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroksil-radikala ($\bullet\text{OH}$) i peroksil radikala ($\text{ROO}\bullet$) može dovesti do mnogih problema u organizmu poput karcinogeneze, mutageneze, starenja, ateroskleroze i neurodegenerativnih bolesti. Bitno je pronaći nove prirodno prisutne antioksidanse koji će smanjiti štetno djelovanje reaktivnih kisikovih vrsta na naš organizam. Iz tog razloga, med se sve češće istražuje s aspekta antioksidativnog kapaciteta (Vit i sur., 2010.).

Oksidativni stres nastaje kao posljedica nastanka reaktivnih kisikovih vrsta, posebno slobodnih radikala, i antioksidativne obrane našeg organizma. Slobodni radikali su izrazito

nestabilne kemijske vrste koje u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona te nastoje postići stabilnu strukturu tako da popune valentnu orbitalu. Napadajući druge molekule i oduzimajući im elektron, te molekule postaju slobodni radikali i na taj način se pokreće lančana reakcija koja može dovesti do nastanka vrlo štetnih spojeva. Čimbenici koji će prouzrokovati stvaranje slobodnih radikala u našem organizmu su prooksidativni enzimi (npr. lipooksigenaza), UV i ionizirajuće zračenje, onečišćivači iz zraka te nepravilna prehrana (Flanjak, 2012.).

2.3.2. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koji štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i sprječavaju izazivanje oksidacijskog stresa u ljudskom organizmu. Mogu djelovati na način da hvataju i neutraliziraju reaktivne kisikove i dušikove vrste te tako zaustavljaju lančanu reakciju, u tom slučaju nazivaju se primarni antioksidansi. Fenolne komponente su dobri hvatači slobodnih radikala. Drugi način djelovanja antioksidanasa je sprječavanje inicijacijskog stvaranja slobodnih radikala ili smanjenje brzine kojom se provodi daljnja lančana reakcija i tada se nazivaju preventivni antioksidansi (Flanjak, 2012.).

Postoje enzimski i neenzimski antioksidansi. Pod enzimskim antioksidansima podrazumijevaju se enzimi poput katalaze ili glukoza-oksidaze, dok u neenzimske spadaju organske kiseline, produkti Maillardovih reakcija, aminokiseline, proteini, flavonoidi, fenoli, tokoferoli, askorbinska kiselina i karotenoidi (Lachman i sur., 2010.).

Antioksidativni kapacitet meda je rezultat sinergističkog djelovanja različitih komponenata poput fenolnih komponenti, peptida, aminokiselina, organskih kiselina, enzima, produkata Maillardovih reakcija, derivata karotenoida, askorbinske kiseline i drugih komponenti prisutnih u tragovima (Flanjak, 2012.).

2.3.3. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta

Ne postoji standardna metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta, nego se u većini slučajeva kombinira više metoda kako bi se dobio profil aktivnosti svih prisutnih antioksidanasa. Svaka ta pojedina metoda ne pokazuje mehanizme djelovanja svih slobodnih radikala i svih antioksidanasa u kompleksnom sustavu kao što su organizam i hrana. Upravo zbog toga otežana je usporedba rezultata s obzirom na razne modifikacije koje su moguće

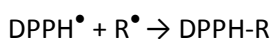
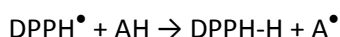
tijekom određivanja antioksidativnog kapaciteta nekog sustava. Postoje dva osnovna mehanizma kojima antioksidans može deaktivirati slobodni radikal, a to su HAT i SET mehanizmi (Flanjak, 2012.).

Metode koje se temelje na HAT mehanizmu (*eng. Hydrogen Atom Transfer*) mjere sposobnost antioksidansa da hvata slobodne radikale donirajući vodikov atom. Ove metode ne ovise o otapalu i pH vrijednosti sustava. Aktivnost antioksidansa temelji se na kompeticijskoj kinetici na taj način da se on natječe s probnom tvari za slobodne radikale. Brze su i završavaju u roku od nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Najčešće korištene metode prema ovom mehanizmu su ORAC (*eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity*) i TRAP (*eng. Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) metoda (Flanjak, 2012.).

