

# Određivanje antioksidacijskog potencijala odabranih svijetlih vrsta meda

---

Sučić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:235538>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju

Nikolina Sučić

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG  
POTENCIJALA ODABRANIH SVIJETLIH  
VRSTA MEDA

Diplomski rad

Split, 2024.

Ovaj rad, izrađen u Splitu 2024. godine pod vodstvom doc. dr. sc. Perice Boškovića i doc. dr. sc. Marine Kranjac, pred., predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Perici Boškoviću na mentorstvu i stručnim savjetima pri izradi diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marini Kranjac na pomoći, strpljenju i posvećenom vremenu pri izradi eksperimentalnog dijela i savjetima pri izradi diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Saši Prđunu i suradnicima sa Agronomskog fakulteta u Zagrebu na pomoći oko prikupljanja i izbora uzoraka.*

*Ovaj diplomski rad je izrađen u okviru institucijskog znanstvenog projekta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu naziva "Istraživanje kemijske raznolikosti i bioaktivnog potencijala prirodnih produkata".*



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33. 21 000 Split, Hrvatska

### ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA ODABRANIH SVIJETLIH VRSTA MEDA

Nikolina Sučić

Med jest prirodno sladak proizvod koji se najvećim dijelom sastoji od šećera fruktoze i glukoze, vode, i drugih sastojaka kao što su aminokiseline, enzimi, proteini, vitamini, minerali, organske kiseline, te fenoli i flavonoidi. U ovom radu ispitana je antioksidacijska aktivnost odabranih uzoraka svijetlih vrsta meda primjenom DPPH metode. Metoda se zasniva na sposobnosti antioksidansa da ukloni DPPH radikale, a sama reakcija se prati spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm. Određena je antioksidacijska aktivnost sljedećih uzoraka meda: meda od bagrema, meda od amorfe te cvjetnog med. Med od bagrema, najsvjetliji med, pokazao je najnižu antioksidacijsku aktivnost, njegova TEAC vrijednosti iznosi 0,28 mmol/kg, a % inhibicije iznosi 6,1%. TEAC vrijednost meda od amorfe znosi 0,30 mmol/kg, a % inhibicije iznosi 6,6%. Cvjetni med je najtamniji od odabranih svijetlih vrsta meda, i ima TEAC vrijednost od 0,43 mmol/kg, a % inhibicije iznosi 9,7%. IC<sub>50</sub> vrijednost je određena za svijetle vrste meda koje su pokazale najveće TEAC vrijednosti i najveći % inhibicije. Med od amorfe je pokazao veću IC<sub>50</sub> vrijednost.

**Ključne riječi:** med od bagrema, med od amorfe, cvjetni med, boja meda, DPPH test, TEAC, antioksidacijska aktivnost, % inhibicije, IC<sub>50</sub> vrijednost

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 34 stranice, 8 grafičkih prikaza, 13 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Perica Bošković

**Komentor:** doc. dr. sc. Marina Kranjac

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Perica Bošković, predsjednik

doc. dr. sc. Barbara Soldo, član

doc. dr. sc. Marina Kranjac, član

Rad prihvaćen: rujan, 2024.

## Basic documentation card

University of Split

Diploma Thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

### DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF SELECTED LIGHT-COLOURED HONEY VARIETIES

Nikolina Sučić

Honey is a natural sweet product consisting of fructose and glucose sugars, water, amino acids, enzymes, proteins, vitamins, minerals, organic acids, phenols and flavonoids. In this thesis is tested the antioxidant activity of selected light-coloured honey varieties using the DPPH method. The method is based on the ability of antioxidants to remove DPPH radicals, and the reaction is monitored spectrophotometrically at a wavelength of 517 nm. Honey samples that are tested: acacia honey, amorpha honey and multifloral honey. Acacia honey, the lightest honey, has the lowest antioxidant activity, its TEAC value is 0.28 mmol/kg, and % inhibition is 6.1%. The TEAC value of the amorpha honey is 0.30 mmol/kg, and the % inhibition is 6.6%. Multifloral honey, the darkest one, has a TEAC value of 0.43 mmol/kg, and the % inhibition is 9.7%. The  $IC_{50}$  value is determined for the light-coloured honey varieties that showed the highest TEAC values and the highest % inhibition. Amorpha honey has a higher  $IC_{50}$  value.

**Keywords:** acacia honey, amorpha honey, multifloral honey, the colour of honey, DPPH test, TEAC, antioxidant activity, % inhibition,  $IC_{50}$  value

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 34 pages, 8 figures, 13 tables and 20 references, original in: Croatian

**Mentor:** Perica Bošković, Ph.D. Prof.

**Assistant Supervisor:** Marina Kranjac, Ph.D. Assoc. Prof.

**Reviewers:** Perica Bošković, Ph.D. Assoc. Prof.

Barbara Soldo, Ph.D. Assistant. Prof.

Marina Kranjac, Ph.D. Assistant Prof.

Thesis accepted: September 2024.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Med.....	1
1.2. Kemijski sastav i svojstva meda.....	2
1.2.1. Bioaktivna svojstva meda.....	3
1.2.2. Boja meda.....	5
1.3. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala meda.....	5
1.3.1. Metoda vezivanja slobodnih radikala (DPPH-test).....	6
1.4. UV-Vis spektrofotometrija.....	7
1.5. Cilj istraživanja.....	9
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	10
2.1. Materijal.....	10
2.1.1. Opis odabranih uzoraka meda.....	10
2.1.2. Opis botaničkih izvora odabranih monoflornih uzoraka.....	12
2.1.2.1. <i>Robinia pseudoacacia</i> L.....	12
2.1.2.2. <i>Amorpha fruticosa</i> L.....	14
2.2. Postupak.....	16
2.2.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	16
2.2.2. Priprema otopina.....	16
2.2.2.1. Priprema otopine DPPH radikala.....	16
2.2.2.2. Priprema standardnih i radnih otopina Troloksa.....	17
2.2.2.3. Priprema uzoraka meda.....	17
2.2.3. Spektrofotometrijska mjerenja.....	18
2.2.3.1. Mjerenja provedena za određivanje vrijednosti TEAC i % inhibicije.....	18
2.2.3.2. Mjerenja provedena za određivanje vrijednosti IC <sub>50</sub> .....	20
<b>3. REZULTATI</b> .....	22
3.1. Vrijednosti ekvivalentne koncentracije Troloksa (TEAC) i % inhibicije uzoraka meda.....	22
3.1.1. Ekvivalentne koncentracije Troloksa.....	22
3.1.2. Postotak (%) inhibicije uzoraka meda.....	24
3.2. Rezultati mjerenja za određivanje IC <sub>50</sub> vrijednosti uzoraka meda.....	26

<b>4. RASPRAVA</b> .....	30
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	32
<b>6. LITERATURA</b> .....	33



# 1. UVOD

## 1.1. Med

Med jest prirodno sladak proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka, koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.<sup>1</sup>

Osnovne vrste meda su:

### 1. prema podrijetlu:

- cvjetni ili nektarni med: med dobiven od nektara biljaka;
- medljikovac ili medun: med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka.

### 2. prema načinu proizvodnje i/ili prezentiranja:

- med u saću
- med sa saćem ili med s dijelovima saća
- cijedeći med
- vrcani med
- prešani med
- filtrirani med

### 3. pekarski med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom prerađuje i može:

- imati strani okus ili miris
- biti u stanju vrenja ili prevrio
- biti pregrijan.<sup>1</sup>

Uniflorni med se može označiti prema određenoj biljnoj vrsti ako u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste.<sup>2</sup> Iznimno, uniflorni med se može označiti nazivom sljedećih biljnih vrsta: pitomi kesten (*Castanea sativa Mill.*) ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 85%, uljana repica (*Brassica napus L.*) ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 60%, facelija (*Phacelia tanacetifolia Benth.*) ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 60%, lipa (*Tilia spp.*) ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 25%, bagrem (*Robinia pseudoacacia L.*), metvica (*Mentha spp.*), vrijesak (*Calluna vulgaris L.*), vrisak, primorski vrijesak (*Satureja montana L.*), maslačak (*Taraxacum officinale Weber*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis L.*), ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 20%, kadulja (*Salvia officinalis L.*) ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 15%, planika (*Arbutus unedo L.*), agrumi (*Citrus spp.*), lavanda (*Lavandula spp.*) ako je udio peludnih zrnaca u netopljivom sedimentu 10%.<sup>2</sup>

## 1.2. Kemijski sastav i svojstva meda

Kemijski sastav meda i njegova bioaktivna svojstva uglavnom ovise o cvjetnom izvoru. U sastavu meda najvećim dijelom su prisutni šećeri fruktoza i glukoza, a zatim voda, aminokiseline, enzimi, proteini, vitamini, minerali, organske kiseline, fenoli i flavonoidi.<sup>3</sup> Prema konzistenciji med može biti tekući ili viskoznan (kremast) te potpuno ili djelomično kristaliziran.<sup>1</sup>

Med je namirnica za koju se smatra da ima svojstva koja pridonose zdravlju. Takva svojstva ovise o kemijskom sastavu koji se može razlikovati među različitim vrstama meda. Fitokemikalije koje ulaze u sastav meda odgovorne su za njegova ljekovita svojstva. Njihov ukupni sadržaj u medu ovisi o geografskom podrijetlu meda, cvjetnom izvoru, meteorološkim uvjetima, mogućim tretmanima i sezonskim promjenama.<sup>4</sup>

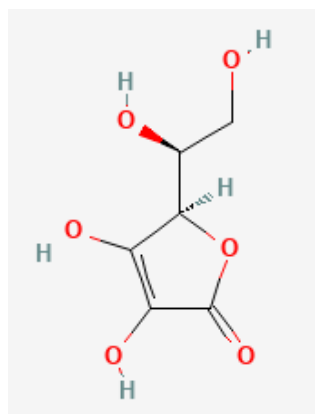
Zbog njegove kiselosti, visoke osmolarnosti, vodikova peroksida, fenolnih kiselina, flavonoida i ostalih tvari med ima antibakterijska i antifungicidna svojstva. Sazrijevanje meda odvija se pomoću enzima koji katalizira oksidaciju glukoze te na taj način nastaje vodikov peroksid. Enzimi pomoću kojih se odvija reakcija potječu od žlijezda medonosnih pčela. pH vrijednost meda iznosi oko 3.2 i 4.5, a visoka osmolarnost je posljedica visokog udjela šećera. Upravo takve karakteristike dovoljna su smetnja rastu bakterija. Svojim protuupalnim djelovanjem med ublažava upalu kože, zacjeljuje rane te potiče regeneraciju kože.

