

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jasna BERTONCELJ

**IDENTIFIKACIJA IN VSEBNOST NEKATERIH
ANTIOKSIDANTOV V SLOVENSKEM MEDU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SOME
ANTIOXIDANTS IN SLOVENIAN HONEY**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2008

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva, na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Analize so bile opravljene na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, v laboratorijih Katedre za vrednotenje živil, Katedre za tehnologijo mesa in Katedre za tehnologije rastlinskih živil.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 14. 02. 2006, je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja živilstva. Za mentorico doktorske disertacije je bila imenovana prof. dr. Terezija Golob in za somentorico prof. dr. Veronika Abram.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Janko Božič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Terezija Golob
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Veronika Abram
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Nada Vahčić
Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnički fakultet, Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Datum zagovora: 19. 12. 2008

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka:
Jasna Bertoncelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 638.165: 638.162: 543.641.062: 543.92 (043) = 163.6
KG med / fenolne spojine / flavonoidi / fenolne kisline / ABA / SPE / HPLC-MS / antioksidativna učinkovitost / DPPH / FRAP / botanično poreklo / senzorične lastnosti / barva / L^* a b^* parametri / korelacije
AV BERTONCELJ, Jasna, univ. dipl. inž. živilske tehnologije
SA GOLOB, Terezija (mentorica) / ABRAM, Veronika (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva
LI 2008
IN IDENTIFIKACIJA IN VSEBNOST NEKATERIH ANTIOKSIDANTOV V SLOVENSKEM MEDU
TD Doktorska disertacija s področja živilstva
OP XIII, 124 str., 28 pregl., 24 sl., 25 pril., 135 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z raziskavo smo v različnih vrstah slovenskega medu žeeli določiti vsebnost skupnih, kot tudi posameznih fenolnih spojin, ovrednotiti njegovo antioksidativno učinkovitost in barvo ter ugotoviti, če med obravnavanimi parametri obstajajo povezave. Vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena s Folin-Ciocalteujevo (FC) metodo, je bila največja v medovih iz mane, smrekovem, hojevem in gozdnem medu. Najmanj skupnih fenolnih spojin smo določili v akacijevem in lipovem medu. Fenolne spojine smo iz medu ekstrahirali na trdno fazo (SPE) ter jih analizirali s HPLC/MS. V analiziranih vzorcih medu smo identificirali in kvantitativno določili nekatere fenolne kisline in flavonoide. Vzorci različnih vrst slovenskega medu so imeli podoben, a kvantitativno različen fenolni profil. S pomočjo standardnih spojin smo določili *p*-kumarno, kavno, elaginsko in klorogensko kislino ter flavonoide miricetin, luteolin, kvercetin, naringenin, apigenin, kamferol, pinocembrin, krizin in galangin. Domnevno smo na podlagi molskih mas identificirali še cimetino in β -fenilmlečno kislino ter flavonoide pinobanksin, tricetin, izoramnetin, pinostrobin, fisetin in eriodiktiol. Poleg fenolnih spojin smo z uporabljenimi pogoji ločbe določili še dve nefenolni spojini, *cis-trans* abscizinsko kislino ter domnevno tudi *trans-trans* abscizinsko kislino. Z dobljenimi rezultati nismo dokazali, da slovenski med vsebuje markerje, ki bi nakazovali botanično poreklo medu, zato bi bilo potrebno nadaljevati zastavljeno delo z analizo večjega števila vzorcev medu ter dodatnimi standardnimi spojinami. Antioksidativna učinkovitost posameznih vrst slovenskega medu, določena z DPPH in FRAP metodo, je naraščala v naslednjem vrstnem redu: akacijev < lipov < cvetlični < kostanjev < gozdni < smrekov < hojev med. Barva analiziranih vzorcev slovenskega medu je bila zelo različna in je variirala od skoraj