Metode koje se temelje na SET mehanizmu (*eng. Single Electron Transfer*) mjere sposobnost antioksidansa da donira elektron te na taj način reducira komponente. Za razliku od metoda temeljenih na HAT mehanizmu, ove metode su spore i ovisne su o otapalu i pH vrijednosti sustava. Ovdje je bitan postotak smanjenja koncentracije slobodnog radikala, a ne kinetika reakcije te nema kompeticije. Najčešće se koriste FRAP (*eng. Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) i TEAC (*eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metode uz pretpostavku da je redukcijska sposobnost ekvivalentna antioksidacijskoj sposobnosti (Flanjak, 2012.).

2.3.3.1. DPPH metoda

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal je jedan od rijetko stabilnih oblika dušikovih radikala. On se u reakciji s antioksidansima reducira u hidrazin pri čemu se mijenja boja iz ljubičaste u žutu. Mjeri se promjena apsorbancije pri 515 – 528 nm čime se zapravo prati redukcija DPPH radikala.



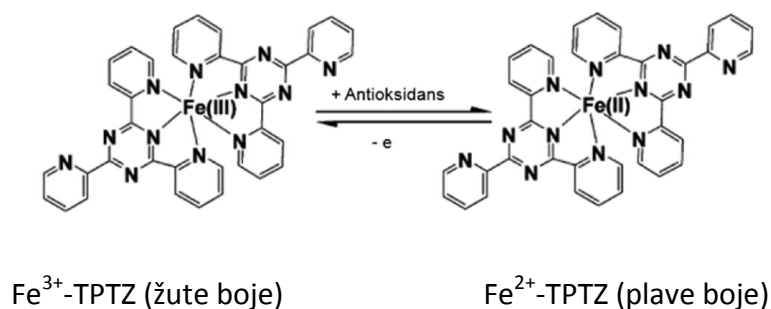
Rezultati mjerenja se najčešće izražavaju preko postotka preostalog DPPH radikala,

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

koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa, dok se sam antioksidativni kapacitet izražava preko IC_{50} . IC_{50} predstavlja onu koncentraciju antioksidansa potrebnu za smanjenje početne koncentracije $DPPH^{\bullet}$ za 50%. Veće IC_{50} vrijednosti predstavljaju manji antioksidativni kapacitet tako da je to nedostatak ovakvog načina izražavanja pošto može doći do nejasnoća. Također, nedostatak je što neke druge komponente poput karotenoida imaju apsorpcijski spektar u istom području valnih duljina kao i $DPPH^{\bullet}$ što može dovesti do krivih rezultata. Unatoč ovim nedostacima, metoda je jednostavna i brza što rezultira njenim čestim korištenjem u procjenama antioksidativnog kapaciteta (Prior i sur., 2005.; Flanjak, 2012.).

2.3.3.2. FRAP metoda

Spektrofotometrijska metoda koja se bazira na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju reducira žuti kompleks feri željeza (Fe^{3+}) sa TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ. Intenzitet nastale boje mjeri se pri 593 nm i proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Problem kod mjerenja je da svaka komponenta bez obzira ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a ima niži redoks potencijal od Fe^{3+}/Fe^{2+} parcijalne reakcije ($\sim 0,7$ V), dovest će do redukcije željeza iz feri u fero oblik te tako povećati FRAP vrijednost uzorka, odnosno dati laženo veće rezultate. Ova metoda je jednostavna i brza te ne zahtjeva specijalnu opremu za izvođenje (Prior i sur., 2005.; Flanjak, 2012.).

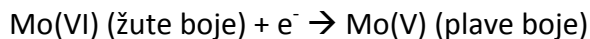
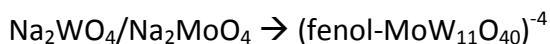


Slika 2: FRAP reakcija (Prior i sur., 2005.)