Svakodnevnim unosom med jača imunološki sustav kod djece te na taj način djeca postaju otpornija na bolesti.<sup>5</sup>

Osim za ljekovite svrhe med se koristi kao hrana visoke energetske vrijednosti zbog ugljikohidrata koje sadrži. Glukoza i fruktoza brzo dopijevaju u krvotok osiguravajući energiju. Med se koristi i u sastavu kozmetičkih proizvoda poput masti za usne, hidratantnih krema, losiona za tijelo, krema za lice, šampona i regeneratora. U sastavu kozmetičkih preparata med djeluje omekšavajuće, hidratizirajuće, održava mladolik izgled kože i sprječava nastanak bora te sprječava nastanak infekcija uzrokovanih patogenima.<sup>5</sup>

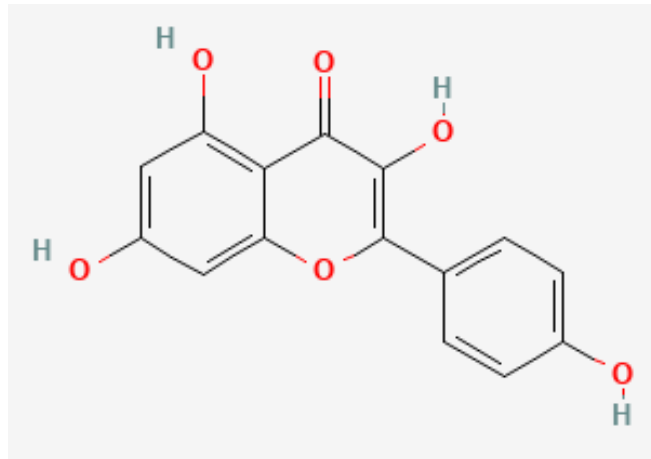
### 1.2.1. Bioaktivna svojstva meda

Med sadrži antioksidanse kao što su vitamin C (slika 1), fenoli, flavonoidi, katalaze, peroksidaze, enzime (npr. superoksid dismutaza, SOD). Antioksidansi uklanjaju slobodne radikale, molekule koje razaraju strukture ostalih molekula u tijelu poput DNA, te na taj način štite stanicu. Slobodni radikali su nusprodukti reakcije dobivanja energije u mitohondrijima stanica. Njihova prisutnost u organizmu dovodi do bolesti i ubrzanog starenja. Uobičajeni sastav fenolnih spojeva koji se obično nalaze u sastavu različitih vrsta meda uključuje kempferol (slika 2), kavenu kiselinu (slika 3), galangin (slika 4), kvercetin, i pinocembrin. Takvi spojevi imaju obećavajuća farmakološka djelovanja. Galangin primjerice sprječava srčana oboljenja i pomaže kod sakupljanja antioksidansa kao što su vitamin E i C te neki flavonoidi. Kvercetin snižuje krvni tlak, a kavena kiselina smanjuje brzinu otkucaja srca i krvni tlak.<sup>3,6</sup>



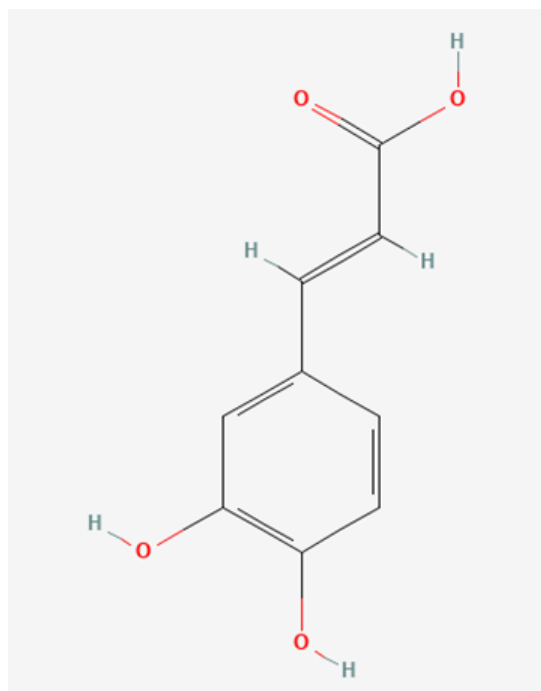
*Slika 1. Strukturna formula vitamina C (Preuzeto s National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information*

*<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-Acid>*



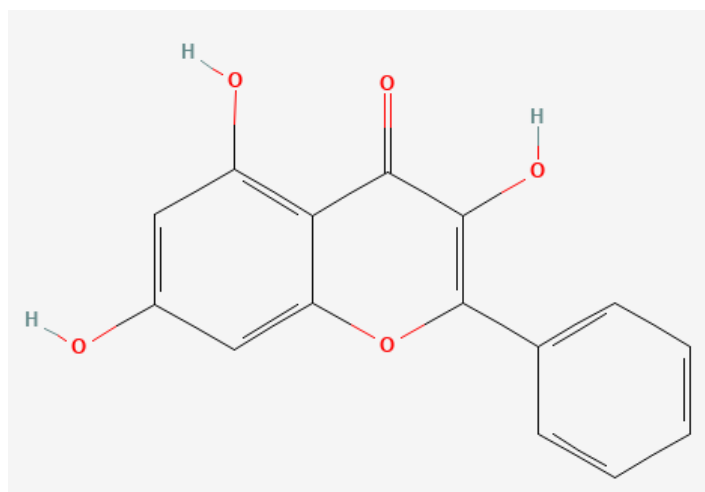
*Slika 2. Strukturna formula kempferola (Preuzeto s National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information*

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol>)



*Slika 3. Strukturna formula kavene kiseline (Preuzeto s National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information*

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-Acid>)



**Slika 4.** Strukturna formula galangina (Preuzeto s National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Galangin>)

### 1.2.2. Boja meda

Boja meda varira od izrazito svijetle do tamne boje poput jantara. Med se prema boji klasificira koristeći Pfund ljestvicu (slika 5).<sup>7</sup>



**Slika 5.** Različite boje meda prema Pfund ljestvici (Preuzeto s Honey.AI <https://www.honey-ai.com/en/technology/pfund-color-grading>)

Boja meda dobar je pokazatelj njegove antioksidacijske aktivnosti. Istraživanja pokazuju da tamnije vrste meda imaju veći sadržaj ukupnih fenola i bolju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi sa svijetlim vrstama meda.<sup>8</sup>

### 1.3. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala meda

Neke od uobičajenih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti meda su DPPH (*engl.* 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) metoda, FRAP (*engl.* ferric reducing/antioxidant power) test, CUPRAC (*engl.* cupric ion reducing antioxidant capacity) test, ORAC (*engl.* oxygen

radical absorbance capacity) metoda i ABTS (*engl.* (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) metoda.<sup>3</sup>

FRAP je jednostavna, ponovljiva i osjetljiva metoda. U prisutnosti antioksidansa odvija se reakcija redukcije željezovog 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksa ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) do ljubičasto-plave boje ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ).<sup>3</sup>

CUPRAC metoda se provodi pri pH 7,0. Istovremeno mjeri hidrofilne i lipofilne antioksidanse. Bis (neokuproin) bakrov(II) klorid ( $\text{Cu(II)-Nc}$ ) reagira s polifenolima gdje se reaktivna Ar-OH skupina polifenola oksidira do odgovarajućih kinona, a  $\text{Cu(II)-Nc}$  se reducira do intenzivno obojene otopine  $\text{Cu(I)-Nc}$ .<sup>3</sup>

ORAC metodom mjeri se smanjenje fluorescencije fluorescina koje potječe od gubitka njegove konformacije kada je pod utjecajem oksidativnog stresa uzrokovanog od izvora peroksilnih radikala. U prisustvu antioksidansa smanjuje se gubitak fluorescencije. Ovom metodom mogu se otkriti hidrofilni i hidrofobni antioksidansi.<sup>3</sup>

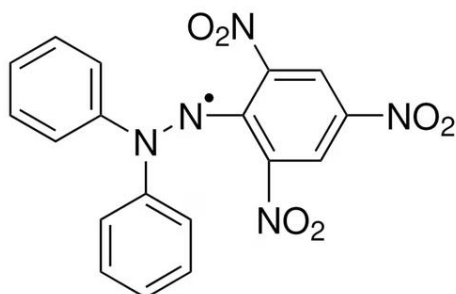
ABTS metoda se može koristiti u širokom rasponu pH i u različitim medijima. Pomoću ove metode mogu se odrediti kapaciteti lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa. Kada se antioksidans doda u ABTS  $^{*+}$  plavo-zeleni kromofor, ABTS  $^{*+}$  se reducira do ABTS te se obezboji.<sup>3</sup>

### **1.3.1. Metoda vezivanja slobodnih radikala (DPPH–test)**

Stanično disanje je proces u kojem iz glukoze nastaje energija, ali i slobodni radikali koji razaraju stanicu i djeluju štetno na metabolizam. Slobodni radikali sadrže nesporeni elektron zbog kojeg su izrazito reaktivni. Antioksidansi su molekule koje doniraju elektron slobodnom radikalima te ga neutraliziraju i na taj način štite stanicu od oštećenja slobodnim radikalom.<sup>10</sup>

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (slika 6) je stabilan slobodni radikal sa delokaliziranim elektronom oko molekule. Delokalizirani elektron doprinosi ljubičastom obojenju otopine DPPH radikala. Reducira se do hidrazina (DPPH-H) primajući vodikov atom od antioksidansa, a koristi se u određivanju antioksidacijskog svojstva tvari.<sup>10,11</sup>

Najpoznatiji hidrazilni slobodni radikal je 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil koji se uobičajeno naziva DPPH. 2,4,6-trinitrofenil segment se uobičajeno naziva pikril. Pikrilni dio DPPH radikala ima ulogu elektron akceptora, a difenilamino dio ima ulogu elektron donora.<sup>11</sup>



*Slika 6. Strukturna formula 2, 2- difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) (Preuzeto s Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/d9132>)*

Iako je reaktivan, DPPH ne dimerizira niti reagira s kisikom te je stabilan u čvrstom stanju.<sup>11</sup> DPPH otopina čuva se u mraku kako bi ostala stabilna jer u protivnom dolazi do reakcije s molekulom kisika.<sup>10</sup>

Ova metoda bazira se na spektrofotometrijskim mjerenjima kapaciteta antioksidansa da uklanja DPPH radikale. Antioksidacijska aktivnost mjeri se na sobnoj temperaturi kako bi rizik od degradacije ispitivanih molekula zbog visokih temperatura bio eliminiran.<sup>10,11</sup>

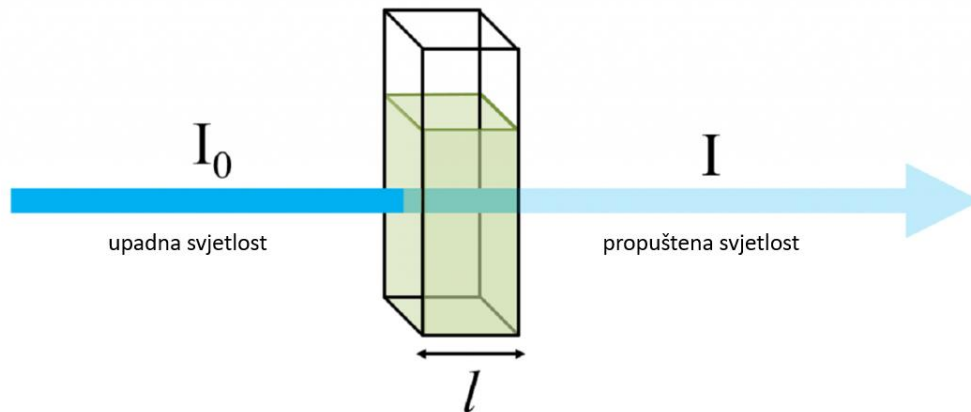
Metoda vezivanja slobodnih radikala (DPPH) je brza, jednostavna, jeftina i široko korištena metoda za mjerenje sposobnosti spojeva u vezivanju slobodnih radikala. Uspješno se koristi za istraživanje antioksidacijskog kapaciteta širokog spektra namirnica u nekoliko različitih otapala uključujući etanol, metanol, aceton, vodu i benzen. Provođenje metode u metanolu i vodi olakšava ekstrakciju antioksidativnih spojeva iz uzoraka. Apsorbancija DPPH u metanolu i acetonu se smanjuje pod utjecajem svjetlosti.<sup>11</sup>

#### **1.4.UV- VIS spektrofotometrija**

Spektroskopija je mjerenje i tumačenje (interpretacija) elektromagnetskog zračenja apsorbiranog ili emitiranog kada molekule, atomi ili ioni uzorka prelaze iz jednog energetskog stanja u drugo energetsko stanje.<sup>12</sup>

Ultraljubičasta spektrofotometrija (UV) je tehnika koja koristi svjetlost u vidljivom, ultraljubičastom i bliskom infracrvenom rasponu, a temelji se na Beer-Lambertovom zakonu.<sup>12</sup>

