Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od vriska (Satureja montana L.)

Buljeta, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:080101

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Ivana Buljeta

Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od vriska (Satureja montana L.)

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 vriska (*Satureja montana* L.)

Nastavni predmet

Kontrola kakvoće hrane

Student/ica: Ivana Buljeta (MB: 3580/12)

Mentor: dr. sc. Ivana Flanjak, docent

Predano (datum):

Pregledano (datum):

Ocjena: **Potpis mentora:**

Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od vriska (*Satureja montana* L.*)*

Sažetak:

Antioksidativni kapacitet meda jedno je od najispitivanijih dokazanih pozitivnih svojstava meda. Uglavnom ovisi o botaničkom podrijetlu, a najčešće se povezuje s udjelom ukupnih fenola i bojom meda. Na uzorcima meda od vriska provedena je peludna analiza i određeni sljedeći fizikalno-kemijski parametri: udio vode, električna provodnost, boja, aktivnost dijastaze, udio HMF-a, te udio šećera. Antioksidativni kapacitet je određen FRAP i DPPH metodama, dok je udio fenola određen Folin-Ciocalteu metodom. Rezultati analiza pokazali su da med od vriska karakterizira svijetlo žuta boja i spora kristalizacija. Udio ukupnih fenola kretao se u rasponu od 114,1 do 192,8 mg galne kiseline/kg meda. Antioksidativni kapacitet određen DPPH metodom iznosio je 11,48 – 19,21 mg/ml, a FRAP metodom 286,5 – 506,4 µM Fe(II). Visoke statistički značajne korelacije utvrđene su između boje, udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta.

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

Antioxidant capacity and physicochemical parameters of winter savory (*Satureja montana* L.)

Summary:

Antioxidant capacity of honey is one of the most investigated therapeutic properties of honey. It mostly depends on botanical origin, and is usually associated with the total phenolic content and honey colour. After pollen analysis, was performed, following physicochemical parameters were determined: water content, electrical conductivity, colour, diastase activity, HMF content, and sugar content. Antioxidant capacity was determined by FRAP and DPPH methods, while phenolic content was determined by modified Folin-Ciocalteu method. The results showed that winter savory honey is characterized by light amber colour and slow crystallization. Total phenolic content ranged from 114,1 to 192,8 mg of gallic acid/kg honey. Antioxidant capacity determined by DPPH method was from 11,48 to 19,21 mg/ml, while the results of FRAP method were from 286,5 to 506,4 µM Fe(II). High statistically significant correlations were found between colour, total phenolic content and antioxidant capacity.

Keywords: winter savory 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

2.3. ZDRAVSTVENI ASPEKT UPORABE MEDA 6

2.4. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET 6

2.4.1. Antioksidansi, slobodni radikali i oksidativni stres 6

2.4.2. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta 7

2.4.3. Antioksidativni kapacitet meda 10

2.5. VRISAK 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. ZADATAK RADA 14

3.2. MATERIJALI I METODE 14

3.2.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom 14

3.2.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom 15

3.2.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom 15

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje boje 16

3.2.5. Određivanje boje pomoću Lovibond komparatora 16

3.2.6. Statistička obrada rezultata 17

4. REZULTATI 18

5. RASPRAVA 23

6. ZAKLJUČAK 27

7. LITERATURA 29

1. UVOD

Okus i aroma su dvije najvažnije osobine meda. Sladak okus meda uglavnom potječe od ugljikohidrata koji čine 80% meda, uz prisutnost kiselog i/ili gorkog okusa. Složene mješavine hlapivih spojeva odgovorne su za aromu, a prisutnost i koncentracija hlapivih spojeva ovisi o podrijetlu nektara, preradi i skladištenju. Obje osobine doprinose kvaliteti, ali i pomažu u autentičnosti meda (De la Fuente i sur., 2007.).

Neke od hlapivih komponenata koje su identificirane u medu od vriska su: 2-feniletanol, dimetil sulfid, 3-metil-1-butanol, benzaldehid i nonanal (De la Fuente i sur., 2007.).

Dio komponenata meda potječe od nektara/peludi, odnosno od same biljke, dok neke komponente dodaju pčele tijekom zrenja meda (Di Marco i sur., 2012.).

Antioksidativna svojstva meda i preventivni učinci protiv različitih bolesti, kao što su tumori, pripisuju se najvećim dijelom fenolnim komponentama, točnije flavonoidima, fenolnim kiselinama i derivatima fenolnih kiselina, ovisno o njihovim koncentracijama ili omjerima. Njihova prisutnost i količina u medu ovise o botaničkom podrijetlu, klimatskim uvjetima, sezonskim i okolišnim čimbenicima, obradi i geografskom položaju (Malenica Staver i sur., 2014.).

Zadatak ovog rada bio je karakterizirati med od vriska s naglaskom na antioksidativni kapacitet, obzirom da je vrlo mali broj podataka dostupan o ovoj uniflornoj vrsti meda karakterističnoj za područje Jadranske Hrvatske.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA I PODJELA MEDA

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

Prema Pravilniku o medu, med je sladak, gust, viskozan, 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 (MPRRR, 2015.).

Nektarni med pčele proizvode skupljanjem nektara različitih medonosnih biljaka, dok medljikovac nastaje od medne rose (MPRRR, 2015.).

2.2. KEMIJSKI SASTAV MEDA

Med ima vrlo varijabilan sastav, te navođenje prosječnog sastava meda ima ograničenu vrijednost (White, 2000.). Neke od komponenata meda potječu od same pčele, neke od medonosne biljke, dok neke nastaju ili se mijenjaju tijekom zrenja meda (Flanjak, 2012.).