brezbarvne do temno rjave. Ovrednotili smo jo z instrumentalnimi metodami. Na podlagi vrednosti parametra L^* , ki določa svetlost vzorca, uvrščamo slovenski akacijev, lipov in cvetlični med v skupino svetlejših medov, ostale vrste medu, to so kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med, pa v skupino temnejših medov. Iz izmerjenih a^* in b^* parametrov barve medu sklepamo, da so analizirani vzorci medu vsebovali rumene, rdeče in zelene komponente. Dokazali smo obstoj statistično značilnih korelacij med obravnavanimi parametri. Temnejši medovi so vsebovali več skupnih fenolnih spojin, določenih s FC metodo, in imeli višjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi s svetlejšimi vrstami medu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 638.165: 638.162: 543.641.062: 543.92 (043) = 163.6
CX honeys / phenolics / flavonoids / phenolic acids / ABA / SPE / HPLC-MS / antioxidant activity / DPPH / FRAP / botanical origin / sensory properties / colour / L^{*} a^{*} b^{*} parameters / correlations
AU BERTONCELJ, Jasna
AA GOLOB, Terezija (supervisor) / ABRAM, Veronika (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and Biotechnical sciences, field: Food Science and Technology
PY 2008
TI IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SOME ANTIOXIDANTS IN SLOVENIAN HONEY
DT Doctoral dissertation
NO XIII, 124 p., 28 tab., 24 fig., 25 ann., 135 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of the study was to determine the content of total and individual phenolic compounds, antioxidant activity and colour of different types of Slovenian honeys and to investigate the possible relationships among analysed parameters. Total phenolic content, determined by the Folin-Ciocalteu (FC) method, was found to be the highest in honeydew types of honey, namely spruce, fir and forest, while acacia and lime honeys showed low total phenolic content. Phenolic compounds were extracted from honey by SPE and further analysed by HPLC/MS. Several phenolic acids and flavonoids were identified and quantified in analysed honey samples. The samples had similar, but quantitatively different phenolic profile. *p*-coumaric acid, caffeic acid, ellagic acid, chlorogenic acid, myricetin, luteolin, quercetin, naringenin, apigenin, kaempferol, pinocembrin, chrysin and galangin were detected with standard compounds, while cinnamic acid, β -phenyllactic acid, pinobanksin, tricetin,isorhamnetin, pinostrobin, fisetin and eriodictyol were only tentatively identified on the basis of their molecular weights. Two non-phenolic compounds, *cis-trans* abscisic acid and tentatively *trans-trans* abscisic acid, were also determined under the separation conditions used. Obtained results did not show that Slovenian honeys have specific compounds – markers for eventual determination of botanical origin of honey. Further analyses of more honey samples with additional standard compounds should be performed to find possible markers. Antioxidant activity of different honey types determined by DPPH and FRAP methods increased in the order: acacia < lime < multiflora < chestnut < forest < spruce < fir honey. The colour of analysed samples of Slovenian honey was noticeably different and varied from almost colourless to dark brown. It was evaluated with instrumental methods. On the basis of L^{*} parameter, that indicates lightness, Slovenian acacia, lime and multiflora honeys can be placed in the group of light honeys, while the other honey types, namely chestnut, spruce, fir and forest belong to dark honeys. From the measured a^{*} and b^{*} parameters of honey colour it was observed that the analysed honey samples had red, yellow and green colour components. Statistically significant correlations between analysed parameters were confirmed. Darker honey types contained more total phenolic compounds, determined by the FC method and had higher antioxidant activity as compared with lighter types of honey.