Beer-Lambertov zakon se oslanja na monokromatski snop svjetlosti koji zrači površinu ispitivanog medija. Nakon prolaska kroz medij koji ima određenu debljinu, medij apsorbira dio svjetlosne energije, smanjujući intenzitet prenesene svjetlosti koja prolazi kroz medij (slika 7). Apsorbancija medija koji apsorbira je direktno proporcionalna debljini medija.<sup>13</sup>



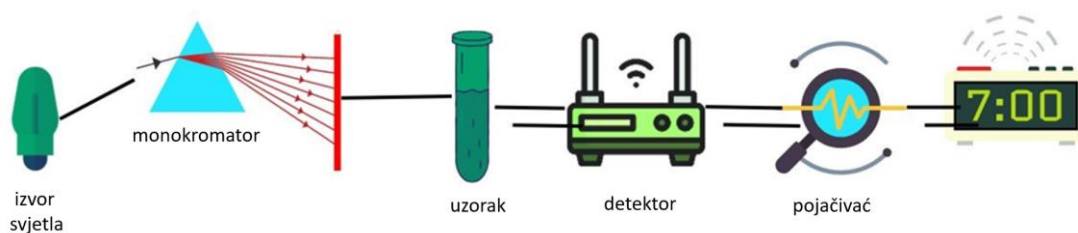
*Slika 7. Propuštanje svjetlosti kroz uzorak u kiveti (Preuzeto i prilagođeno s Edinburgh instruments <https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/>)*

Postoje dvije vrste apsorpcijskih instrumenata koji se koriste UV-VIS spektrofotometriji:

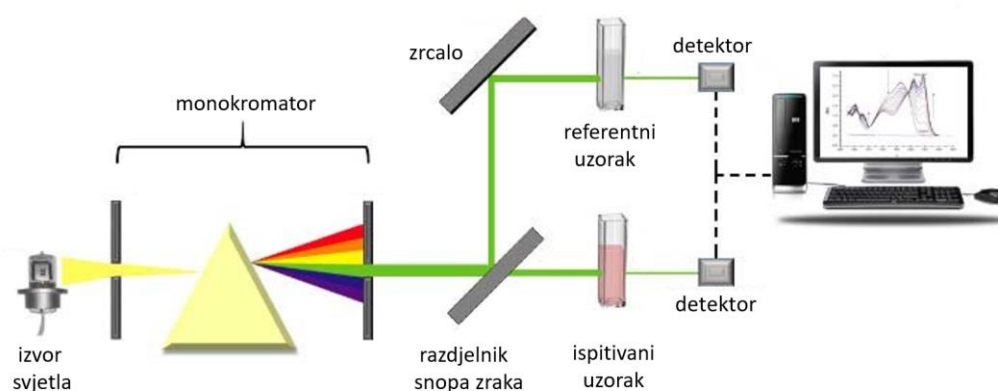
- spektrofotometar s jednom zrakom
- spektrofotometar s dvostrukom zrakom<sup>12</sup>

Oba instrumenta imaju izvor svjetlosti (deuterijska ili volframova lampa), držač uzorka i detektor. Spektrofotometar s jednom zrakom ima monokromator između izvora svjetlosti i uzorka za analizu jedne po jedne valne duljine (slika 8). Spektrofotometar s dvostrukom zrakom ima jedan izvor svjetla i monokromator, zatim razdjelnik snopa zraka i zrcalo koje omogućuje da zrake dođu do referentnog uzorka (slika 9). Također su tu i dva detektora koji omogućuju instrumentu da istovremeno detektira različite valne duljine.<sup>12</sup>





**Slika 8.** Shematski prikaz spektrofotometra s jednom zrakom (Preuzeto i prilagođeno s Science info <https://scienceinfo.com/single-beam-spectrophotometer-limitations/>)



**Slika 9.** Shematski prikaz spektrofotometra s dvostrukom zrakom (Preuzeto i prilagođeno s Research Gate [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-dual-beam-UV-VIS-spectrometer\\_fig2\\_336637497](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-dual-beam-UV-VIS-spectrometer_fig2_336637497))

## 1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati i usporediti antioksidacijski potencijal odabranih svijetlih vrsta meda primjenom metode vezivanja slobodnih radikala (DPPH metoda). U radu su istražene sljedeće vrste meda: med od bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), med od amorfe (*Amorfa fruticosa* L.) i cvjetni med. Antioksidacijska aktivnost istraživanih uzoraka meda dobivena DPPH metodom je izražena na tri načina, i to kao: i) postotak (%) redukcije ili inhibicije, ii) ekvivalentna koncentracija Troloksa te kao iii)  $IC_{50}$  vrijednost. Također, dobiveni rezultati antioksidacijske aktivnosti su raspravljani u kontekstu boje istraživanih vrsta meda.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Materijal

#### Kemijsko posude i pribor:

- čaše
- odmjerna tikvica od 100 mL
- odmjerna tikvica od 10 mL
- bočice od 1,8 mL
- pipeta jednokanalna promjenjiva 10-100  $\mu$ L i 100-1000  $\mu$ L
- plastične semi-mikro kivete (10 mm; 2,5 mL, Kartell S.p.A.)
- šprice
- filteri (veličina pora 0,45  $\mu$ m, dijametar 25 mm, Labex Ltd.)

#### Kemikalije:

- DPPH (Sigma-Aldrich)
- Troloks (Sigma-Aldrich)
- metanol

#### Uzorci meda i biljni izvori:

- med od bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.)
- med od amorfe (*Amorfa fruticosa* L.)
- cvjetni med

#### 2.1.1. Opis odabranih uzoraka meda

Uzorci meda nabavljeni su od lokalnih proizvođača meda s područja Hrvatske, dok su uzorci uniflornih vrsta meda sakupljeni i odabrani uz pomoć suradnika sa Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Med od amorfe je s područja Sisačko-moslavačke županije, a med od bagrema je s područja Krapinske županije. Oba uzorka su proizvedena 2023. godine. Uniflornost uzoraka meda od bagrema i amorfe je potvrđena melisopalinološkom analizom koja je provedena na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, prema metodologiji von der Ohe i suradnika (2004) na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.<sup>14</sup>

Konzistencija uzorka meda od bagrema i meda od amorfe je tekuća, a uzorak cvjetnog meda je djelomično kristaliziran. Najtamniji med je cvjetni, dok je najsvjetliji med od bagrema..<sup>1,2</sup>

Med od bagrema i med od amorfe spadaju u svijetle vrste meda. Med od bagrema prema Pfund ljestvici spada u prozirno svijetle vrste meda.<sup>15</sup> Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti odabran je cvjetni med približne boje uniflornim uzorcima meda.



*Slika 10. Med od bagrema*

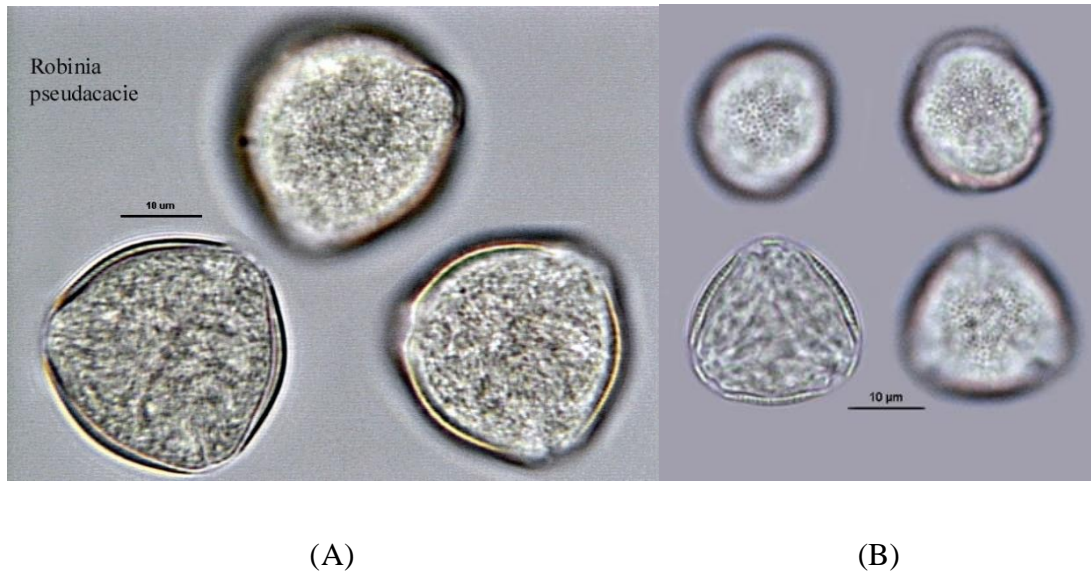


*Slika 11. Med od amorfe*



*Slika 12. Cvjetni med*

Prema Pravilniku o medu uniflorni med od amorfe je u netopivom sedimentu sadržavao najmanje 45 % peludnih zrnaca navede biljne vrste, dok je za utvrđivanje uniflornosti meda od begrema (*Robinia pseudacacia*) udio peludnih zrnaca u netopivom sedimentu iznosio najmanje 20%.<sup>2</sup> Izgled peludnih zrnaca prisutnih u medu bagrema (A) i amorfe (B) su prikazani na slici 17 i ustupljeni su iz palinoteke Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

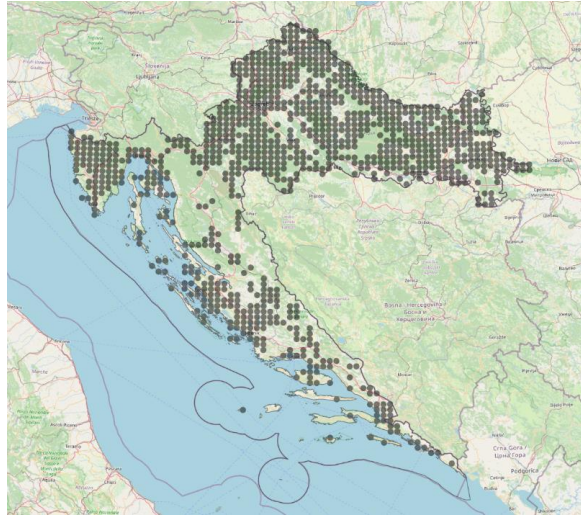


**Slika 13.** A. Polarni prikaz peluda bagrema; B. Ekvatorijalni (gore) i polarni (dolje) prikaz peluda amorfe

## 2.1.2. Opis botaničkih izvora odabranih uniflornih uzoraka

### 2.1.2.1. *Robinia pseudoacacia* L.

Bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) je listopadno drvo kojeg karakterizira brz rast. Iz Sjeverne Amerike uvezen je u Europu početkom 17. stoljeća. Koristi se u pčelarstvu, drvnjoj industriji, šumarstvu te s obzirom na njegove dekorativne karakteristike koristi se i u ukrasnoj hortikulturi. Rasprostranjen je uglavnom po čitavoj Republici Hrvatskoj naročito u sjeveroistočnom dijelu Hrvatske (slika 14), samo ga se ne može pronaći u gorsko-planinskom području. Uzgoj bagrema značajan je u Kalniku, gradu u kojem je razvijeno pčelarstvo koje se bazira na bagremovoj paši. S 1 ha može se dobiti 1000 kg meda.<sup>16</sup>



**Slika 14.** Karta rasprostranjenosti bagrema (Preuzeto s Nikolić T. ur. (2015 - nadalje): Rasprostranjenost *Robinia pseudoacacia* L. u Hrvatskoj, Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 10.04.2024.))