Komponente koje čine glavninu meda su ugljikohidrati i voda, dok su u manjim količinama zastupljene organske kiseline, mineralne tvari, pigmenti, vitamini, proteini (uključujući i enzime), komponente arome i fenolne komponente (White, 2000.).

Udio vode u medu se kreće od 13 do 25 % te čini jednu od najvažnijih karakteristika meda koja ima utjecaj na kakvoću, kristalizaciju i održivost. Čimbenici koji utječu na količinu vode u medu su: klimatski uvjeti, pasmina pčela, podrijetlo i sastav nektara, uvjeti procesiranja i skladištenja (White, 2000.).

Najveći dio ugljikohidrata u medu pripada monosaharidima, D-fruktozi i D-glukozi (85 – 95 % ukupnih ugljikohidrata) (White, 2000.). U medu je identificirano, osim monosaharida, oko 25 različitih disaharida, trisaharida i oligosaharida (Anklam i Radovic, 2002.; Ruiz-Matute i sur., 2010.). U većini se slučajeva u medu nalazi veća količina fruktoze nego glukoze, ali postoje neke vrste (med od uljane repice, suncokreta, maslačka) u kojim prevladava glukoza. Odnos

fruktoze i glukoze jedan je od parametara identifikacije meda i njegova vrijednost je obično viša od 1 (Flanjak, 2012.).

U medu se nalaze male količine proteina (do 0,2 %) i uglavnom potječu od pčele, te se mogu koristiti kao pokazatelji čistoće i patvorenja meda (Won i sur., 2008.). Proteini se mogu koristiti kao parametar za određivanje botaničkog podrijetla iz razloga što dio proteina u med dospijeva iz biljke (nektara i peludi), ali mnogo su bolji pokazatelj slobodne aminokiseline u medu. Najzastupljenija aminokiselina je prolin koji čini 50 – 85 % ukupnih aminokiselina u medu (González Paramás i sur., 2006.; Hermosín i sur., 2003.). Najveći dio proteina u medu čine enzimi (dijastaza, invertaza, glukoza-oksidaza, katalaza, kisela fosfataza). Njihova aktivnost smatra se pokazateljem kakvoće meda, stupnja zagrijavanja i uvjeta skladištenja (Flanjak, 2012.).

Organske kiseline, prisutne u malim količinama u medu, su odgovorne za senzorska svojstva odnosno miris i okus, te stabilnost s obzirom na mikrobiološko kvarenje meda. Glukonska kiselina je najzastupljenija, a ona nastaje djelovanjem enzima glukoza-oksidaze na glukozu. Ostale kiseline koje su zastupljene u medu su mravlja, octena, maslačna, jantarna, jabučna, oksalna, vinska, limunska, mliječna itd. pH vrijednost meda je ovisna o njegovom botaničkom podrijetlu. Za nektarni med pH vrijednost se kreće između 3,3 i 4,6 dok je za medljikovac i med od kestena 4,5 i 6,5 (Flanjak, 2012.).

Mineralne tvari u medu su prisutne u malim količinama (0,02 – 1,03 %), ali su važan parametar za kakvoću i nutritivnu vrijednost meda. Svjetlije vrste meda sadrže manje mineralnih tvari od tamnijih vrsta meda. Činjenica da mineralne tvari, koje se nalaze u medu, potječu od same biljke s koje pčela skuplja nektar, može se koristiti kao indikator botaničkog podrijetla meda (Bogdanov i sur., 2007.). Mineral, koji je najzastupljeniji u medu, je kalij, ali u manjoj količini prisutni su i natrij, kalcij, magnezij, bakar, željezo, sumpor, fosfor, silicij, mangan (Anklam, 1998.). Sastav i udio mineralnih tvari je povezan s električnom provodnosti, koja je dobar parametar za razlikovanje nektarnog meda od medljikovca (Primorac i sur., 2011.).

Fenolne komponente nastaju kao sekundarni produkti metabolizma biljaka i obično su uključene u obrambene mehanizme biljaka. Fenolne komponente koje su prisutne u medu dijele se na 3 skupine: flavonoid aglikoni, benzojeva kiselina i njezini esteri, te cimetna

kiselina i njezini esteri. Izvor fenolnih komponenata u medu većinom su cvjetni nektar i propolis, ali i pelud u manjoj mjeri (Flanjak, 2012.).

Vrlo male količine vitamina se mogu pronaći u medu čije je podrijetlo većinom iz nektara i peludi. Vitamini pronađeni u medu su: vitamin C, B_1 (tiamin), B_2 (riboflavin), B_3 (niacin), B_5 (pantotenska kiselina), B_6 (piridoksin) i vitamin K (White, 2000.).

2.3. ZDRAVSTVENI ASPEKT UPORABE MEDA

Med se u prošlosti koristio kao sladilo, ali i za liječenje rana, kožnih bolesti, ublažavanja kašlja i dr. Kako su se pozitivna svojstva meda bazirala samo na iskustvima, javila se potreba da se znanstveno dokažu njegovi učinci na zdravlje (Jones, 2001.).

Istraživanja su pokazala kako med ima baktericidno i bakteriostatsko djelovanje na mnoge bakterije, od kojih su mnoge patogene. Čimbenici koji su odgovorni za antimikrobnu aktivnost meda su visoki osmotski tlak, niska pH vrijednost, ali posebno vodikov peroksid koji nastaje tijekom zrenja meda, razgradnjom glukoze (Flanjak, 2012.). Novija istraživanja upućuju na to kako antimikrobne komponente meda inhibiraju razvoj bakterije *Helicobacter pylori* u organizmu (Manyi-Loh i sur., 2011.).