2.3.3.3. Određivanje ukupnih fenola

Mnoga istraživanja upućuju na poveznicu između fenolnih komponenti i antioksidativnog kapaciteta (Wilczynska, 2010.). Ukupni fenoli se određuju modificiranom Folin-Ciocalteu metodom na način da se Folin-Ciocalteu reagens, koji je smjesa

fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, u reakciji s fenolnim komponentama reducira i promijeni boju u plavu.



Intenzitet plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih komponenti, a promjena boje prati se pri valnim duljinama 745 – 765 nm. Ovako dobiven rezultat predstavlja redukcijsku sposobnost uzorka pošto i neke nefenolne komponente mogu reducirati reagens u određenim uvjetima. Unatoč tome, metoda je brza i jednostavna tako da se vrlo često primjenjuje za određivanje ukupnih fenola (Prior i sur., 2005.; Flanjak, 2012.).

2.4. ULJANA REPICA

Uljana repica je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka uspravne stabljike i sivozelenih listova te žutih cvjetova. Pripada porodici krstašica (Brassicaceae). Cvjeta u travnju u trajanju od 20 do 25 dana kada pčelama daje velike količine nektara i peludi, osobito ako su košnice unutar njezina uzgoja (Bačić i Sabo, 2007.).

Uzgoj uljane repice je najzastupljeniji u Europi i to najviše u njezinom središnjem i istočnom dijelu. Uzgaja se zbog sjemena koje se koristi za proizvodnju ulja, ali isto tako su njezin nektar i polen veoma privlačni pčelama od kojeg proizvode med od uljane repice. Značajne količine uniflornog meda od uljane repice u vrijeme proljeća dolaze upravo iz područja na kojima se najviše uzgaja uljana repica, središnje i istočne Europe. Med od uljane repice je svijetložute boje. Karakterizira ga brza kristalizacija te se često dodaje u druge medove kako bi potaknuo bržu i bolju kristalizaciju (Persano Oddo i sur., 2004.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak ovog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet meda od uljane repice kako bi se utvrdile specifičnosti obzirom na mali broj podataka o hrvatskom medu od uljane repice.

3.2. MATERIJALI I METODE

Analizirano je 8 uzoraka meda od uljane repice s kontinentalnog područja Republike Hrvatske.

U svrhu utvrđivanja botaničkog podrijetla i svježine uzoraka, provedena je peludna analiza prema metodi Louveaux i sur. (1978.) te određeni fizikalno-kemijski parametri: udio vode, električna provodnost, udio HMF-a (metodom po White-u), aktivnost enzima dijastaze, omjer fruktoze i glukoze te njihova suma (HPLC metodom) prema međunarodno priznatim metodama za analize meda (Bogdanov i sur., 1997.), a sve u skladu s propisima (Codex Alimentarius Commission, 2001.; Council of the European Union, 2002.; MPRRR, 2009., MPRRR, 2015.).

Udio ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidativni kapacitet DPPH i FRAP metodama.

Boja je određena pomoću Lovibond komparatora te spektrofotometrijskom metodom.

3.2.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Za određivanje ukupnih fenola primijenjena je modificirana spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda (Beretta i sur., 2005.). Metoda se bazira na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom u kiselom mediju pri čemu nastaje obojeni produkt. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji ukupnih fenola u otopini uzorka i mjeri se pri valnoj duljini od 750 nm.

Pripremljene otopine meda pomiješane su s 10%-tnim Folin-Ciocalteu reagensom. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi u tamnom, smjesi je izmjerena apsorbancija u odnosu na analog šećera (40% fruktoze, 30% glukoze, 8% maltoze i 2% saharoze) kao slijepu probu.

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

3.2.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom

Određivanje antioksidativnog kapaciteta mehanizmom hvatanja slobodnih radikala provedeno je DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) metodom (Beretta i sur., 2005.). Metoda se temelji na reakciji slobodnog radikala (DPPH•) i donora vodika (npr. fenolne skupine). Prilikom reakcije, otopina radikala DPPH•, koja je ljubičaste boje, reagira s antioksidansom pri čemu dolazi do redukcije, što se očituje u promjeni boje u žutu. Promjena apsorbancije mjeri se spektrofotometrijski pri 517 nm.