Cvate u svibnju (slika 15) te cvatnja ovisi o nadmorskoj visini i o stupnju osunčanosti površina pod tom vrstom. Krošnja bagrema je ukrasna, svijetla i rijetka te ima grane s trnjem. Cvjetovi su mu bijele boje (slika 16), dekorativni, ugodna mirisa te su medonosni. Bagrem je invazivna vrsta, čini guste populacije i onemogućava ostalim biljkama da dođu do sunčeve svjetlosti te tako smanjuje biološku raznolikost.<sup>16</sup>



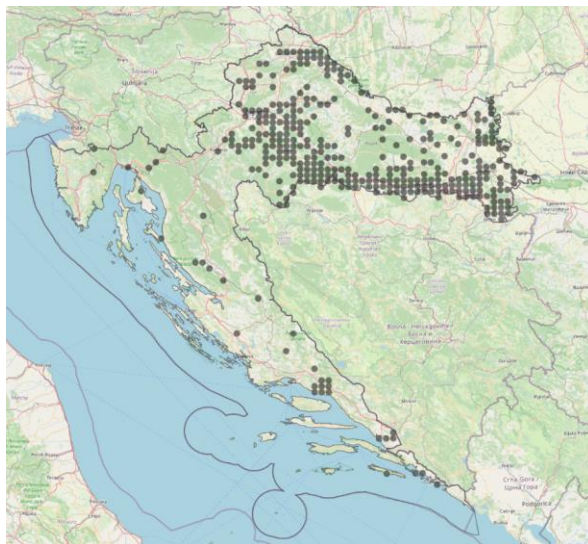
**Slika 15.** Graf fenologije bagrema (Preuzeto i prilagođeno s PlantNet <https://identify.plantnet.org/hr/invasion/species/Robinia%20pseudoacacia%20L./data>)



**Slika 16.** Cvat bagrema (Preuzeto s Flora Croatica baza podataka <http://hirc.botanic.hr/fcd>)

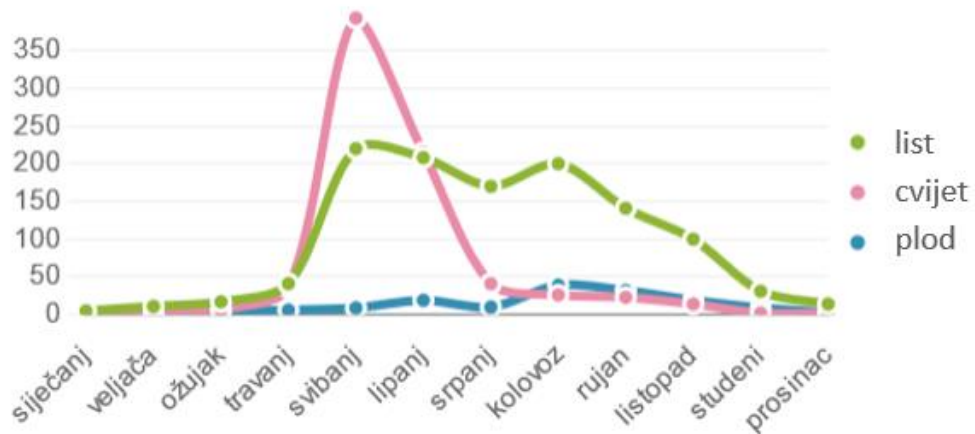
#### **2.1.2.2. *Amorpha fruticosa* L.**

Amorfa (*Amorpha fruticosa* L.) je listopadna invazivna vrsta koja se pojavila u Hrvatskoj početkom 20. stoljeća. Rasprostranjena je u Posavini te u nizinskim dijelovima Slavonije i Zagreba (slika 17).<sup>17</sup>



**Slika 17.** Rasprostranjenost amorfe (Preuzeto s Nikolić T. ur. (2015 - nadalje):  
Rasprostranjenost *Amorpha fruticosa* L. u Hrvatskoj, Flora Croatica baza podataka  
(<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum  
pristupa:10.04.2024.))

Amorfa je dekorativna biljka, ali služi i za učvršćivanje nasipa uz željezničke pruge. Cvjetovi su joj raznospolni i skupljeni u uspravnim vršnim klasovima (slika 19), a cvjeta krajem proljeća i početkom ljeta (slika 18). Iz amorfnih plodova izolacijom glikozida amorfina može se dobiti lijek protiv nervnih i srčanih bolesti. Koriste je pčelari za proizvodnju meda, a osim toga služi i za dobivanje boje, insekticida, margarina i začina.<sup>17</sup>



**Slika 18.** Graf fenologije amorfe (Preuzeto i prilagođeno s PlantNet

<https://identify.plantnet.org/hr/invasion/species/Amorpha%20fruticosa%20L./data>)



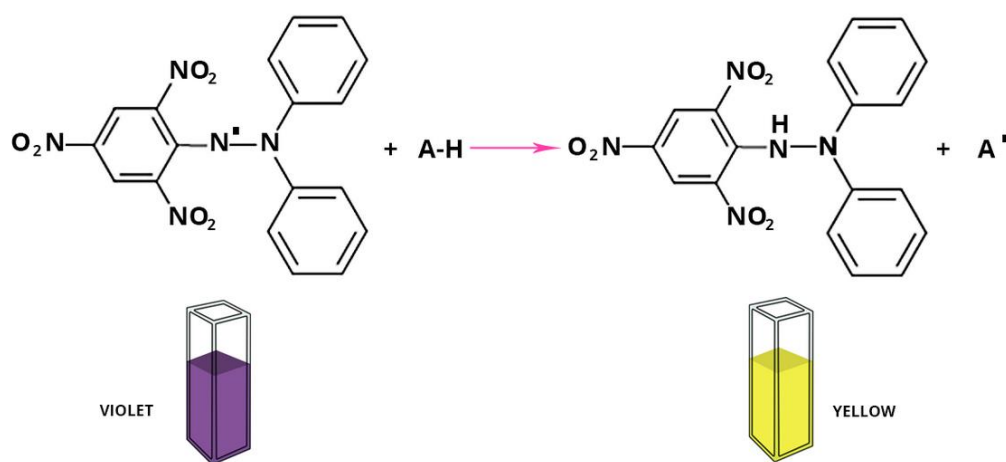
**Slika 19.** Cvijet amorfe (Preuzeto s Flora Croatica baza podataka <http://hirc.botanic.hr/fcd>)

## 2.2. Postupak

### 2.2.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka je uspostavljena u Znanstveno-istraživačkom laboratoriju za molekulska spektroskopiju Odjela za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, prema metodologiji uz manje izmjene.<sup>18, 19</sup>

Miješanje DPPH i otopine antioksidansa uzrokuje nestanak ljubičaste boje otopine DPPH. Nastankom DPPH-H smanjuje se vrijednost apsorbancije i boja otopine poprima blijedo žutu boju (slika 20).<sup>10</sup>



*Slika 20. Jednadžba kemijske reakcije DPPH i antioksidansa te promjena boje otopine iz ljubičaste u svijetložutu (Preuzeto s Chimactiv <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>)*

### 2.2.2. Priprema otopina

#### 2.2.2.1. Priprema otopine DPPH radikala

Najmanje 24 sata prije eksperimenta se pripremi 50 mL osnovne otopine DPPH radikala množinske koncentracije 0,4 mM, te se tako pripremljena otopina čuva u tami u hladnjaku. Razrijeđenjem osnovne otopine se pripremi radna otopina DPPH radikala množinske koncentracije 0,04 mM koja će biti dostatna za mjerenja antioksidacijske aktivnosti uzoraka.

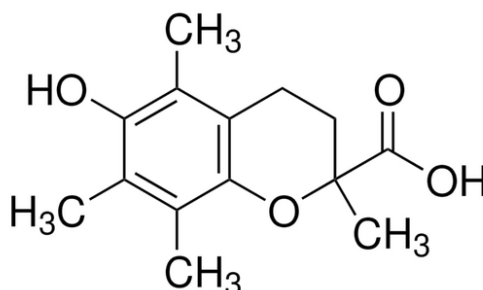


### 2.2.2.2. Priprema standardnih i radnih otopina Troloksa

Pripremi se 10 mL osnovne otopine Troloksa (Slika 21.), odnosno otopine najveće koncentracije, tzv. „stock“ otopine množinske koncentracije 20 mM u metanolu, a iz nje se pripremi 1 mM radna otopina. Iz tako pripremljene radne otopine množinske koncentracije 1mM pripremi se 5 standardnih otopina Troloksa (tablica1.), i označe se kao Std 1- Std 5.

*Tablica 1. Standardne otopine Troloksa*

Standardne otopine	Množinska koncentracija (mM)	Masena koncentracija (g/mL)
Std 1	0,4	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Std 2	0,2	$5,0 \cdot 10^{-5}$
Std 3	0,1	$2,5 \cdot 10^{-5}$
Std 4	0,05	$1,3 \cdot 10^{-5}$
Std 5	0,02	$5,0 \cdot 10^{-6}$



*Slika 21. Strukturna formula Troloksa (Preuzeto s Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sial/93510>)*

### 2.2.2.3. Priprema uzoraka meda

Pripremi se 10 mL otopine pojedinog uzorka meda masene koncentracije 200 mg/mL u metanolu. Pripremljene otopine se filtriraju kroz celulozni filter s veličinom pora  $0,45 \mu\text{m}$  i dijametrom 25 mm.

Iz osnovne otopine meda u metanolu, masene koncentracije 200 mg/mL pripreme se razrijeđene otopine meda, koncentracija prikazanih u tablici 2.

**Tablica 2.** Razrijeđene otopine meda

Otopine meda	Osnovna otopina, masena koncentracija (mg/mL)
1.	5
2.	40
3.	80
4.	120
5.	160
6.	200

### **2.2.3. Spektrofotometrijska mjerenja**

#### **2.2.3.1. Mjerenja provedena za određivanje vrijednosti TEAC i % inhibicije**

50  $\mu$ L otopine meda u metanolu masene koncentracije 200 mg/mL se dodaje u plastične kivete (10 mm) u kojima se nalazi 2 mL otopine DPPH u metanolu množinske koncentracije 0,04 mmol/L. Sadržaj kiveta se promiješa. Zatim se 50  $\mu$ L standardnih otopina Troloksa (tablica 1) dodaje u plastične kivete u kojima se također nalazi 2 mL otopine DPPH u metanolu množinske koncentracije 0,04 mmol/L te se sadržaj kiveta promiješa. Kontrolni uzorak se pripremi na isti način, ali bez dodatka antioksidansa. Odnosno u 2 mL otopine DPPH u metanolu se dodaje se 50  $\mu$ L metanola (bez antioksidansa). Kivete sa sadržajem se ostave 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 60 minuta se provedu spektrofotometrijska mjerenja pomoću Lambda Bio 40 spektrofotometra (slika 22.) na  $\lambda = 517$  nm, koristeći optičku polistirensku kivetu od 10 mm (Kartell S.p.A.).



**Slika 22.** Slika Lambda Bio 40 spektrofotometra

Koncentracija Troloksa u reakcijskoj smjesi (tablica 3) (kiveti za spektrofotometrijsko mjerenje) izračunata je pomoću izraza :

$$c_1V_1=c_2V_2$$

gdje je  $c_1$  koncentracija osnovne otopine,  $V_1$  volumen osnovne otopine,  $c_2$  je koncentracija antioksidansa u reakcijskoj smjesi, a  $V_2$  je volumen reakcijske smjese.

**Tablica 3.** Množinska koncentracija Troloksa u reakcijskoj smjesi

Standardne otopine Troloksa	$c$ (Troloks u reakcijskoj smjesi) (mM)
Std 1	0,0097
Std 2	0,0048
Std 3	0,0024
Std 4	0,0012
Std 5	0,0005

Izradi se kalibracijska krivulja za Troloks u rasponu od 0,02-0,40 mM. Dobiveni baždarni pravac prikazuje ovisnost množinske koncentracije pripremljenih otopina standarda o apsorbanciji (A), a rezultati antioksidacijske aktivnosti uzoraka se izraze u Troloks ekvivalentnom antioksidacijskom kapacitetu (TEAC, mmol/kg) nakon trostrukih određivanja.