Oligosaharidi prisutni u medu potiču razvoj bakterija roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, što se može smatrati kao probiotičko svojstvo meda (Manyi-Loh i sur., 2011.).

2.4. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET

Antioksidativni kapacitet predstavlja mjeru sposobnosti reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija kako u hrani, tako i u organizmu.

2.4.1. Antioksidansi, slobodni radikali i oksidativni stres

Antioksidansi su tvari koje, iako su prisutne u malim količinama, štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i sprječavaju izazivanje oksidativnog stresa u ljudskom organizmu. Primarni antioksidansi djeluju tako što hvataju i neutraliziraju reaktivne

kisikove i dušikove vrste, i na taj način zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja slobodnih radikala. Dobri hvatači slobodnih radikala su fenolne komponente. Preventivni antioksidansi (npr. superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza) sprječavaju inicijacijsko stvaranje slobodnih radikala ili smanjuju brzinu kojom se provodi daljnja lančana reakcija (Flanjak, 2012.).

Oksidativni stres u hrani i ljudskom organizmu nastaje kao posljedica neravnoteže između nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (prvenstveno radikala) i antioksidativne obrane organizma. Reaktivne kisikove vrste, iako su u malim količinama, mogu uzrokovati oksidaciju bitnih makromolekula kao što su nukleinske kiseline, lipidi, proteini i šećeri. Slobodni radikali (superoksid anion $^{\bullet}O_2^-$, hidroksil-radikal $^{\bullet}OH$, alkoksil-radikal $RO^{\bullet}$, peroksil-radikal $ROO^{\bullet}$) u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Vrlo su reaktivni i nestabilni zbog toga što nastoje da postignu stabilnu strukturu popunjavajući valentnu orbitalu. Kada slobodni radikali napadnu drugu molekulu, ona gubi svoje elektrone i postaje slobodni radikal, te tako dolazi do lančanih reakcija i nastanka štetnih spojeva. Prooksidativni enzimi, UV zračenje, ionizirajuće zračenje, onečišćivači iz zraka i nepravilna prehrana su čimbenici koji doprinose stvaranju slobodnih radikala. Dokazana je povezanost između prekomjernog nastanka slobodnih radikala i pojave degenerativnih bolesti (ateroskleroze, karcinoma, astme, hepatitisa, dermatitisa, bolesti krvožilnog sustava i starenja) (Lee i sur., 2004.; Flanjak, 2012.).

2.4.2. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta

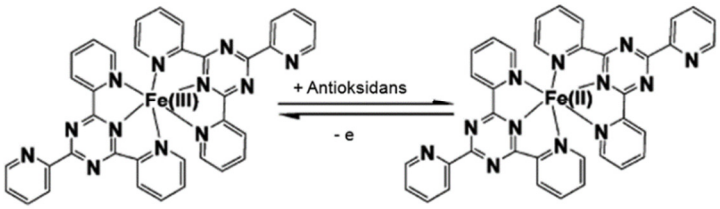
U literaturi je dostupno mnogo metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta, ali glavni problem je nestandardiziranost metoda. Niti jedna metoda ne prikazuje mehanizme djelovanja svih slobodnih radikala i svih antioksidanasa koji su prisutni u kompleksnom sustavu kao što je organizam ili hrana. Zbog toga se često kombinira više metoda kako bi se dobio profil aktivnosti svih prisutnih antioksidanasa. Dva su osnovna mehanizma preko kojih antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale: SET mehanizam i HAT mehanizam (Flanjak, 2012.).

Metode koje rade na principu SET mehanizma (*prijenos elektrona*) mjere sposobnost antioksidansa da donira elektron i tako reducira komponente, uključujući metale, karbonile i radikale. Ove metode su ovisne o otapalu i pH vrijednosti, te su relativno spore. Kod metoda koje rade na principu SET mehanizma uobičajeno je da se mjeri postotak smanjenja koncentracije slobodnog radikala. Metode su osjetiljive na askorbinsku i mokraćnu kiselinu, a do pogrešnih rezultata mogu dovesti elementi u tragovima i kontaminanti (posebno metali). U reakciji probna tvar, koja je ujedno i oksidans, prima elektron od antioksidansa i kao rezultat dolazi do promjene boje probne tvari, čiji je intezitet proporcionalan koncentraciji antioksidansa. SET mehanizam ne uključuje kompeticijsku kinetiku. Metode koje se najčešće koriste za mjerenje antioksidativnog kapaciteta su: FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power)*, DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) i TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Flanjak, 2012.).

Metode koje rade na principu HAT mehanizma *(prijenos vodikovog atoma)* mjere sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima donirajući vodikov atom. Metode su brze, ne ovise o otapalu i pH vrijednosti sustava. U reakcijskom mehanizmu generator slobodnih radikala oksidira probnu tvar, a antioksidans se s probnom tvari natječe za slobodne radikale. Jedan od nedostataka je taj što prisutnost drugih reducirajućih komponenata, uključujući i metale, može dovesti do pogrešaka u rezultatima. Metode koje se zasnivaju na HAT mehanizmu, a najčešće se koriste su: ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parametar*) i metoda izbjeljivanja krocina (*Crocin bleachng assay*) (Flanjak, 2012.).

FRAP metoda

FRAP metoda se bazira na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reducira žuti kompleks feri željeza (Fe^{3+}) sa TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+}-TPTZ. Spektrofotometrijski se mjeri intenzitet nastale plave boje pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa.