KAZALO VSEBINE

str.

| | |
|---|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)..... | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | VIII |
| KAZALO SLIK | X |
| KAZALO PRILOG..... | XI |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XII |
| SLOVARČEK | XIII |

| | |
|--|-----------|
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA | 1 |
| 1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 4 |
| 2.1 FENOLNE SPOJINE | 4 |
| 2.1.1 Flavonoidi..... | 4 |
| 2.1.1.1 Flavonoidi v medu..... | 7 |
| 2.1.2 Fenolne kisline | 9 |
| 2.1.2.1 Fenolne kisline v medu | 10 |
| 2.1.3 Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin (flavonoidov in fenolnih kislin) | 10 |
| 2.1.4 Metode za določanje antioksidativne učinkovitosti (AU) | 11 |
| 2.1.4.1 DPPH metoda | 12 |
| 2.1.4.2 ABTS metoda | 13 |
| 2.1.4.3 FRAP metoda | 13 |
| 2.1.4.4 ORAC metoda | 14 |
| 2.1.4.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti z β -karotenom..... | 14 |
| 2.1.5 Analize fenolnih spojin | 14 |
| 2.1.5.1 Določanje flavonoidov in fenolnih kislin v medu..... | 16 |
| 2.1.6 Povezava med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo..... | 18 |
| 2.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST MEDU..... | 19 |
| 2.2.1 Vpliv skladiščenja na antioksidativno učinkovitost medu | 21 |
| 2.3 BARVA MEDU | 22 |
| 2.4 POVEZAVA MED VSEBNOSTJO FENOLNIH SPOJIN V MEDU, NJEGOVO ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO IN BARVO | 23 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | MATERIAL IN METODE | 25 |
| 3.1 | VZORCI | 25 |
| 3.2 | METODE DELA | 26 |
| 3.2.1 | Določanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov in senzorična analiza medu | 26 |
| 3.2.1.1 | Določanje vsebnosti vode | 26 |
| 3.2.1.2 | Določanje električne prevodnosti medu | 26 |
| 3.2.1.3 | Določanje kislosti medu s titrimetrično metodo (AOAC 962.19, 1999) | 27 |
| 3.2.1.4 | Senzorična analiza medu | 27 |
| 3.2.2 | Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo | 28 |
| 3.2.3 | Določanje vsebnosti posameznih fenolnih spojin (fenolnih kislin in flavonoidov) s HPLC/MS | 28 |
| 3.2.3.1 | Ekstrakcija fenolnih spojin iz medu s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi – SPE | 28 |
| 3.2.3.2 | Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masnim spektrometrom (HPLC/MS) | 29 |
| 3.2.4 | Določanje antioksidativne učinkovitosti | 33 |
| 3.2.4.1 | DPPH metoda (Beretta in sod., 2005) | 33 |
| 3.2.4.2 | FRAP metoda (Benzie in Strain, 1996) | 35 |
| 3.2.5 | Merjenje barve medu | 36 |
| 3.2.5.1 | Instrumentalno merjenje barve z Minolta kromametrom | 36 |
| 3.2.5.2 | Spektrofotometrično merjenje barve | 37 |
| 3.2.6 | Določanje vsebnosti prolina | 37 |
| 3.2.7 | Določanje vsebnosti skupnih beljakovin | 39 |
| 3.2.8 | Statistična obdelava podatkov | 40 |
| 4 | REZULTATI | 42 |
| 4.1 | REZULTATI DOLOČANJA NEKATERIH OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV IN SENZORIČNA ANALIZA MEDU | 42 |
| 4.2 | REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN | 43 |
| 4.3 | REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN (FENOLNIH KISLIN IN FLAVONOIDOV) S HPLC/MS | 44 |
| 4.3.1 | Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih snovi v medu s HPLC/MS | 45 |
| 4.3.2 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v akacijevem medu | 45 |
| 4.3.3 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v lipovem medu | 49 |
| 4.3.4 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v cvetličnem medu | 50 |
| 4.3.5 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v kostanjevem medu | 51 |
| 4.3.6 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v smrekovem medu | 52 |
| 4.3.7 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v hojevem medu | 54 |
| 4.3.8 | Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v gozdnem medu | 55 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.3.9 | Primerjava vsebnosti posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline v različnih vrstah medu in prisotnost morebitnih markerjev za ugotavljanje botaničnega porekla medu | 56 |
| 4.4 | REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI MEDU | 59 |
| 4.5 | VPLIV SKLADIŠENJA MEDU NA VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST | 60 |
| 4.6 | REZULTATI MERJENJA BARVE MEDU | 62 |
| 4.6.1 | Instrumentalno merjenje barve z Minolta kromametrom..... | 62 |
| 4.6.2 | Spektrofotometrično določanje barve medu | 64 |
| 4.7 | VPLIV LETA PRIDELAVE MEDU NA ANALIZIRANE PARAMETRE | 64 |
| 4.8 | REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PROLINA IN BELJAKOVIN V MEDU | 66 |
| 4.9 | KORELACIJE | 67 |
| 4.9.1 | Medsebojne korelacije med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in posameznimi flavonoidi, fenolnimi kislinami ter abscizinsko kisline | 67 |
| 4.9.2 | Povezava med vsebnostjo fenolnih spojin v medu, določeno s FC metodo, in njegovo antioksidativno učinkovitostjo..... | 68 |
| 4.9.3 | Povezava med vsebnostjo posameznih fenolnih spojin v medu in njegovo antioksidativno učinkovitostjo..... | 69 |
| 4.9.4 | Povezava med barvo medu in vsebnostjo fenolnih spojin v medu, določeno s FC metodo ter njegovo antioksidativno učinkovitostjo | 70 |
| 4.9.5 | Povezava med vsebnostjo fenolnih spojin v medu, njegovo antioksidativno učinkovitostjo in barvo ter nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri medu..... | 72 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 73 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 73 |
| 5.1.1 | Osnovni fizikalno-kemijski parametri | 73 |
| 5.1.2 | Vsebnost skupnih fenolnih spojin | 73 |
| 5.1.3 | Vsebnost flavonoidov in fenolnih kislin..... | 74 |
| 5.1.4 | Antioksidativna učinkovitost medu | 82 |
| 5.1.5 | Barva | 83 |
| 5.1.6 | Vpliv letnika medu na analizirane parametre..... | 85 |
| 5.1.7 | Korelacijs | 86 |
| 5.1.8 | Zaključne ugotovitve..... | 89 |
| 5.2 | SKLEPI | 90 |
| 6 | POVZETEK | 92 |
| 6.1 | SUMMARY | 95 |
| 7 | VIRI | 99 |
| | ZAHVALA | 110 |
| | PRILOGE | 111 |