Koncentracija meda u reakcijskoj smjesi (tablica 4) (kiveti za spektrofotometrijsko mjerenje) izračunata je pomoću izraza :

$$y_1 V_1 = y_2 V_2$$

gdje je  $y_1$  masena koncentracija osnovne otopine,  $V_1$  volumen osnovne otopine,  $y_2$  je masena koncentracija antioksidansa u reakcijskoj smjesi, a  $V_2$  je volumen reakcijske smjese.

**Tablica 4.** Masena koncentracija meda u reakcijskoj smjesi

$y$ (osnovna otopina ispitivanih uzoraka meda) mg/ml	$y$ (med u reakcijskoj smjesi) mg/mL
200	4,9

Mjerenjem vrijednosti apsorbancije određen je postotak inhibicije DPPH radikala izrazom:

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - A_A/A_K) * 100$$

gdje je  $A_A$  apsorbancija uzorka u koji je dodana otopina antioksidansa izmjerena nakon 1 sata, a  $A_K$  apsorbancija kontrolnog uzorka.

Za mjerenje apsorbancije u rasponu valnih duljina vidljive svjetlosti korišten je Cary 60 UV-Vis spektrofotometar (slika 23.). Spektar je snimljen u rasponu valnih duljina od 400 do 800 nm.



**Slika 23.** Cary 60 UV-Vis spektrofotometar

### 2.2.3.2. Mjerenja provedena za određivanje vrijednosti IC<sub>50</sub>

500  $\mu\text{L}$  svake razrijeđene otopine meda (tablica 2) se dodaje u plastične kivete (10 mm) u kojima se nalazi 1,5 mL otopine DPPH u metanolu množinske koncentracije 0,04 mmol/L. Sadržaj kiveta se promiješa. Kivete sa sadržajem se ostave 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 60 minuta se provedu spektrofotometrijska mjerenja pomoću Lambda Bio 40 spektrofotometra (slika 26.) na  $\lambda = 517 \text{ nm}$ , koristeći optičku polistirensku kivetu od 10 mm (Kartell S.p.A.). Kontrolni uzorak je pripremljen kako je opisano u poglavlju 2.2.3.1.

**Tablica 5.** Masena koncentracija meda u reakcijskoj smjesi

Otopine meda	U reakcijskoj smjesi, masena koncentracija (mg/mL)
1.	1,3
2.	10
3.	20
4.	30
5.	40
6.	50

### 3. REZULTATI

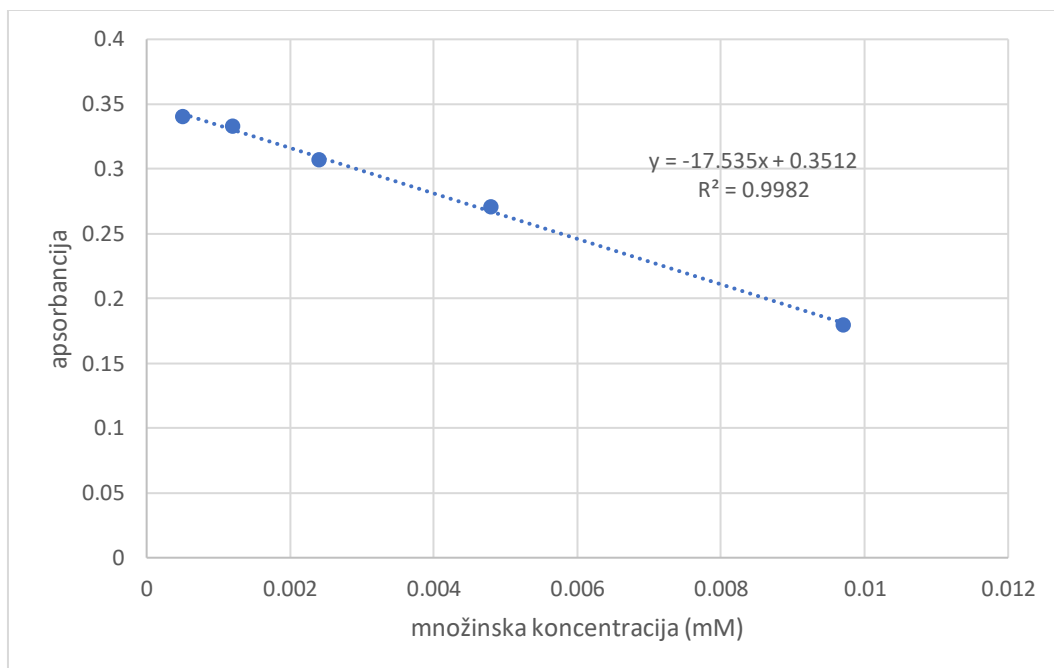
Antioksidacijska aktivnost istraživanih uzoraka meda je izražena na tri načina, i to kao: i) % redukcije ili inhibicije, ii) ekvivalentna koncentracija Troloksa, te kao iii)  $IC_{50}$  vrijednost. Dobiveni rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala odabranih svijetlih vrsta meda su dobiveni kao rezultat tri spektrofotometrijska mjerenja i prikazani su kao srednja vrijednost uz standardu devijaciju.  $IC_{50}$  vrijednost je određena samo za uzorke cvjetnog meda i meda od amorge, budući da su prethodnim mjerenjem pokazali najveću TEAC antioksidacijsku aktivnost, kao i postotak inhibicije.

#### 3.1. Vrijednosti ekvivalentne koncentracije Troloksa (TEAC) i % inhibicije uzoraka meda

##### 3.1.1. Ekvivalentne koncentracije Troloksa

*Tablica 6. Koncentracija Troloksa u reakcijskoj smjesi i izmjerena apsorbancija*

Koncentracija Troloksa u reakcijskoj smjesi (mM)	Apsorbancija (A)
0,0005	0,340
0,0012	0,333
0,0024	0,306
0,0048	0,271
0,0097	0,179



**Slika 24.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o množinskoj koncentraciji Troloksa

Koristeći se jednadžbom pravca prikazanog na slici (slika 24), rezultati antioksidacijske aktivnosti ispitivanih uzorka su izraženi kao ekvivalentne koncentracije Troloksa (TEAC, *engl.* Trolox equivalent antioxidant capacity) po kg uzorka meda (mmol TEAC/kg).

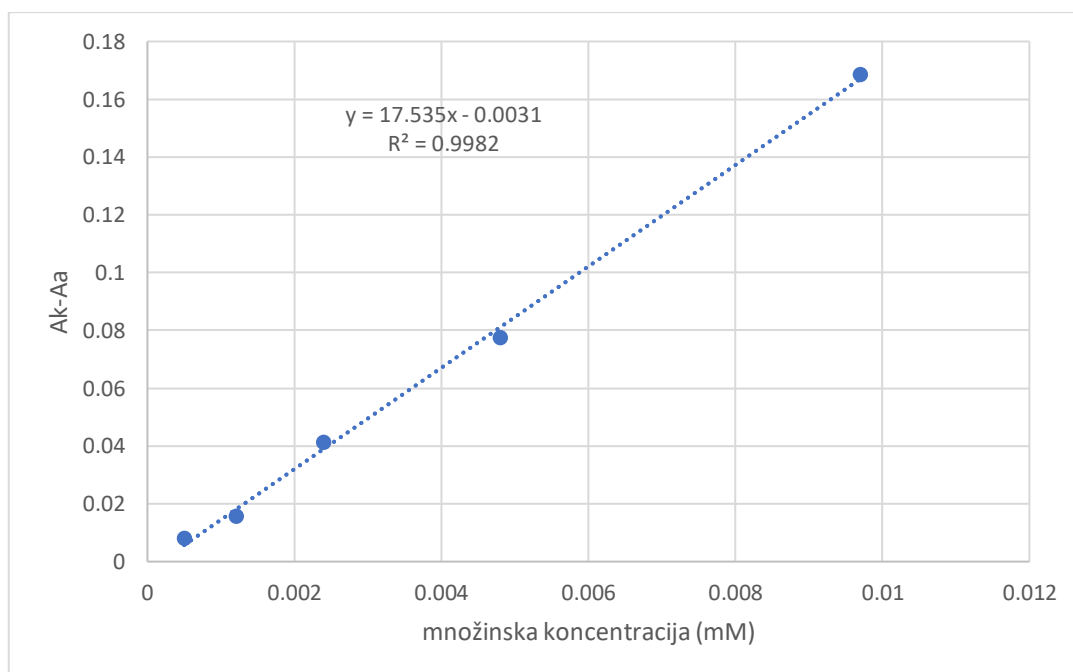
**Tablica 7.** Pojedina vrsta meda i izmjerena apsorbancija

<b>vrsta meda</b>	<b>apsorbancija (A)</b>
med od bagrema	0,3266
med od amorfe	0,3249
cvjetni med	0,3140

**Tablica 8.** Ekvivalentne koncentracije Troloksa po kg uzorka meda

<b>Vrsta meda</b>	<b>mmol TEAC/ kg</b>
med od bagrema	0,28
med od amorfe	0,30
cvjetni med	0,43

Mjerenjem vrijednosti apsorbancije određena je razlika  $A_K$  i  $A_A$ , gdje je  $A_A$  apsorbancija uzorka u koji je dodana otopina antioksidansa izmjerena nakon 1 sata, a  $A_K$  apsorbancija kontrolnog uzorka. Na slici 25 prikazana je ovisnost razlike  $A_K$  i  $A_A$  o množinskoj koncentraciji Troloksa.



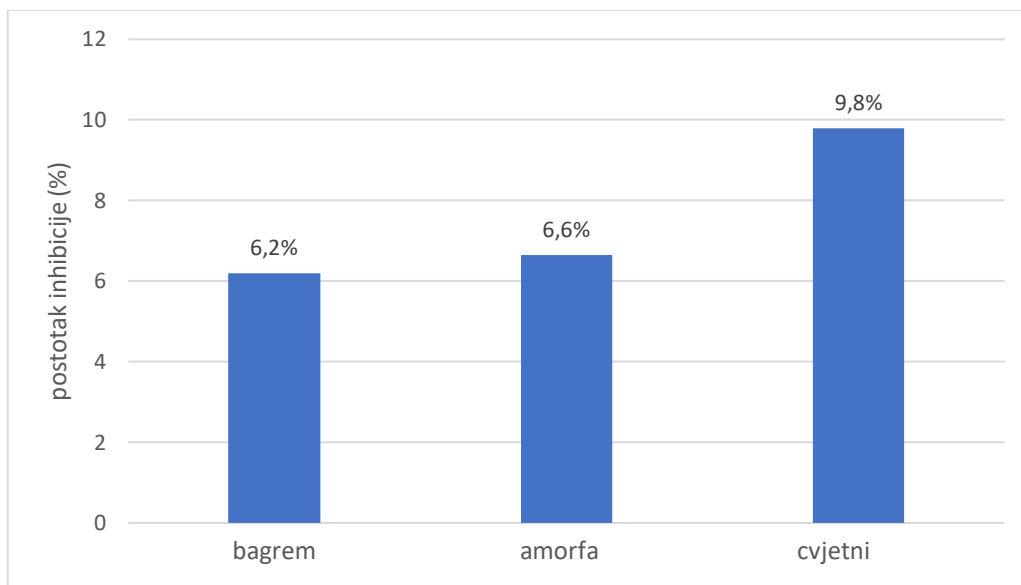
*Slika 25. Grafički prikaz ovisnosti  $A_K - A_A$  o množinskoj koncentraciji Troloksa*