Fe^{3+}-TPTZ (žute boje) Fe^{2+}-TPTZ (plave boje)

Slika 1: FRAP reakcija (Huang i sur., 2005.)

Nedostatak ove metode je taj što će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a posjeduje niži redoks potencijal od Fe^{3+}/Fe^{2+} parcijalne razlike (~0,7 V), dovest do redukcije željeza iz feri u fero oblik i tako povećati FRAP vrijednost uzorka (dati će lažno veće rezultate). Pozitivne karakteristike ove metode jesu njena već spomenuta brzina, jednostavnost, robusnost, niska cijena, te ne zahtijeva specijalnu opremu za izvođenje (Karadag i sur., 2009.; Flanjak, 2012.).

DPPH metoda

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal je jedan od rijetko stabilnih oblika dušikovih radikala i komercijalno je dostupan. U reakciji s antioksidansima, DPPH radikal se reducira u hidrazin. Redukcijska sposobnost hvatanja DPPH radikala prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 515-528 nm (Prior i sur., 2005.; Flanjak, 2012.). DPPH radikal apsorbira svjetlost na 515 nm. U reakciji s antioksidansima ili slobodnim radikalima dolazi do smanjenja apsorbancije čiji se intenzitet prati spektrofotometrijski.

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

Male molekule, zbog boljeg pristupa reaktivnom mjestu, pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom. Najčešće se sposobnost hvatanja slobodnih radikala izračunava preko postotka preostalog $DPPH^{\bullet}$. Postotak preostalog $DPPH^{\bullet}$ je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Drugi način izražavanja antioksidativnog kapaciteta nekog uzorka jest preko IC_{50} koja označava koncentraciju antioksidansa koja je potrebna za

smanjenje početne koncentracije DPPH$^{\bullet}$ za 50 %. Veće vrijednosti IC_{50} znači manji antioksidativni kapacitet uzorka, pa može doći do nejasnoća posebno prilikom grafičkog prikaza rezultata. Neke komponente (kao što su karotenoidi) imaju apsorpcijski spektar u istom području valnih duljina kao i DPPH, te mogu smetati pri mjerenju. Razlozi zbog kojih se ova metoda često koristi su njena jednostavnost i brzina, te jeftina oprema za njeno provođenje (Prior i sur., 2005.; Huang i sur., 2005.).

Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli se određuju kao dobar pokazatelj antioksidativnog djelovanja. Istraživanja su pokazala povezanost između udjela fenolnih komponenata (prvenstveno flavonoida i fenolnih kiselina) i antioksidativnog kapaciteta (Flanjak, 2012.). Određivanje ukupnih fenola je spektrofotometrijska metoda i provodi se Folin-Ciocalteu metodom. Ova se metoda prvenstveno koristila za određivanje proteina. Nakon modifikacije, metoda se koristi za određivanje udjela ukupnih fenola u različitim vrstama namirnica (Singleton i sur., 1999.). Folin-Ciocalteu reagens se sastoji od fosfovolframvoske i fosfomolibdenske kiseline. Spomenute se kiseline, u reakciji s fenolnim komponentama, reduciraju u plavo obojene okside. Intenzitet plavog obojenja je u proporcionalnom odnosu sa koncentracijom fenolnih komponenata. Promjena se boje prati na valnim duljinama od 745 nm do 765 nm (Prior i sur., 2005.; Flanjak, 2012.). Rezultat, koji je dobiven, obuhvaća zajedno sa ukupnim fenolima i druge reducirajuće nefenolne komponente u uzorku. Bez obzira na nedostatke metoda se često koristi zbog svoje brzine i jednostavnosti (Singleton i sur., 1999.; Prior i sur., 2005.; Flanjak, 2012.).

2.4.3. Antioksidativni kapacitet meda

Posljednjih dvadesetak godina antioksidativni kapacitet meda se sve više istražuje. Točan mehanizam djelovanja i kemijska struktura komponenata koje su odgovorne za njegovo antioksidativno djelovanje nisu u potpunosti poznati. Istraživanja znanstvenika su dokazala kako antioksidativni kapacitet meda nastaje kao rezultat sinergističkog djelovanja enzima, fenolnih komponenata, aminokiselina, produkata Maillardovih reakcija, organskih kiselina,

derivata karotenoida i askorbinske kiseline (Frankel i sur., 1998.; Flanjak, 2012.). Antioksidansi koji se nalaze u medu ovise prvenstveno o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu meda (Frankel i sur., 1998.). Za određivanje antioksidativnog kapaciteta meda ne postoji standardna metoda, nego se kombiniraju metode sa različitim mehanizmima djelovanja. Najčešće su korištene spektrofotometrijske/fluorimetrijske metode kao što su FRAP, DPPH, TEAC i ORAC metode zajedno s određivanjem ukupnih fenola (Flanjak, 2012.).

Različitih znanstvenika, dokazali kako postoji povezanost između antioksidativnog kapaciteta meda s udjelom fenola i bojom (Beretta i sur., 2005, Bertoncelj i sur., 2007, Flanjak, 2012). Također su utvrdili kako tamnije vrste meda imaju mnogo veći antioksidativni kapacitet od vrsta koje su svjetlije.

2.5. VRISAK

Vrisak je biljka koja pripada porodici *Lamiaceae* i rasprostranjena je u mediteranskom području. U cijelom svijetu koristi se kao biljka za medicinske svrhe, ali i kao začin. Vrisak (*Satureja montana L.*) je višegodišnji polugrm s drventastom stabljikom, linearnim listovima i blijedo ružičastim cvjetovima. Poznat je kao jedna od najboljih biljaka koje se koriste za proizvodnju meda, te se za med od vriska kaže da je dobar za liječenje bronhitisa. Cijela biljka je bogata esencijalnim uljem, koje je bogato biološki aktivnim fitokemikalijama, poput karvakrola, timola, β-karofilena, γ-terpinena i drugih, koje posjeduju snažnu antioksidativnu aktivnost (Wesołowska i sur., 2014.).