KAZALO PREGLEDNIC

str.

| | | |
|------------------------|--|----|
| Preglednica 1: | Vrste fenolnih in nefenolnih spojin medu z antioksidativnim delovanjem (Tomás-Barberán in sod., 2001; Gheldorf in sod., 2002; Al-Mamary in sod., 2002) | 19 |
| Preglednica 2: | Značilnosti barve različnih vrst slovenskega medu (Golob in sod., 2002; Bertoncelj in sod., 2007)..... | 23 |
| Preglednica 3: | Analizirani vzorci medu..... | 25 |
| Preglednica 4: | Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti posameznih fenolnih kislin in flavonoidov | 30 |
| Preglednica 5: | Priprava umeritvene krivulje za kvantitativno določanje flavonoidov in fenolnih kislin po metodi standardnega dodatka in internega standarda..... | 33 |
| Preglednica 6: | Razredčitve izhodne raztopine medu | 34 |
| Preglednica 7: | Vsebnost vode, električna prevodnost (χ), vrednost pH in vsebnost skupnih kislin v različnih vrstah medu | 42 |
| Preglednica 8: | Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti domnevno identificiranih fenolnih kislin in flavonoidov | 45 |
| Preglednica 9: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih akacijevega medu | 46 |
| Preglednica 10: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih lipovega medu | 49 |
| Preglednica 11: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih cvetličnega medu..... | 51 |
| Preglednica 12: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih kostanjevega medu | 52 |
| Preglednica 13: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih smrekovega medu..... | 53 |
| Preglednica 14: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih hojevega medu..... | 54 |
| Preglednica 15: | Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih gozdnega medu..... | 55 |
| Preglednica 16: | IC_{50} , $1/\text{IC}_{50}$ in FRAP vrednosti v različnih vrstah medu | 59 |
| Preglednica 17: | Vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost (AU) svežih in eno leto starih vzorcev medu | 61 |
| Preglednica 18: | Povprečne vrednosti nekaterih analiziranih parametrov različnih vrst medu glede na letnik | 65 |
| Preglednica 19: | Območja vsebnosti nekaterih fenolnih spojin in abscizinske kisline v različnih vrstah medu glede na letnik | 66 |
| Preglednica 20: | Vsebnost prolina in beljakovin v različnih vrstah medu | 67 |
| Preglednica 21: | Korelacijski koeficienti med nekaterimi flavonoidi in fenolnimi kislinami | 68 |
| Preglednica 22: | Koeficienti determinacije in korelacije za zvezo med AU in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za posamezne vrste medu | 69 |