### 3.1.2. Postotak (%) inhibicije uzoraka meda

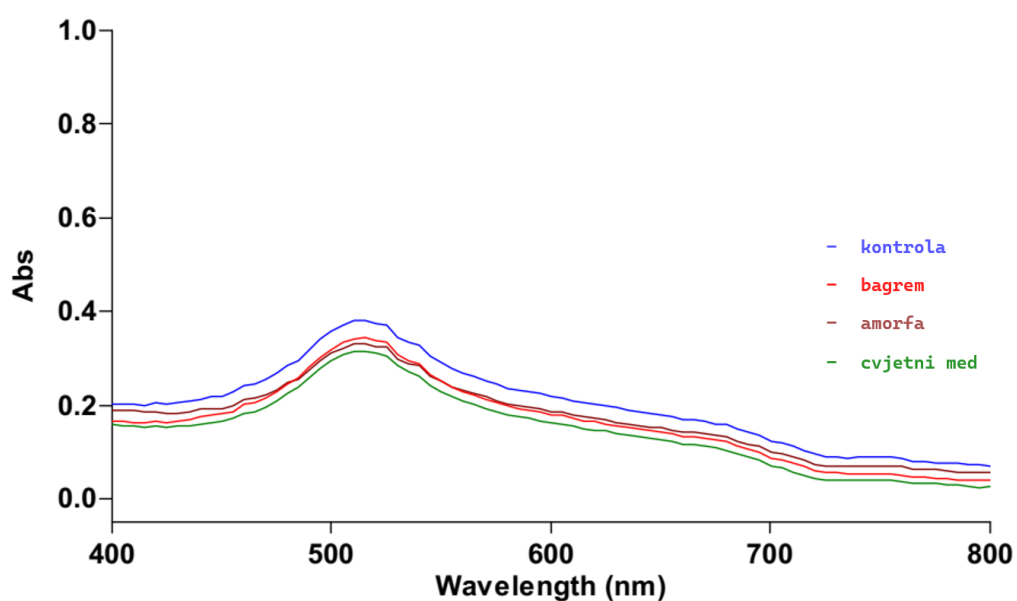
*Tablica 9. Postotak inhibicije uz standardnu devijaciju*

vrsta meda	% inhibicije	standardna devijacija
med od bagrema	6,195%	0,004
med od amorfe	6,644%	0,010
cvjetni med	9,789%	0,003



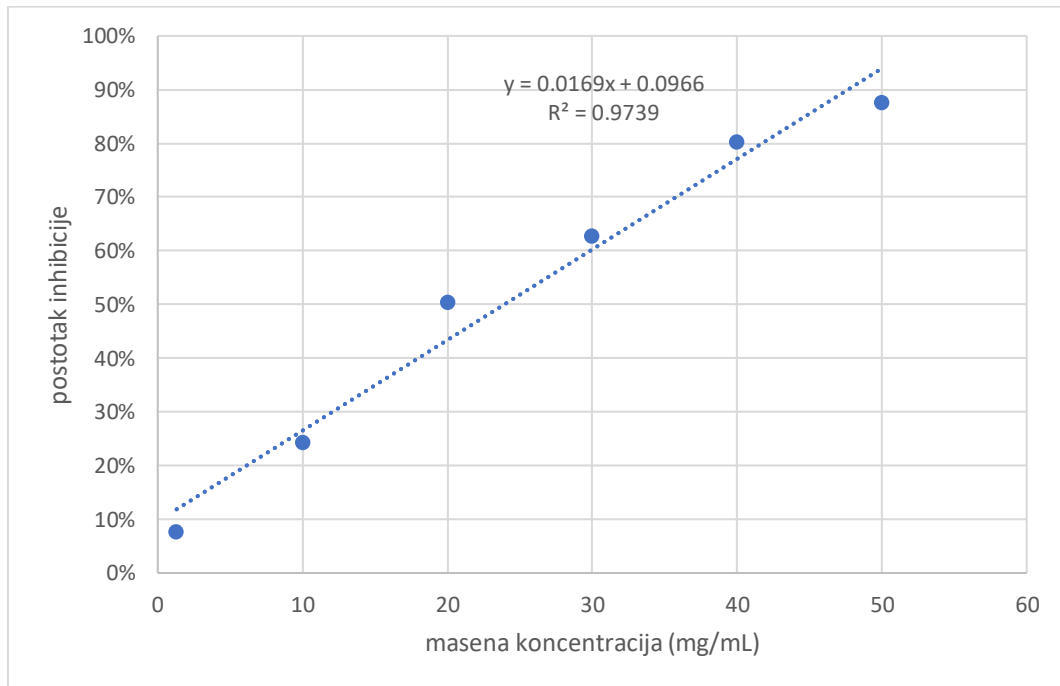


*Slika 26. Grafički prikaz postotka inhibicije (%) DPPH otopine različitim vrstama meda*



*Slika 27. Spektar otopine DPPH radikala nakon dodatka ispitivanih otopina antioksidansa u rasponu valnih duljina od 400 nm do 800 nm uz izraženi apsorpcijski maksimum*

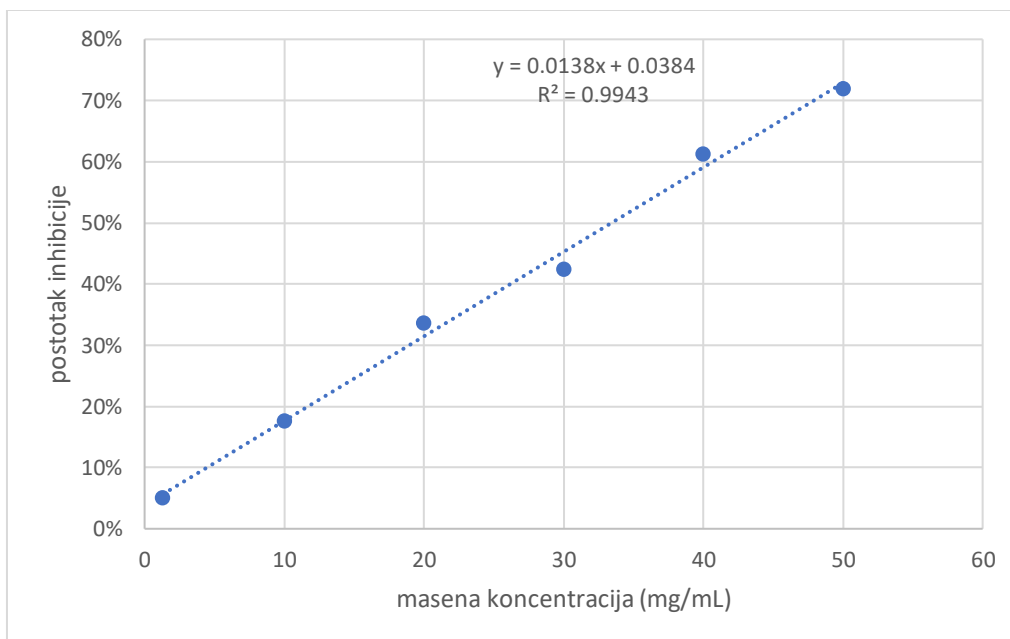
### 3.2. Rezultati mjerenja za određivanje IC<sub>50</sub> vrijednosti uzoraka meda



*Slika 28. Postotak inhibicije otopine DPPH dodatkom različitih koncentracija cvjetnog meda*

*Tablica 10. Postotak inhibicije otopine DPPH i odgovarajuća koncentracije cvjetnog meda*

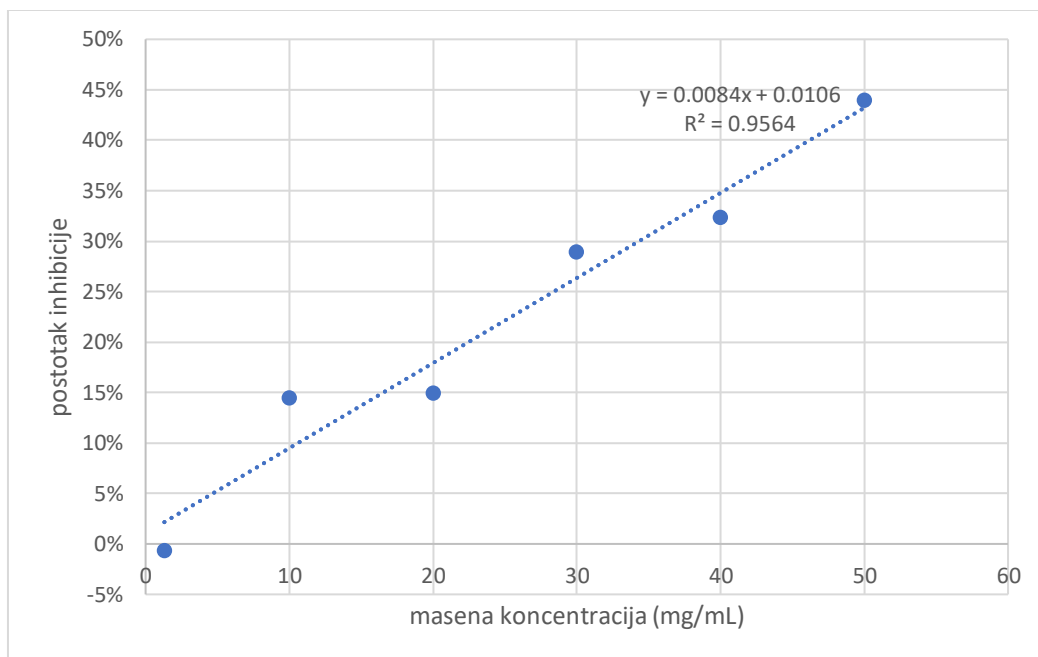
masena koncentracija cvjetnog meda (mg/mL)	postotak inhibicije DPPH
1,3	7,66%
10	24,29%
20	50,36%
30	62,83%
40	80,27%
50	87,60%



**Slika 29.** Postotak inhibicije otopine DPPH dodatkom različitih koncentracija meda od amorfe

**Tablica 11.** Postotak inhibicije otopine DPPH i masene koncentracije meda od amorfe

masena koncentracija meda od amorfe (mg/mL)	postotak inhibicije DPPH
1,3	5,08%
10	17,60%
20	33,55%
30	42,44%
40	61,27%
50	71,97%

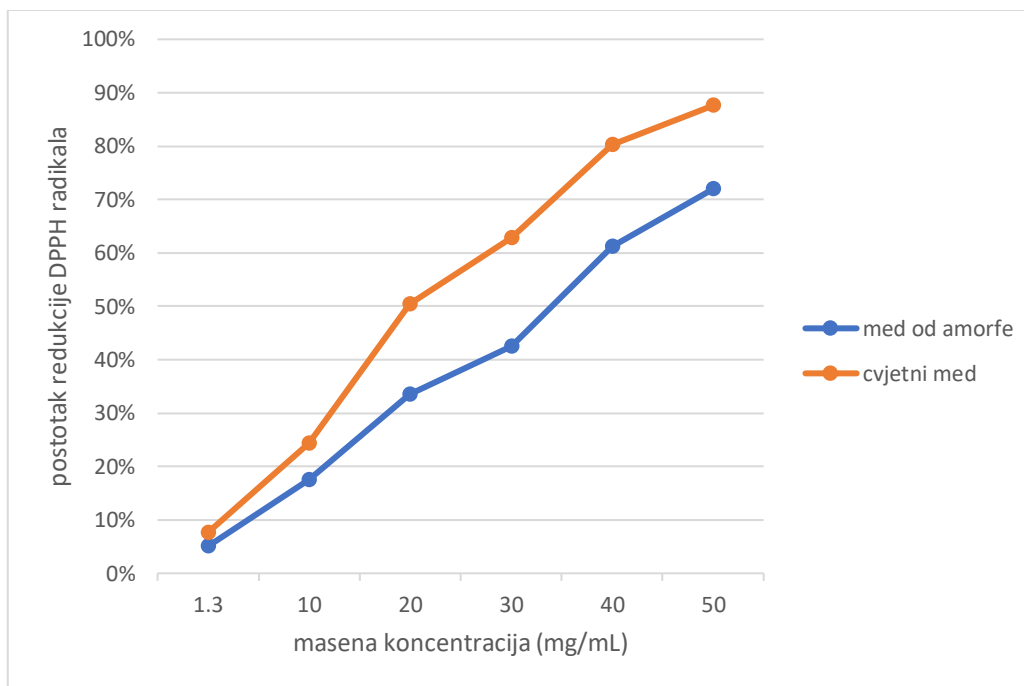


**Slika 30.** Postotak inhibicije otopine DPPH dodatkom različitih koncentracija meda od bagrema

**Tablica 12.** Postotak inhibicije otopine DPPH i koncentracije meda od bagrema

masena koncentracija meda od bagrema (mg/mL)	Postotak inhibicije DPPH
1,3	-0,66%
10	14,49%
20	14,96%
30	28,89%
40	32,32%
50	43,91%

Antioksidacijska aktivnost može se izraziti kao  $IC_{50}$  vrijednost, koncentracija antioksidansa koja je potrebna za redukciju 50% DPPH otopine.  $IC_{50}$  vrijednost određena je grafički (slika 31) za cvjetni med i med od amorfe.