Vrlo je rasprostranjena biljka na kršu Crne Gore, Hercegovine, Dalmacije, dijela Bosne, Like i Hrvatskog primorja. Iz drvenastog dijela svakog proljeća izbiju guste mladice, a u jesen djelomično propadnu. Vrisak počinje cvasti već na koncu srpnja ili prvih dana kolovoza, a cvatnja mu zavisi o kiši. Glavna cvatnja traje oko 30 dana (Belčić i sur., 1990).

Nema medonosnije biljke od vriska, ne samo po dnevnim prinosima nego i po ukupnoj količini meda što je pčele s njega saberu. Na pitanje pod kakvim uvjetima vrisak medi nitko ne zna odgovoriti. S bijelog vriska med je svijetlo žut i malo zelenkast, a s ljubičastog nešto

tamniji. Jedan i drugi jakog su mirisa po biljci, vrlo ugodnog okusa. Med od vriska spada u najfinije vrste meda (Belčić i sur., 1990).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak je rada bio odrediti fizikalno-kemijske parametre, udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet meda od vriska, obzirom da je vrlo mali broj podataka dostupan o ovoj vrsti meda.

3.2. MATERIJALI I METODE

Analizirano je 11 uzoraka meda od vriska sa jadranskog područja Republike Hrvatske sakupljenih tijekom 2014. godine.

Za potrebu utvrđivanja botaničkog podrijetla i svježine uzoraka, provedena je peludna analiza prema metodi Louveaux i sur. (1978.), te su određeni fizikalno-kemijski parametri: udio vode, električna provodnost, udio HMF-a (metodom po White-u), aktivnost enzima dijastaze, udio ugljikohidrata (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.).

3.2.1. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Kako bi se odredio udio ukupnih fenola korištena je modificirana spektrofotometrijska Folin-Ciocalteu metoda (Vinson i sur., 2001.; Beretta i sur., 2005.).

U destiliranoj vodi je otopljeno 15 g meda, te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 50 ml. 0,1 ml otopine meda je pomiješan sa 1 ml 10 % Folin-Ciocalteu reagensa. Smjesa se miješala 2 minute na električnoj miješalici i ostavila stajati 20 minuta na sobnoj temperaturi u tamnom. Nakon toga je izmjerena apsorbancija pri 750 nm u odnosu na analog šećera kao slijepu probu. Pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline (0,02 – 0,2 mg/ml) izračunata je koncentracija ukupnih fenola, a rezultati su izraženi kao mg galne kiseline po kg meda.

3.2.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom

FRAP metoda je opće prihvaćena metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta, a razvili su je Benzie i Strain 1996. godine. Beretta i sur. (2005.) prilagodili su metodu za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u medu.

Kako bi se provelo mjerenje pripremljen je FRAP reagens, koji se sastojao od 10 mM otopine TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) u 40 mM HCl, 20 mM željezo klorida ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) i 0,3 M natrijevog acetatnog pufera (pH 3,6) u omjeru 1:1:10. Tijekom analize reagens koji je pripremljen mora biti termostatiran na 37°C u vodenoj kupelji. U destiliranoj vodi je otopljeno 5 g meda, te je sve kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 50 ml. Pomiješan je alikvot od 0,2 ml otopine meda sa 1,8 ml FRAP reagensa. Nakon termostatiranja na 37°C u vremenu od 10 minuta smjesi je izmjerena apsorbancija pri 593 nm u odnosu na analog šećera (slijepu probu). Analog šećera sastojao se od 40 % fruktoze, 30 % glukoze, 8 % maltoze i 2 % saharoze, a koristio se kao provjera interferiraju li šećeri kao glavni sastojak meda prilikom provedbe navedenih analiza. Za izradu kalibracijske krivulje, pomoću koje je izračunata FRAP vrijednost (µM Fe(II) 10%-tne otopine meda), koristile su se vodene otopine željezo sulfata ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) u koncentracijskom rasponu od 50 do 1000 µM.

3.2.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) metoda je metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta mehanizmom hvatanja slobodnih radikala (Beretta i sur., 2005.).

U odmjernu tikvicu od 25 ml kvantitativno je prenesena otopina 15 g meda i destilirane vode. Pripremljena su razrjeđenja iz polazne otopine meda. Koncentracija meda u reakcijskim otopinama bila je u rasponu od 30 – 600 mg/ml. Iz svake je otopine uzet alikvot od 0,1 ml te je dodan 1 ml natrijevog acetatnog pufera (pH 5,5) i 1,9 ml 130 mM DPPH reagensa u apsolutnom etanolu. Paralelno je, za svaku otopinu, pripremljena slijepa proba u kojoj se nalazila otopina meda iste koncentracije i natrijev acetatni pufer, ali bez DPPH reagensa kako bi se eliminirao utjecaj boje meda. Za kontrolni je uzorak korišten analog

šećera. Pripremljene otopine su promiješane na električnoj miješalici i ostavljene u tamnom, na sobnoj temperaturi, u trajanju od 90 minuta. Nakon toga je svakoj otopini izmjerena apsorbancija pri 517 nm, te se za svaku koncentraciju izračunao postotak preostalog DPPH• prema jednadžbi:

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

gdje je: A – apsorbancija uzorka

A_s – apsorbancija slijepe probe

A_k – apsorbancija kontrolnog uzorka

Iz rezultata koji su dobiveni, nacrtana je ovisnost koncentracije meda u otopini c (mg/ml) o preostaloj količini DPPH• (%). Iz jednadžbe pravca je izračunata koncentracija meda (mg/ml) koja je potrebna da se početna koncentracija DPPH• smanji za 50 % (IC_{50}). Antioksidativni kapacitet meda je veći što je dobivena vrijednost za IC_{50} manja.