Iz polaznih otopina meda pripremljena su određena razrjeđenja. U alikvotni dio svakog od tih razrjeđenja dodan je natrijev acetatni pufer i DPPH reagens. Usporedno je za svaku otopinu priređena slijepa proba koja je sadržavala otopinu meda iste koncentracije i natrijev acetatni pufer, bez DPPH reagensa kako bi se eliminirao utjecaj boje. Pripremljenim otopinama nakon stajanja u tamnom na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija. Za svaku koncentraciju izračunao se postotak preostalog DPPH• prema jednadžbi:

$$\text{Preostali DPPH} \bullet (\%) = \frac{A - A_s}{A_k} * 100$$

gdje je: A – apsorbancija uzorka

A_s – apsorbancija slijepe probe

A_k – apsorbancija kontrolnog uzorka

Iz dobivenih rezultata nacrtana je ovisnost koncentracije meda u otopini c (mg/ml) o preostaloj količini DPPH• (%) i iz jednadžbe pravca izračunata koncentracija meda (mg/ml) potrebna za 50%-tno smanjenje početne koncentracije DPPH• (IC_{50}). Što je dobivena vrijednost za IC_{50} manja, veći je antioksidativni kapacitet uzorka.

3.2.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom

FRAP metoda je brza i jednostavna metoda za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta koja se temelji na redukciji željeza iz feri (Fe^{3+}) u fero (Fe^{2+}) oblik u prisutnosti antioksidansa pri niskom pH (pH 3,6). Nastali Fe^{2+} ioni u prisutnosti TPTZ reagensa (2,4,6-

tri(2-piridil-s-triazin) stvaraju plavo obojeni kompleks, sa maksimumom apsorbancije na 593 nm. Metodu su razvili Benzie i Strain 1996. godine, a Beretta i sur. (2005.) prilagodili metodu za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u medu.

Za izvedbu mjerenja dnevno je pripreman FRAP reagens koji se sastojao od 10 mM otopine TPTZ u 40 mM HCl, 20 mM željezo klorida ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) i 0,3 mM natrijevog acetatnog pufera (pH 3,6) u omjeru 1:1:10. Pripremljeni reagens tijekom analiza mora biti termostatiran na 37°C u vodenoj kupelji.

Pripremljene su otopine meda od kojih je uzet alikvotni dio te u taj dio dodavan je FRAP reagens. Nakon termostatiranja na 37°C kroz 10 minuta, smjesi je spektrofotometrom izmjerena apsorbancija pri 593 nm u odnosu na analog šećera kao slijepu probu. Vodene otopine željezo sulfata ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) u koncentracijskom rasponu od 500 do 1000 μM koristile su se za izradu kalibracijske krivulje pomoću koje je izračunata FRAP vrijednost (μM Fe(II) 10%-tne otopine meda).

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje boje

Intenzitet boje (neto apsorbancija, NA) definira se kao razlika izmjerenih apsorbancija, pri 450 i 720 nm ($A_{450} - A_{720}$), pomnožena s faktorom 1000, a mjeri se profiltriranoj 50%-tnoj vodenoj otopini meda (Beretta i sur., 2005.).

3.2.5. Određivanje boje pomoću Lovibond komparatora

Određivanje boje pomoću Lovibond komparatora temelji se na mjerenju transmitancije uzorka meda pri 430 i 530 nm (AOAC International, 2002.).

Transmitancija je izražena preko milimetara Pfundove skale koja je podijeljena u sedam kategorija: bezbojna (0 – 8 mm Pfund), jako bijela (9 – 17 mm Pfund), bijela (18 – 34 mm Pfund), jako svijetlo žuta (35 – 50 mm Pfund), svijetlo žuta (51 – 85 mm Pfund), žuta (86 – 114 mm Pfund), tamno žuta (> 114 mm Pfund) (United States Department of Agriculture, 1985.).