**Slika 31.** Graf ovisnosti masene koncentracije antioksidansa o postotku inhibicije DPPH radikala kod cvjetnog meda i meda od amorfe koji služi za određivanje  $IC_{50}$  vrijednosti

**Tablica 13.** Prikaz  $IC_{50}$  vrijednosti za odabrane vrste meda

vrsta meda	$IC_{50}$ (mg/mL)
med od amorfe	33
cvjetni med	24

#### 4. RASPRAVA

Prikladan način izražavanja rezultata antioksidacijskog kapaciteta uzoraka je pomoću TEAC vrijednosti (mmol /kg), radi usporedbe sa istraživanjima drugih autora. Viša vrijednost TEAC-a upućuje na veću učinkovitost antioksidansa u vezivanju DPPH radikala. TEAC vrijednosti dobivene primjenom DPPH metode na svijetlim vrstama meda je u rasponu od 0,28 do 0,43 mmol TEAC/kg uzorka. Najvišu vrijednost TEAC ima najtamniji med, cvjetni med. Najnižu TEAC vrijednost ima med od bagrema koji je ujedno i najsvjetliji. Iz literature je poznata povezanost antioksidacijske aktivnost i boje meda, pri čemu tamnije vrste meda pokazuju bolju antioksidacijsku aktivnost. U usporedbi dobivenih vrijednosti sa TEAC vrijednostima za tamnije vrste meda, npr. medovi *Satureja* vrsta (1.7 mmol TEAC/kg 0,7 mmmol/kg)<sup>20</sup>. Također koristeći DPPH metodu, može se zaključiti da svijetlije vrste meda imaju niži antioksidacijski kapacitet.

Dobiveni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora dobivenih za druge svijetle vrste meda kao što su med od uljane repice (0,4 mmol TEAC/kg) i med od lipe (0,4 mmol TEAC/kg).<sup>20</sup> TEAC vrijednosti za ove vrste meda približno odgovaraju dobivenoj TEAC vrijednosti za cvjetni med (0,43 mmol TEAC/kg). Za med od bagrema izračunata je TEAC vrijednost od 0,28 mmol TEAC/kg, što je u skladu sa istraživanjima drugih autora za med od bagrema ( vrijednost TEAC 0,3 mmol TEAC/kg).<sup>20</sup>Med od amorfe po boji je između meda od bagrema i cvjetnog meda kao i njegova TEAC vrijednost od 0,31 mmol TEAC/kg.

Povećanjem koncentracije antioksidansa Troloksa raste razlika  $A_K$  i  $A_A$ , što znači da povećanjem koncentracije Troloksa se smanjuje apsorbanacija otopine DPPH radikala.

Postotak inhibicije DPPH radikala ukazuje na učinkovitost antioksidansa u vezivanju slobodnog radikala. Najveći postotak inhibicije ima cvjetni med (9,8%) zatim med od amorfe (6,6%), dok je med od bagrema pokazao najniži postotak inhibicije (6,2%). Dobiveni rezultati su u skladu sa izračunatim TEAC vrijednostima.

Na slici 27 vidljivo je smanjenje vrijednosti apsorbanacije DPPH radikala uz ispitivane antioksidanse na valnim duljinama od 400 nm do 800 nm DPPH uz apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 517 nm. Neki autori kod primjene DPPH metode spektrofotometrijska mjerenjenja vrše na valnoj duljini od 515 nm. Stoga snimanje spektra smjese istraživanog antioksidansa i DPPH radikala u kivetu, u rasponu valnih duljina vidljive svjetlosti korišten je kako bi se vizualno predočilo smanjenje vrijednosti apsorbanacije u ovisnosti o ispitivanom

antioksidansu, te uočila i utvrdila valna duljina ( $\lambda_{\max}$ ) apsorpcijskog maksimuma otopine DPPH radikala. Otopina DPPH (bez dodatka antioksidansa) ima najveću vrijednost apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm, a dodatkom antioksidansa, tj. meda od bagrema i amorfe te cvjetnog meda, vrijednost apsorbancije se snizuje.

Najbolju antioksidacijsku aktivnost pokazao je cvjetni med s postotkom inhibicije od 87.60% pri koncentraciji od 50 mg/mL, dok su pri istim koncentracijama med od amorfe i med od bagrema pokazali postotak inhibicije od 71,97% i 43,91%. Temeljem ovih podataka određena je  $IC_{50}$  vrijednost za svijetle vrste meda koje su pokazale najveće TEAC vrijednosti i najveći % inhibicije, tj. za med od amorfe i cvjetni med. Koncentracija cvjetnog meda koja je potrebna za redukciju 50% DPPH otopine iznosi 23 mg/mL, a meda od amorfe 33 mg/mL.

## 5. ZAKLJUČAK

- Najvišu TEAC vrijednost ima najtamniji med, cvjetni med. Najnižu TEAC vrijednost ima najsvjetliji med, med od bagrema. TEAC vrijednost za med od amorfe je između TEAC vrijednosti cvjetnog meda i meda od bagrema, stoga se može zaključiti da je antioksidacijska aktivnost ovisi o boji meda.
- Povećanjem koncentracije antioksidansa Troloksa smanjuje se apsorbancija DPPH radikala.
- Najveći postotak inhibicije ima cvjetni med (9,8%) zatim med od amorfe (6,6%) , dok je med od bagrema pokazao najniži postotak inhibicije (6,2%) što se ujedno može i pretpostaviti po njihovim bojama, redom od najtamnijeg do najsvjetlijeg.
- Otopina DPPH (bez dodatka antioksidansa) ima najveću vrijednost apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm, a ista se smanjuje dodatkom otopina ispitivanih antioksidansa.
- Koncentracija meda koja je potrebna za redukciju 50% DPPH otopine predstavlja  $IC_{50}$  vrijednost i za cvjetni med iznosi 23,87 mg/mL, a za med od amorfe 33,45 mg/mL.



## 6. LITERATURA

1. Pravilnik o medu, u: Narodne novine, NN 53/2015, Ministarstvo poljoprivrede, 2015
2. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda, u: Narodne novine, NN 20/2000, Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva, 2000.
3. Martinello, M. & Mutinelli, F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* vol. 10 (2021).
4. Al-Kafaween, M. A., Alwahsh, M., Mohd Hilmi, A. B. & Abulebdah, D. H. Physicochemical Characteristics and Bioactive Compounds of Different Types of Honey and Their Biological and Therapeutic Properties: A Comprehensive Review. *Antibiotics* vol. 12 (2023).
5. Pashte, V. V., Pashte, S. V. & Said, P. P. Nutraceutical properties of natural honey to fight health issues: A comprehensive review. *J Pharmacogn Phytochem* **9**, 234–242 (2020).
6. Khalil, M. I., Sulaiman, S. A. & Boukraa, L. *Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. The Open Nutraceuticals Journal* vol. 3 (2010).
7. Bogdanov, S., Ruoff, K. & Persano Oddo, L. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* **35**, S4–S17 (2004).
8. Majtan, Juraj. *Honey : Current Research and Clinical Applications*. (Nova Science Publishers, 2012).
9. Gulcin, İ. & Alwasel, S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* vol. 11 (2023).
10. Kedare, S. B. & Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* vol. 48 412–422 (2011).
11. Ionita, P. The chemistry of dpph· free radical and congeners. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 1–15 (2021).
12. Verma, G. & Mishra, M. DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF UV-VIS SPECTROSCOPY-A REVIEW. *Govinda et al. World Journal of Pharmaceutical Research* **7**, (2018).
13. Guo, Y., Liu, C., Ye, R. & Duan, Q. Advances on water quality detection by uv-vis spectroscopy. *Applied Sciences (Switzerland)* vol. 10 1–18 (2020).

14. Von Der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M. L., Morlot, M. & Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* **35**, S18–S25 (2004).
15. Bodo A, Radavanyi L, Koszegi T et al. Quality evaluation of light- and dark – colored hungarian honeys, focusing on botanical origin, antioxidant capacity and mineral content, *Molecules* **26**, (2021).
16. Hadžiabulić, A. *et al.* Biološke, ekološke i krajobrazne karakteristike bagrema ( Robinia pseudoacacia L.) s primjenom na zelenim površinama grada Knina . *Pomologia Croatica* **21**, (2018).
17. Krpan, A. P. B., Tomašič, Ž. & Bašičpalkovič, P. Biopotencijal amorfe (Amorpha fruticosa L) - Druga godina istraživanja. *Sumar List* **135**, (2011).
18. Jerković, I. *et al.* Characterization of summer savory (Satureja hortensis L.) honey by physico-chemical parameters and chromatographic/spectroscopic techniques (GC-FID/MS, HPLC-DAD, UV/VIS and FTIR-ATR). *Croatia Chemica Acta* **88**, 15–22 (2015).
19. Gul, A., Pehlivan T. Antioxidant activities of some monofloral honey produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2018).
20. Kuś, P. M. et al. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT* **55**, 124–130 (2014).

## METODIČKA PRIPREMA

### Detaljna priprema za nastavni sat

**Ime i prezime studenta:** Nikolina Sučić

**Datum:** /

**Nastavna tema**

Znanost o materijalima

**Razred:** 4

**Nastavna jedinica**

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA ODABRANIH SVIJETLIH VRSTA MEDA

**Cilj sata**

Upoznati se sa antioksidacijskim svojstvima meda.

**Pogrešna poimanja pronađena u znanstvenoj literaturi**

/

**Jezični termini koje su učenici trebali ranije usvojiti**

Kemijska reakcija, otopine, masena koncentracija, množinska koncentracija, spektrofotometrija

**Jezični termini koje treba usvojiti tijekom ove nastavne jedinice**

Antioksidacijska aktivnost, % inhibicije, kemijska jednadžba antioksidansa i DPPH radikala

**Ograničenja – poteškoće s kojima se prilikom poučavanja možemo susresti**

Vremensko ograničenje.

**Udžbenik**

/

**Temeljni koncepti (temeljne ideje)**

Boja meda usko je povezana s antioksidacijskom aktivnošću, tamniji medovi imaju veću antioksidacijsku aktivnost nego što to imaju svjetliji medovi.

Najveći postotak inhibicije ima cvjetni med, zatim med od amorfe, dok je med od bagrema pokazao najniži postotak inhibicije.

**Ishodi učenja**

Nakon obrade nastavne jedinice učenici će moći:

I-1: Navesti sastav meda.

I-2: Objasniti fiziološki učinak meda na organizam.

I-3: Objasniti povezanost boje, sastava meda i antioksidacijskog djelovanja.

I-4: Odrediti postotak inhibicije pojedinog meda.