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje boje

Intenzitet boje (neto apsorbancija, NA) definira se kao razlika izmjerenih apsorbancija (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, 2000.).

Transmitancija je izražena preko milimetara Pfundove skale koja je podijeljena u sedam kategorija (**Tablica 1**).

Tablica 1 Klasifikacija boje meda prema Pfundovoj skali (White, 2000.)

USDA standardi boje	Pfundova skala [mm]
Bezbojna	0 – 8
Jako bijela	9 – 17
Bijela	18 – 34
Jako svijetlo žuta	35 – 50
Svijetlo žuta	51 – 85
Žuta	86 – 114
Tamno žuta	>114

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati su statistički obrađeni, izračunata je srednja 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 2 Peludna analiza i odabrani fizikalno-kemijski parametri ispitivanih uzoraka meda od vriska

UZORAK	PELUDNA ANALIZA	UDIO VODE (%)	ELEKTRIČNA PROVODNOST (mS/cm)	HMF (mg/kg)	AKTIVNOST DIJASTAZE (DN)	F/G	F+G (g/100 g)
V1	Zadovoljava	16,5	0,351	3,8	27,0	1,51	70,4
V2	Zadovoljava	16,3	0,231	4,4	21,7	1,54	73,1
V3	Zadovoljava	17,1	0,257	3,9	31,1	1,54	70,9
V4	Zadovoljava	17,3	0,242	3,4	20,4	1,53	71,6
V5	Zadovoljava	16,4	0,254	5,1	27,8	1,51	70,9
V6	Zadovoljava	18,8	0,198	2,7	20,0	1,58	70,7
V7	Zadovoljava	18,6	0,296	3,5	29,9	1,53	70,3
V8	Zadovoljava	18,2	0,283	4,6	28,5	1,44	70,5
V9	Zadovoljava	16,8	0,506	3,7	41,7	1,49	69,5
V10	Zadovoljava	18,2	0,271	8,6	17,9	1,65	69,7
V11	Zadovoljava	15,8	0,201	7,0	23,4	1,59	73,9
$\bar{x} \pm SD$	-	17,3±1,0	0,281±0,086	4,6±1,7	26,3±6,7	1,50±0,06	71,0±1,4
MIN – MAX	-	15,8-18,8	0,198-0,506	2,7-8,6	17,9-31,1	1,44-1,65	69,5-73,9

Tablica 3 Udio ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet analiziranih uzoraka meda od vriska

UZORAK	UKUPNI FENOLI (mg galne kiseline/kg meda)	FRAP (µM (Fe)(II))	DPPH, IC_{50} (mg/ml)
V1	140,3	343,5	14,14
V2	145,1	399,2	13,81
V3	136,0	323,4	15,48
V4	184,2	506,4	11,48
V5	139,2	351,2	16,13
V6	114,1	286,5	19,21
V7	166,5	449,0	11,88
V8	154,2	369,0	13,69
V9	192,8	427,3	11,86
V10	169,2	446,5	13,21
V11	130,7	324,5	15,88
$\bar{x} \pm SD$	152,0±23,9	384,2±67,0	14,30±2,30
MIN – MAX	114,1-192,8	286,5-506,4	11,48-19,21

Tablica 4 Boja meda od vriska određena pomoću Lovibond komparatora i spektrofotometrijski (NA)

UZORAK	BOJA LOVIBOND (mm Pfund)	BOJA NA (mAU)
V1	45	342
V2	53	350
V3	47	349
V4	60	383
V5	54	395
V6	36	302
V7	60	484
V8	60	454
V9	59	540
V10	62	482
V11	43	343
$\bar{x} \pm SD$	53±9	402±76
MIN – MAX	36-62	302-540

Tablica 5 Pearsonovi koeficijenti korelacije (p<0,05) između ispitivanih parametara

	Boja	NA	Ukupni fenoli	FRAP	DPPH
Boja	1,000				
NA	0,823*	1,000			
Ukupni fenoli	0,858*	0,811*	1,000		
FRAP	0,850*	0,619*	0,901*	1,000	
DPPH	-0,846*	-0,700*	-0,914*	-0,890*	1,000

(*) statistički značajna korelacija pri p<0,05

NA- spektrofotometrijsko određivanje boje, DPPH-antioksidativni kapacitet određen DPPH metodom, FRAP-antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom

5. RASPRAVA

Zadatak rada bio je analizirati 11 uzoraka meda od vriska, koji su prikupljeni od pčelara s područja Jadranske Hrvatske, s naglaskom na njegov antioksidativni kapacitet.

Prvenstveno je bilo potrebno peludnom analizom potvrditi da svi uzorci meda od vriska zadovoljavaju kriterij Pravilnika o kakvoći uniflornog meda. Navedeni Pravilnik zahtijeva da, ako se radi o nektarnom uniflornom medu od vriska u netopljivom sedimentu, mora sadržavati više od 20 % peludnih zrnaca vriska (MPRRR, 2009.). Svi analizirani uzorci su zadovoljili kriterij sa više od 20 % peludnih zrnaca vriska u netopljivom sedimentu.