| | | |
|------------------------|---|----|
| Preglednica 23: | Korelacijski koeficienti (R) med antioksidativno učinkovitostjo, določeno z DPPH oz. FRAP metodo, ter posameznimi flavonoidi in fenolnimi kislinami | 70 |
| Preglednica 24: | Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri barve medu in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ter AU medu | 71 |
| Preglednica 25: | Pearsonovi korelacijski koeficienti med vsebnostjo skupnih in nekaterih individualnih fenolnih spojin, abscizinske kisline, AU ter barve medu in nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri medu | 72 |
| Preglednica 26: | Fenolni profil akacijevega medu različnega geografskega porekla | 78 |
| Preglednica 27: | Fenolni profil kostanjevega medu različnega geografskega porekla | 79 |
| Preglednica 28: | Pearsonovi korelacijski koeficienti med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, AU, barvo in električno prevodnostjo glede na izvor medu | 88 |

KAZALO SLIK

str.

| | | |
|------------------|--|----|
| Slika 1: | Shema fenolnih spojin glede na število fenolnih podenot (Robbins in Bean, 2004) | 4 |
| Slika 2: | Osnovna struktura formula flavonoidov: flavan (a) in 4-okso-flavonoid (b) (Aherne in O'Brien, 2002) | 5 |
| Slika 3: | Struktura glavnih razredov flavonoidov (Balasundaram in sod., 2006)..... | 5 |
| Slika 4: | Medsebojne povezave različnih podskupin flavonoidov (Rice-Evans in sod., 1996) | 6 |
| Slika 5: | Kemijska struktura flavonov in glavni predstavniki v medu (de Rijke in sod., 2006)..... | 7 |
| Slika 6: | Kemijska struktura flavonolov in glavni predstavniki v medu (de Rijke in sod., 2006)..... | 8 |
| Slika 7: | Kemijska struktura flavanonov in glavni predstavniki v medu (de Rijke in sod., 2006)..... | 8 |
| Slika 8: | Kemijska struktura nekaterih fenolnih kislin (Mattila in Kumpulainen, 2002)..... | 9 |
| Slika 9: | Struktura formula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila – radikal DPPH [•] in reducirana oblika DPPH ₂ (Molyneux, 2004)..... | 12 |
| Slika 10: | Abscizinska kislina, A: <i>trans-trans</i> , B: <i>cis-trans</i> izomera (Ferrerres in sod., 1996)..... | 21 |
| Slika 11: | HPLC/DAD kromatogram standardne raztopine pri 290 nm (a) in 340 nm (b). Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4..... | 31 |
| Slika 12: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram standardne raztopine. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4 | 32 |
| Slika 14: | Vsebnost skupnih fenolnih spojin v različnih vrstah medu | 43 |
| Slika 15: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram akacievega medu (vzorec A18). Za identifikacijo vrhov glej preglednici 4 in 8..... | 47 |
| Slika 16: | HPLC/DAD kromatogram akacievega medu (vzorec A18) pri 290 nm (a) in 340 nm (b). Za identifikacijo vrhov glej preglednici 4 in 8..... | 48 |
| Slika 17: | Območja vsebnosti in povprečne vrednosti nekaterih fenolnih spojin v različnih vrstah medu..... | 57 |
| Slika 18: | Primerjava DPPH in FRAP metode..... | 60 |
| Slika 19: | Vrednosti parametra L [*] v različnih vrstah medu | 62 |
| Slika 20: | Vrednosti a [*] in b [*] parametrov v analiziranih vzorcih medu | 63 |
| Slika 21: | Vrednosti b [*] in L [*] parametrov v analiziranih vzorcih medu..... | 63 |
| Slika 22: | Zveza med antioksidativno učinkovitostjo, določeno s FRAP metodo (a) oz. DPPH metodo (b) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu | 68 |
| Slika 23: | Zveza med barvo medu (L [*] vrednost) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin..... | 70 |
| Slika 24: | Zveza med barvo medu (L [*] vrednost) in antioksidativno učinkovitostjo (FRAP) | 71 |

KAZALO PRILOG

str.