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je prosječna vrijednost i standardna devijacija te dani minimum i maksimum za sve analizirane parametre. Ispitana je korelacija

između udjela ukupnih fenola, antioksidativnog kapaciteta i boje analiziranih uzoraka meda, a povezanost parametara izražena je preko Pearsonovih koeficijenata korelacije uz odabranu razinu značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

Tablica 1 Peludna analiza i odabrani fizikalno-kemijski parametri ispitivanih uzoraka meda od uljane repice

UZORAK	PELUDNA ANALIZA	UDIO VODE (%)	ELEKTRIČNA PROVODNOST (mS/cm)	HMF (mg/kg)	AKTIVNOST DIJASTAZE (DN)	F/G	F+G (g/100 g)
U1	71	19,4	0,244	7,2	16,4	1,00	72,3
U2	71	19,9	0,273	11,3	10,2	1,05	72,0
U3	85	16,8	0,194	8,8	17,1	1,00	77,0
U4	87	16,6	0,195	5,2	16,6	1,00	77,9
U5	87	18,9	0,234	12,4	15,7	1,04	73,6
U6	71	19,0	0,283	6,5	24,8	1,03	73,2
U7	63	17,0	0,267	14,5	17,5	1,09	77,0
U8	67	18,5	0,316	14,1	17,9	1,04	76,9
$\bar{x} \pm SD$	75±10	18,3±1,3	0,251±0,042	10,0±3,5	17,0±3,9	1,00±0,03	75,0±2,4
MIN – MAX	63-87	16,6-19,9	0,194-0,319	5,2-14,5	10,2-24,8	1,00-1,09	72,0-77,9

Tablica 2 Rezultati mjerenja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta uzoraka meda od uljane repice

UZORAK	UKUPNI FENOLI (mg galne kiseline/kg meda)	FRAP (μ M (Fe)(II))	DPPH, IC ₅₀ (mg/ml)
U1	115,7	182,1	25,16
U2	113,5	184,8	25,20
U3	115,7	144,6	28,10
U4	108,2	151,1	29,09
U5	117,8	164,8	22,73
U6	145,1	220,1	18,42
U7	151,5	205,0	17,51
U8	152,6	232,3	21,26
$\bar{x} \pm SD$	127,5 \pm 18,8	185,6 \pm 31,8	23,43 \pm 4,23
MIN – MAX	108,2-152,6	144,6-232,3	17,51-29,09

Tablica 3 Rezultati određivanja boje meda od uljane repice

UZORAK	BOJA LOVIBOND (mm Pfund)	BOJA NA (mAU)
U1	39	375
U2	26	326
U3	41	322
U4	46	301
U5	28	281
U6	32	480
U7	46	410
U8	42	472
$\bar{x} \pm SD$	38±8	371±77
MIN – MAX	26-46	281-480

Tablica 4 Pearsonovi koeficijenti korelacije ($p < 0,05$) između ispitivanih parametara

	Boja	NA	Ukupni fenoli	DPPH	FRAP
Boja	1,000				
NA	0,190	1,000			
Ukupni fenoli	0,242	0,874*	1,000		
DPPH	0,089	-0,719*	-0,879*	1,000	
FRAP	-0,029	0,913*	0,876*	-0,817*	1,000

(*) statistički značajna korelacija pri $p < 0,05$; NA-boja određena spektrofotometrijski, DPPH-antioksidativni kapacitet određen DPPH metodom; FRAP- antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom

5. RASPRAVA

Zadatak ovog rada bio je odrediti udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet 8 uzoraka meda od uljane repice koji su prikupljeni od pčelara s područja kontinentalne Hrvatske.

Peludnom analizom je utvrđeno da ispitivani uzorci meda od uljane repice zadovoljavaju kriterije Pravilnika o kakvoći uniflornog meda, prema kojemu uniflorni med od uljane repice mora sadržavati više od 60% peludnih zrnaca uljane repice u netopljivom sedimentu (MPRRR, 2009.). Peludna analiza nije jedina pomoću koje se određuje botaničko podrijetlo meda, nego se ona kombinira i s ostalim metodama poput određivanja fizikalno-kemijskih parametara i senzorskom analizom (Kivima i sur., 2014.). U tu svrhu određeni su slijedeći fizikalno-kemijski parametri: udio vode, električna provodnost, udio hidroksimetilfurfurala (HMF), aktivnost enzima dijastaze (dijastatski broj ili DN), omjer fruktoze i glukoze te njihova suma, prikazani u **Tablici 1**.