Određeni su i fizikalno kemijski parametri: udio vode, električna provodnost, udio hidroksimetilfurfurala (HMF), aktivnost enzima dijastaze, omjer glukoze i fruktoze, te njihov zbroj. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 2**.

Prema Pravilniku o medu (MPRRR, 2015.), granična maksimalna vrijednost udjela vode u medu je 20%, uz iznimku meda od vrijeska (*Calluna vulgaris*) i pekarskog meda sa najviše 23%, te pekarskog meda od vrijeska sa najviše 25 % (MPRRR, 2015.). Analizirani uzorci su zadovoljili kriterij sa rasponom vrijednosti od 15,8 % do 18,8 % (**Tablica 2**). Prema rezultatima Primorac i sur. (2013.) udio vode meda od vriska iznosio je 15,0 – 19,9 %, što je usporedivo s podacima dobivenim u ovom ispitivanju.

Ukoliko se radi o nektarnom medu, prema prethodno spomenutom Pravilniku (MPRRR, 2015.), električna provodnost ne smije prelaziti 0,800 mS/cm. U **Tablici 2** se može vidjeti kako su uzorci meda od vriska zadovoljili kriterij sa rasponom vrijednosti 0,198 – 0,506 mS/cm. Dobiveni rezultati usporedivi su sa vrijednostima električne provodnosti meda od vriska dobivenih u radu Primorac i sur. (2013.).

Prema Pravilniku o medu (MPRRR, 2015.), nakon prerade i miješanja meda, vrijednost HMF-a ne smije prelaziti 40 mg/kg, dok aktivnost enzima dijastaze mora biti najmanje 8. Rezultati dobiveni za udio HMF-a prikazani su u **Tablici 2**. Ova su dva parametra pokazatelji svježine meda, prekomjernog zagrijavanja i starenja meda. Iz rezultata je vidljivo kako su analizirani uzorci bili svježi i pravilno procesirani, te da su kao takvi reprezentativni za karakterizaciju meda. Udio HMF-a meda od vriska dobivenih u radu Primorac i sur. (2013.) bili su u rasponu 1,2 – 22,8 mg/kg, a za aktivnost dijastaze 16,3 – 45,8. Rezultati su također zadovoljili

Pravilnik, ali su veći rasponi rezultata, što se može pripisati i većem broju analiziranih uzoraka (22 uzorka).

Zbroj fruktoze i glukoze ispitivanih uzoraka meda od vriska iznosio je 71,0±1,4, dok je njihov omjer 1,50±0,06 iz čega se može zaključiti da je med od vriska sklon umjerenoj kristalizaciji (Primorac i sur., 2013.).

Srednja vrijednost rezultata određivanja boje pomoću Lovibond komparatora iznosi 53±9 mm Pfund, te su uzorci meda od vriska svrstani u kategoriju svijetlo žutih medova (51 – 85 mm Pfund). Rezultati mjerenja boje spektrofotometrijskom metodom izraženi su kao neto apsorbancija (NA). Vrijednosti su se kretale u intervalu 302 - 540 mAU. Rezultat mjerenja boje meda od vriska u radu Piljac-Žegarac i sur. (2009.) iznosio je 236 mAU, što je niže od rezultata ovog ispitivanja.

Udio ukupnih fenola iznosio je 152,0±0,06 mg galne kiseline/kg meda (**Tablica 3**). Vrlo mali broj podataka o udjelu ukupnih fenola meda od vriska dostupan je u literaturi. Piljac-Žegarac i sur. (2009.) dobili su vrijednosti 44,17±2,24 mg galne kiseline/100 g meda što je značajno veće od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Međutim, rezultati nisu usporedivi jer je u navedenom istraživanju korištena drugačija metodologija određivanja ukupnih fenola.

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta u analiziranim uzorcima korištene su dvije metode, DPPH i FRAP metoda. Vrijednosti dobivene FRAP metodom su izražene u µM Fe(II) i prikazane u **Tablici 3**. Njihov iznos bio je u rasponu 286,5 – 506,4 µM Fe(II), dok je srednja vrijednost iznosila 384,2±67,0 µM Fe(II). Piljac-Žegarac i sur. (2009.) dobili su vrijednost 99,68±3,99 µM Fe(II), što je mnogo manje od vrijednosti dobivene u ovom ispitivanju, ali rezultati nisu mjerodavni jer je navedeno ispitivanje provedeno na jednom uzorku meda od vriska i nije provedena peludna analiza kojom bi se potvrdilo botaničko podrijetlo uzorka. Rezultati dobiveni DPPH metodom izraženi su kao IC_{50} (mg/ml), tj. kao koncentracija meda (mg/ml) potrebna za 50%-tno smanjenje početne vrijednosti DPPH•. To znači da je antioksidativni kapacitet viši što je niža vrijednost IC_{50} analiziranog uzorka. Vrijednosti dobivenih rezultata kretali su se u intervalu 11,48 – 19,21 mg/ml (**Tablica 3**).

U **Tablici 5** prikazana je povezanost između boje meda, udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta meda određenog FRAP i DPPH metodama. Može se uočiti kako

postoji visoka, statistički značajna, povezanost između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP ($r=0,901$, $p<0,05$) i DPPH ($r=-0,914$, $p<0,05$) metodama, kao i između DPPH i FRAP metoda ($r=-0,890$, $p<0,05$). Također, istraživanja pokazuju da tamnije vrste meda sadrže veći udio fenola, a samim time i veći antioksidativni kapacitet. Visoka statistički značajna povezanost boje meda i antioksidativnog kapaciteta dobivena je i u ovom istraživanju, a vrijednosti su prikazane u **Tablici 5**. Negativan koeficijent korelacije odabranih parametara i DPPH metode je zbog toga što su rezultati izraženi preko IC_{50}, odnosno antioksidativni kapacitet je veći što su manje vrijednosti IC_{50}.