**Zadatak/pitanje za provjeru ishoda učenja**

1. Navedi od čega se sastoji med.
2. Objasni fiziološki učinak meda na organizam.
3. Poveži boju meda s antioksidacijskim svojstvima.
4. Izračunaj postotak inhibicije za pojedini med koristeći se rezultatima koje dobiješ nakon eksperimenta.

## Poveznica submikroskopskog i makroskopskog „svijeta“

Učenici će moći dovesti u vezu boju meda, njegovu antioksidacijsku aktivnost i sastav.

### Artikulacija (pregledni nacrt nastavnog sata)

STRUKTURNI ELEMENT NASTAVNOG SATA	AKTIVNOSTI UČENIKA	SOCIOLOŠKI OBLIK RADA	TRAJANJE
Uvod	opažanje	frontalni, individualni	5
Obrada	zaključivanje, slušanje, opažanje, čitanje	rad u grupi, individualni, frontalni	35
Ponavljanje	povezivanje, primjenjivanje	Frontalni, individualni	5

### Razrada sata po izvorima znanja i ključnim pojmovima

#### Izvori znanja

Izvor znanja		Konkretan opis što se želi postići svakim od navedenih izvora znanja (navesti prednosti i eventualne nedostatke izvora znanja)
tip	Značenje	
tekst	Sastav meda	Učenici pomoću teksta upoznaju sastav meda i spojeve koji doprinose njegovom antioksidacijskom djelovanju.
tekst	Svojstva meda	Učenici pomoću teksta upoznaju svojstva meda.
Kliznica 2	kemijska jednadžba antioksidansa i DPPH radikala	Učenici pomoću slike uče kako antioksidans utječe na DPPH radikal.
Radni listić	% inhibicije	Učenici pamte formulu % inhibicije kroz korištenje iste u zadatku, te se upoznaju s načinom prikaza dobivenih rezultata.
pokus	antioksidacijska svojstva	Učenici kroz pokus uočavaju razlike u antioksidacijskim aktivnostima različitih vrsta meda, povezuju istu s bojom i sastavom.

#### Ključni pojmovi

KLJUČNI POJAM	Detaljan opis kako će se učenici dovesti do razumijevanja ključnog pojma (u opisu navesti nastavne metode, spoznajne postupke, oblike rada, slike, dijagrame, animaciju...)
kemijska jednadžba antioksidansa i DPPH radikala	Metodom razgovora i usmenog izlaganja pomoću kliznice 2 učenici uče kemijsku jednadžbu između antioksidansa i DPPH radikala. Govorim da je otpina DPPH radikala ljubičaste boje, dodatkom antioksidansa prelazi u svjetlo ljubičastu ili žutu boju. Učenike pitam o čemu ovisi boja otopine i njen intezitet nakon dodatka antioksidansa. Pitam ih mogu li po boji u svojim kivetama odrediti koji med ima najveću antioksidacijsku aktivnost. Govorim da staničnim disanjem u našem organizmu nastaju slobodni radikali te od učenika tražim da povežu korištenje meda i njegov utjecaj na organizam.
Povezanost boje meda, sastava i antioksidacijske aktivnosti	Učenici kroz pokus uočavaju različite rezultate apsorbancije za pojedini med, povezuju ih s njihovim bojama te zaključuju o njihovom sastavu. Kiveta s najsvjetlijim medom ima najviši iznos apsorbancije, što znači da je njegova antioksidacijska aktivnost najmanja, a u svom sastavu sadrži najmanje fenolnih spojeva u usporedbi s druga dva meda. Kiveta s najtamnijim medom ima najniži iznos apsorbancije,

	njegova antioksidacijska aktivnost je najveća te u svom sastavu sadrži najviše fenolnih spojeva u usporedbi s druga dva meda.
% inhibicije	Učenici pamte formulu rješavajući zadatke te se upoznaju s načinom prikazivanja dobivenih rezultata. Uočavaju da najveći % inhibicije ima med najveće antioksidacijske aktivnosti, a najmanji % inhibicije ima med s najmanjom antioksidacijskom aktivnošću.

### Tijek nastavnog sata

UVOD: Pred učenike stavljam tri vrste meda te ih pitam da ih opišu (viskoznost, boja, je li iskristaliziran). Pitam ih koliko često koriste med i u koje svrhe.

OBRADA: Učenike dijelim u grupe. Dijelim radne listiće i potrebne materijale za rad te zadajem vrijeme od 10 minuta da odrade prve 3 točke radnog listića. Za vrijeme čekanja od 20 minuta učenicima dijelim kratki tekst o svojstvima meda za kojeg dobiju vrijeme od 10 minuta da ga pročitaju. Idućih 10 minuta kroz razgovor i frontalni rad učenicima objašnjavam kemijsku jednadžbu DPPH radikala i antioksidansa pomoću kliznice 2. Učenici se vraćaju na praktični dio rada te dovršavaju radni listić. Provjeravamo i diskutiramo o dobivenim rezultatima, tj. povezanosti boje meda, sastava i njegove antioksidacijske aktivnosti (tamniji medovi imaju veću antioksidacijsku aktivnost, a samim time i veći postotak inhibicije, a u svom sastavu sadrže više fenolnih spojeva).

ZAVRŠNI DIO: Učenici dobiju dva nepoznata uzorka meda te trebaju usporediti njihovu antioksidacijsku aktivnost i sastav primjenjujući naučeno.

### **Plan učeničkog zapisa**

#### ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA ODABRANIH SVIJETLIH VRSTA MEDA

- antioksidansi u medu: vitamin C, fenoli, flavonoidi i enzimi.
- antioksidans neutralizira djelovanje radikala
- tamniji medovi imaju veću antioksidacijsku aktivnost, a u svom sastavu sadrže više fenolnih spojeva
- tamniji medovi imaju veći postotak inhibicije

### **Emocionalna procjena**

Očekujem da će učenici biti zainteresirani.

### **Domaći uradak**

	Zadatci za domaći rad	Što se zadatkom želi postići?
1	Pretpostaviti i istražiti razliku u cijenama svijetlih i tamnih medova.	Povezivanje naučenog sa svakodnevnim situacijama te istraživanje istog.

### **Literatura**

1. Martinello, M. & Mutinelli, F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* vol. 10 (2021).
2. Al-Kafaween, M. A., Alwahsh, M., Mohd Hilmi, A. B. & Abulebdah, D. H. Physicochemical Characteristics and Bioactive Compounds of Different Types of Honey and Their Biological and Therapeutic Properties: A Comprehensive Review. *Antibiotics* vol. 12 (2023).

3. Pashte, V. V., Pashte, S. V. & Said, P. P. Nutraceutical properties of natural honey to fight health issues: A comprehensive review. *J Pharmacogn Phytochem* **9**, 234–242 (2020).

4. Khalil, M. I., Sulaiman, S. A. & Boukraa, L. *Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. The Open Nutraceuticals Journal* vol. 3 (2010).

#### **Prilozi**

Radni listić

Ime i prezime:

### **ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA ODABRANIH SVIJETLIH VRSTA MEDA**

#### **Postupak:**

1. Pripremljeno je 50 mL osnovne otopine DPPH radikala u metanolu množinske koncentracije 0,4 mM. Razrjeđenjem osnovne otopine pripremi 10 mL otopine DPPH radikala množinske koncentracije 0,04 mM. Izračunaj volumen potreban za pripremu 10 mL otopine DPPH radikala množinske koncentracije 0,04 mM.

Račun:

2. Pripremi 10 mL otopine pojedinog uzorka meda masene koncentracije 200 mg/mL u metanolu. Izračunaj masu potrebnu za pripravu otopine pojedinog uzorka meda. Pripremljene otopine filtriraj kroz celulozni filter.

Račun:

3. Po 2 mL otopine DPPH množinske koncentracije 0,04 mmol/L dodaj u tri kivete, a zatim i 50  $\mu$ L otopine meda (svaka vrsta meda u jednu kivetu s DPPH otopinom). Sadržaj kiveta promiješaj. Kontrolni uzorak pripremi na način da u kivetu s 2 mL otopine DPPH dodaš 50  $\mu$ L metanola (bez antioksidansa). Kivete sa sadržajem ostavi 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 20 minuta provedi spektrofotometrijska mjerenja i zabilježi podatke.

Apsorbancija (A) kontrolnog uzorka:

vrsta meda	apsorbancija (A)
med od bagrema	
med od amorfe	
cvjetni med	

4. Mjerenjem vrijednosti apsorbancije odredi postotak inhibicije DPPH radikala izrazom:

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - A_A/A_K) * 100$$

gdje je  $A_A$  apsorbancija uzorka u koji je dodana otopina antioksidansa izmjerena nakon 20 min, a  $A_K$  apsorbancija kontrolnog uzorka.

Izračunaj postotak inhibicije i upiši u tablicu. Nacrtaj stupčasti dijagram postotka inhibicije za ispitane medove.

vrsta meda	% inhibicije
med od bagrema	
med od amorfe	
cvjetni med	

Tekst

### SASTAV I SVOJSTVA MEDA

Med je namirnica za koju se smatra da ima svojstva koja pridonose zdravlju. Takva svojstva ovise o kemijskom sastavu koji se može razlikovati među različitim vrstama meda.

Kemijski sastav meda i njegova bioaktivna svojstva uglavnom ovise o cvjetnom izvoru. U sastavu meda najvećim dijelom su prisutni šećeri fruktoza i glukoza, a zatim voda, aminokiseline, enzimi proteini, vitamini, minerali, organske kiseline, fenoli i flavonoidi.

Zbog njegove kiselosti, visoke osmolarnosti, vodikova peroksida, fenolnih kiselina, flavonoida i ostalih tvari med ima antibakterijska i antifungicidna svojstva. Sazrijevanje meda odvija se pomoću enzima koji katalizira oksidaciju glukoze te na taj način nastaje vodikov peroksid. Enzimi pomoću kojih se odvija reakcija potječu od žlijezda medonosnih pčela. pH vrijednost meda iznosi oko 3.2 i 4.5, a visoka osmolarnost je posljedica visokog udjela šećera. Upravo takve karakteristike dovoljna su smetnja rastu bakterija. Svojim protuupalnim djelovanjem med ublažava upalu kože, zacjeljuje rane te potiče regeneraciju kože. Svakodnevnim unosom med jača imunost sustav kod djece te na taj način djeca postaju otpornija na bolesti.

Osim za ljekovite svrhe med se koristi kao hrana visoke energetske vrijednosti zbog ugljikohidrata koje sadrži. Glukoza i fruktoza brzo dopijevaju u krvotok osiguravajući energiju. Med se koristi i u sastavu kozmetičkih proizvoda poput masti za usne, hidratantnih krema, losiona za tijelo, krema za lice, šampona i regeneratora.

Med sadrži antioksidanse kao što su vitamin C, fenoli, flavonoidi i enzimi.

#### Literatura:

1. Martinello, M. & Mutinelli, F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* vol. 10 (2021).
2. Al-Kafaween, M. A., Alwahsh, M., Mohd Hilmi, A. B. & Abulebdah, D. H. Physicochemical Characteristics and Bioactive Compounds of Different Types of Honey and Their Biological and Therapeutic Properties: A Comprehensive Review. *Antibiotics* vol. 12 (2023).
3. Pashte, V. V., Pashte, S. V. & Said, P. P. Nutraceutical properties of natural honey to fight health issues: A comprehensive review. *J Pharmacogn Phytochem* **9**, 234–242 (2020).
4. Khalil, M. I., Sulaiman, S. A. & Boukraa, L. *Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. The Open Nutraceuticals Journal* vol. 3 (2010).



PP prezentacija

ODREĐIVANJE  
ANTIOKSIDACIJSKOG  
POTENCIJALA ODABRANIH  
SVIJETLIH VRSTA MEDA