Udio vode je važan parametar za određivanje kvalitete meda pošto ima utjecaj na rok trajanja samog meda (Kivima i sur., 2014.). Svi uzorci su zadovoljili kriterij (**Tablica 1**) koji propisuje Pravilnik o medu prema kojemu je granična maksimalna vrijednost za udio vode 20% (MPRRR, 2015.). Raspon rezultata iznosio je od 16,6% do 19,9%.

Električna provodnost je kriterij pomoću kojeg se može odrediti podrijetlo meda, odnosno pripada li med u skupinu nektarnih medova ili medljikovca. U spomenutom Pravilniku (MPRRR, 2015.) propisano je da ne smije prelaziti 0,800 mS/cm, ukoliko se radi o nektarnom medu. Također, i po ovom kriteriju svi uzorci meda od uljane repice (0,194 – 0,319 mS/cm) zadovoljili su Pravilnik što se vidi u **Tablici 1** te je utvrđeno je da ispitivani uzorci pripadaju u skupinu nektarnog meda.

Udio HMF-a i aktivnost enzima dijastaze pokazatelji su svježine meda, prekomjernog zagrijavanja te starenja meda. Prema Pravilniku o medu aktivnost dijastaze nakon miješanja mora biti najmanje 8, a ako je niža od 8, HMF ne smije biti veći od 15 mg/kg, dok udio HMF-a kao samostalan parametar ne smije prelaziti 40 mg/kg (MPRRR, 2015.). Iz rezultata udjela HMF-a (5,2 – 14,5 mg/kg) i aktivnosti dijastaze (10,2 – 24,8) prikazanih u **Tablici 1**, vidljivo je da su svi analizirani uzorci bili svježiji.

Omjer fruktoze i glukoze te njihove sume su jedni od parametara identifikacije meda i tendencije kristalizacije. Iz rezultata prikazanih u **Tablici 1** vidljivo je da uzorci meda od uljane repice imaju omjer fruktoze i glukoze $1,00 \pm 0,03$ što se može protumačiti da med od uljane repice vrlo lako kristalizira. Prema Adriana i sur. (2012.) omjer fruktoze i glukoze koji iznosi blizu 1,00 ukazuje na vrlo laku sposobnost kristalizacije meda, dok ona opada što je veći omjer F/G pa su tako one vrste meda s F/G iznad 1,30 tekuće kroz duži vremenski period.

Sadržaj ukupnih fenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, a rezultati su izraženi kao mg galne kiseline/kg meda. U analiziranim uzorcima udio ukupnih fenola kretao se u rasponu 108,2 – 152,6 mg galne kiseline/kg meda što je vidljivo u **Tablici 2**. Prema dostupnim literaturnim podacima primijećena su odstupanja u rezultatima primjerice prema Lachman i sur. (2010.) udio ukupnih fenola nalazio se u rasponu 94,3 – 119,2 mg galne kiseline/kg meda, kao i prema rezultatima Bobis i sur. (2011.) gdje je udio iznosio $896,4 \pm 34,8$ mg galne kiseline/kg meda. Međutim, rezultati ne mogu biti mjerodavno uspoređeni pošto se u navedenim istraživanjima koristila drugačija metodologija u određivanju udjela ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta u analiziranim uzorcima korištene su dvije metode, DPPH i FRAP metoda. Obje metode se odlikuju svojom jednostavnošću i brzinom, bez obzira na sitne nedostatke često se primjenjuju za određivanje antioksidativnog kapaciteta različitih vrsta uzoraka, ne samo meda.