Med od vriska karakterističan je za područje Jadranske Hrvatske, gdje se u većim količinama proizvode i med od kadulje, drače, ružmarina, lavande i smilja. Uspoređujući antioksidativni kapacitet i udio ukupnih fenola sa drugim uniflornim vrstama meda, vidljivo je da med od vriska ima veći udio ukupnih fenola i veći antioksidativni kapacitet u odnosu na med od kadulje (Flanjak, 2012.) i med od smilja (Flanjak i sur., 2013.).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Svi analizirani uzorci bili su u skladu s propisima s obzirom na peludnu analizu i fizikalno-kemijske parametre.
- Med od vriska karakterizira spora kristalizacija, a po boji pripada kategoriji svijetlo žutih medova.
- Udio ukupnih fenola iznosio je 152,0±23,9 mg galne kiseline/kg meda, a antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom 384,2±67,0 μM Fe(II), dok je onaj određen DPPH metodom 14,30±2,30 mg/ml.
- Statistički značajna korelacija utvrđena je između boje, udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta. Najveća povezanost uočena je između udjela ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom, a najniža između spektrofotometrijskog određivanja boje meda i antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP metodom.

7. LITERATURA

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

Anklam E, Radovic B: Suitable analytical methods for determining the origin of European honey. *American Laboratory News* 33:60-64,2002.

Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) Official methods of analysis, 17th eds., Gaithersburg, Maryland; USA, 2000.

Belčić J, Katalinić J, Loc D, Lončarević S, Peradin L, Sulimanović Đ, Šimić F, Tomašec I: *Pčelarstvo*, Nakladni zavod Znanje, Zagreb, 1990.

Benzie IFF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70-76, 1996.

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, Golob T: Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105(2):822-828, 2007.

Bogdanov S, Martin P, Lüllman C: Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie (extra issue)* 28:1-59, 1997.

Bogdanov S, Haldimann M, Luginbühl W, Gallmann P: Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research* 46(4):269-275, 2007.

Codex Alimentarius Commission: Revised Codex Standard for honey. *Alinorm*, 19-26, 2001.

Council of the European Union: Council Dierctive 2001/110/EC of Dec 20, 2001, relating to honey. *Official Journal of European Community*, L10:47-52, 2002.

De la Fuente E, Sanz ML, Martínez-Castro I, Sanz J, Ruiz-Matute AI: Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry* 105:84-93, 2007.

Di Marco G, Canuti L, Impei S, Leonardi D, Canini A: Nutraceutical properties of honey and pollen produced in a natural park. *Agricultural Sciences* 3(2):187-200, 2012.

Flanjak I: Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja. *Doktorski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2012.

Flanjak I, Primorac Lj, Kenjerić D, Bilić B: Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of everlasting (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) honey. U *Zbornik sažetaka 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma*, str. 261, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2013.

Frankel S, Robinson GE, Berenbaum MR: Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research* 37:27-31, 2004.

González Paramás AM, Gómez Bárez JA, Cordón Marcos C, García-Villanova RJ, Sánchez Sánchez J: HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95(1):148-156, 2006.

Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD: Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 83:263-268, 2003.

Huang D, Ou B, Prior RL: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856, 2005.

Jones R: Honey and healing though the ages. In *Honey and healing.* International Bee Research Association, Cardiff, 1-4, 2001.

Karadag A, Ozcelik B, Saner S: Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2:41-60, 2009.

Lee J, Koo N, Min DB: Reactive oxygen species, aging, and antioxidant nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:21-32, 2004.

Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G: Methods of melissopalynology. *Bee world* 59:139-157, 1978.

Malenica Staver M, Ratkaj I, Broznić D, Jerković I, Marijanović Z, Željezić D, Kraljević Pavelić S: Bioactivity of *Satureja montana* L. honey extracts and their profile screening. *RSC Advances* 4:47329-47340, 2014.

Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research* 5(8):844-852, 2011.

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.

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.

Primorac Lj, Flanjak I, Cvijetić M, Đapić Z: Electrical conductivity and ash content of selected honey types. U *International Scientific and Proffesional Conference 13th Ruzicka days "Today science-tomorrow industry*", str. 406-411. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.

Primorac Lj, Flanjak I, Kenjerić D, Bubalo D, Novak I: Physicochemical parameters of winter savory (*Satureja montana* L.) honey. *Agronomski glasnik* 5-6:245-254, 2013.

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.

Ruiz-Matute AI, Brokl M, Soria AC, Sanz ML, Martínez-Castro I: Gas chromatographic-mass spectrometic characterisation od tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemistry* 120:637-642, 2010.

Singleton VL, Ortofer R, Lamuela-Raventós RM: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178, 1999.

Vinson JA, Proch J, Bose P: Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods in Enzymology* 335:103-114, 2001.

Wesołowska A, Grzeszczuk M, Jadczak D: Infuence of Harvest Term on the Content of Carvacrol, p-Cymene, γ-Terpinene and β-Caryiphyllene in the Essential Oil of *Satureja montana*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 42(2):392-397, 2014.

White JE: Honey. In *The Hive and the Honey Bee*. Dadant&Sons, Hamilton, Illinois, 869-918,2000.

Won SR, Lee DC, Ko SH, Kim JW, Rhee HI: Honey major protein characterisation and its application to adulteration detection. *Food Research International* 41:952-956, 2008.