Vrijednosti dobivene FRAP metodom izražene su u $\mu\text{M Fe(II)}$ i prikazane u **Tablici 2.**, a kretale su se od 144,6 $\mu\text{M Fe(II)}$ do 232,3 $\mu\text{M Fe(II)}$, dok je srednja vrijednost iznosila 185,6 $\mu\text{M Fe(II)}$ što je puno niže u odnosu na dostupne literaturne podatke za rumunjski med od uljane repice gdje prosječna FRAP vrijednost iznosi 986,0 $\mu\text{M Fe(II)}$ (Bobis, 2011.). S druge strane, istraživanjem koje je provedeno od strane Piljac-Žegarac i sur. (2009.) dobivena je FRAP vrijednost $52,22 \pm 6,14$ $\mu\text{M Fe(II)}$ što je niže od dobivenih vrijednosti prikazanih u **Tablici 2**, no navedeno istraživanje je rađeno na jednom uzorku meda od uljane repice te nije provedena peludna analiza kojom bi se pokazalo zadovoljava li taj uzorak propisane kriterije.

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. Dobiveni rezultati (**Tablica 2**) kretali su se u intervalu 17,51 – 29,09 mg/ml.

Ono što se primjećuje u **Tablici 4** je to da postoji visoka, statistički značajna, korelacija između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH ($r=-0,879$, $p<0,05$) i FRAP ($r=0,876$, $p<0,05$) metodama što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima koji upućuju na istu povezanost (Bobis i sur., 2011.; Lachman i sur., 2010.). Također, istraživanja pokazuju da tamnije vrste meda sadrže veći udio fenola, a samim time imaju i veći antioksidativni kapacitet (Bobis i sur., 2011.; Lachman i sur., 2010.; Wilczynska, 2010.). Povezanost boje meda i antioksidativnog kapaciteta prikazana je u **Tablici 4**, gdje je koeficijent korelacije između boje meda određene spektrofotometrijski i vrijednosti dobivenih DPPH metodom $r=-0,719$, a između boje i vrijednosti dobivenih FRAP metodom $r=0,913$. Negativan koeficijent korelacije kod DPPH metode je zbog toga što su rezultati izraženi preko IC_{50} odnosno veće vrijednosti IC_{50} znače manji antioksidativni kapacitet. Veće vrijednosti koeficijenta znače jaču povezanost između ispitivanih parametara.

Boja analiziranih uzoraka određena je dvjema metodama, spektrofotometrijski i pomoću Lovibond komparatora.

Rezultati mjerenja boje spektrofotometrijskom metodom prikazani su u **Tablici 3** i izraženi su kao neto apsorbancija (NA). Vrijednosti su se kretale u intervalu 281 – 480 mAU. Prema dostupnim literaturnim podacima (Piljac-Žegarac, 2007.) primijećeno je odstupanje u rezultatima. Naime, u navedenom istraživanju dobivena vrijednost iznosila je 211 mAU.

Prosječan iznos dobivenih vrijednosti (**Tablica 3**) iznosi $37,5\pm 7,9$ mm Pfund, čime su uzorci meda od uljane repice svrstani u kategoriju jako svijetlo žutih medova (35 – 50 mm Pfund). Međutim, raspon koji se nalazi u Opisnim listama glavnih europskih uniflornih vrsta meda (Persano Oddo i sur., 2004.) je nešto manji od dobivenih rezultata, a iznosi 20,0 – 34,3 mm Pfund i time se svrstava u kategoriju bijelih vrsta medova. Naime, boja ovisi o botaničkom podrijetlu i samom kemijskom sastavu meda, a kemijski sastav ovisi o različitim parametrima poput zemljopisnog položaja, klimatskih uvjeta i pasmine pčela (Lachman i sur., 2010.).

Uspoređujući med od uljane repice s drugim vrstama meda koje se najčešće proizvode u Hrvatskoj može se reći da se med od uljane repice nalazi u sredini po udjelu ukupnih fenola i antioksidativnom kapacitetu. Naime, postoje vrste s visokim antioksidativnim kapacitetom poput meda od kestena i medljikovca, a postoje i one s nižim antioksidativnim kapacitetom poput bagremovog meda.

6. ZAKLJUČAK

Proizvodnja meda od uljane repice karakteristična je za kontinentalni dio Republike Hrvatske.

Karakteristika ove vrste meda je brza kristalizacija što je posljedica visokog udjela glukoze. Prema boji pripada u skupinu jako svijetlo žutih medova. Udio ukupnih fenola bio je $127,5 \pm 18,8$ mg galne kiseline/kg meda, a antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom $185,6 \pm 31,8$ μ M Fe(II) te onaj određen DPPH metodom $23,4 \pm 4,2$ mg/ml.

Na temelju provedenih analiza i statističke obrade rezultata utvrđeno je da su rezultati statistički značajni, uz izuzetak povezanosti boje određene pomoću Lovibond komparatora i ostalih odabranih parametara. Najveća korelacija se utvrdila između boje meda određen spektrofotometrijski (NA) i FRAP vrijednosti, gdje je koeficijent korelacije iznosio $r=0,913$ ($p<0,05$).

Iako se med ne može smatrati značajnim izvorom antioksidanasa u našoj prehrani, svakako ga treba uključiti u prehranu. Osim što može pomoći zdravlju organizma, ima veliku energetska vrijednost.

7. LITERATURA

- Adriana C, Szabo E, Borbely M, Czipa N, Purcarea C: Comparative study of acacia and rape honey. *Analele Universitatii din Oradea. Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentara* 325-332, 2012.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Diaz, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Bompadre S, Battino M: Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology* 48:2490-2499, 2010.
- Anklam E: A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63:549-562, 1998.
- AOAC International (2002.): AOAC Official Method 985.25 Color Classification of Honey. In: *Official methods of analysis*. 17th ed., rev. 1, Ch 44. Gaithersburg, Maryland: 22
- Bačić T, Sabo M: *Najvažnije medonosne biljke u Hrvatskoj*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM: Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 533:185-191, 2005.
- Bertoncelj J, Doberšek U, Jamnik M, Golo T: Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105(2):822-828, 2007.
- Bobis O, Marghitas L, Dezmirean D, Chirila F, Moritz R: Preliminary Studies Regarding Antioxidant and Antimicrobial Capacity for Different Types of Romanian Honeys. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 68(1-2):91-97, 2011
- Bogdanov S, Martin P, Lüllman C: Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie (extra issue)* 28:1-59, 1997.
- Bravo L: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11):317-333, 1998.
- Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standard for honey. *Alinorm*, 19-26, 2001.
- Council of the European Union: Council Directive 2001/110/EC of Dec 20, 2001, relating to honey. *Official Journal of European Community*, L10:47-52, 2002.

- Flanjak I: Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.
- Kivima E, Seiman A, Pall R, Sarapun E, Martverk K, Laos K: Characterization of Estonian honeys by botanical origin. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 63(2):183-192, 2014.
- Lachman J, Hejtmankova A, Sykora J, Karban J, Orsak M, Rygerova B: Contents of Major Phenolic and Flavonoid Antioxidants in Selected Czech Honey. *Czech Journal of Food Sciences* 28:412-426, 2010.
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G: Methods of melissopalynology. *Bee world* 59:139-157, 1978.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o kakvoći uniflornog meda*. Narodne novine 122/09, 2009.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Pravilnik o medu*. Narodne novine 53/15, 2015.
- Persano Oddo L, Piro R: Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35:38-81, 2004.
- Piljac-Žegarac J, Stipčević T, Belščak A: Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(2):43-50, 2009.
- Prior RL, Wu X, Schaich K: Standardised methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290-4302, 2005.
- United States Department of Agriculture: *United States Standards for Grades of Extracted Honey*, 1985. <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3011895> [14.09.2015.]
- Vit P, Rodriguez-Malaver A, Rondon C, Gonzalez I, Di Bernardo M, Garcia M: Bioactive indicators related to bioelements of eight unifloral honeys. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutricion* 60:405-410, 2010.

White JW, Doner LW: Honey composition and properties. *Beekeeping in the United States: Agriculture Handbook* 335:82-91, 1980.

Wilczynska A: Phenolic content and antioxidant activity of different types of Polish honey-a short report. *Polish journal of Food and Nutrition Sciences* 60:309-313, 2010.