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Priloga A1: | Podatki za umeritveno krivuljo določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin | 111 |
| Priloga A2: | Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin..... | 111 |
| Priloga A3: | Standardni dodatek galne kisline..... | 111 |
| Priloga B1: | Primer HPLC/MS kromatograma hesperetina, kamferola, apigenina in krizina. Za identifikacijo vrhov glej Preglednico 4 | 112 |
| Priloga B2: | Podatki umeritvenih krivulj za spojine določene s HPLC/MS..... | 112 |
| Priloga B3: | Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih spojin znotraj paralelke naključnega vzorca medu (vzorec S29) | 113 |
| Priloga B4: | Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih spojin med paralelkami naključnega vzorca za akacijev med (vzorec A21) | 113 |
| Priloga B5: | Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih snovi med paralelkami naključnega vzorca za cvetlični med (vzorec C29) | 114 |
| Priloga B6: | Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih spojin med paralelkami naključnega vzorca za gozdni med (vzorec G24)..... | 114 |
| Priloga B7: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram lipovega medu (vzorec L26) | 115 |
| Priloga B8: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram cvetličnega medu (vzorec C6)..... | 115 |
| Priloga B9: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram kostanjevega medu (vzorec K36)..... | 116 |
| Priloga B10: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram smrekovega medu (vzorec S27) | 116 |
| Priloga B11: | HPLC/DAD kromatogram smrekovega medu (S27) pri 290 nm (a) in 340 nm (b) | 117 |
| Priloga B12: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram hojevega medu (vzorec H10) | 118 |
| Priloga B13: | HPLC/ESI(–)/MS kromatogram gozdnega medu (vzorec G12) | 118 |
| Priloga C1: | Rezultati merjenja AU vzorca kostanjevega medu K23 z DPPH metodo..... | 119 |
| Priloga C2: | Odvisnost preostalega DPPH (%) od koncentracije medu | 119 |
| Priloga D1: | Podatki za umeritveno krivuljo določanja antioksidativne učinkovitosti (AU) s FRAP metodo | 120 |
| Priloga D2: | Umeritvena krivulja za določanje AU s FRAP metodo | 120 |
| Priloga E1: | Barvne karakteristike različnih vrst slovenskega medu | 121 |
| Priloga E2: | Zveza med parametroma a^* in L^* barve medu..... | 121 |
| Priloga E3: | Zveza med neto absorbanco in parametrom L^* barve medu | 122 |
| Priloga F1: | Korelacije med individualnimi fenolnimi spojinami..... | 123 |
| Priloga F2: | Zveza med barvo medu (L^* vrednost) in antioksidativno učinkovitostjo (DPPH).... | 124 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|------------------|--|
| A | akacijev med |
| AAPH | 2,2'-azobis (2-amidino propan) |
| ABA | abscizinska kislina |
| ABTS | 2,2'-azinobis (3-etylbenzo tiazolin-6-sulfonat) |
| ANOVA | analiza variance |
| APCI | (angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization), kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku |
| APPI | (angl. Atmospheric Pressure Photoionization), fotoionizacija pri atmosferskem tlaku |
| AU | antioksidativna učinkovitost |
| C | cvetlični med |
| DPPH | 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil |
| ESI | (angl. Electrospray Ionization), ionizacija z elektrorazprševanjem |
| FC | Folin-Ciocalteu |
| FRAP | (angl. Ferric Reducing Antioxidant Power), antioksidativna moč redukcije železa |
| G | gozdni med |
| GA | galna kislina |
| GAE | ekvivalent galne kisline |
| H | hojev med |
| HPLC | (angl. High Performance Liquid Chromatography), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| HPLC/MS | tekočinska kromatografija v povezavi z masno spektrometrijo |
| IC ₅₀ | koncentracija učinkovitosti |
| K | kostanjev med |
| KV | koeficient variabilnosti |
| L | lipov med |
| LC | (angl. Liquid Chromatography), tekočinska kromatografija |
| L * a * b * | parametri barvnega prostora |
| M | molska masa (g/mol) |
| MS | masni spektrometer oz. masna spektrometrija |
| ORAC | (angl. Oxygen Radical Absorbance Capacity), učinkovitost lovljenja kisikovih radikalov |
| R | koeficient korelacije po Pearsonu |
| R ² | koeficient determinacije |
| S | smrekov med |
| SD | standardna deviacija |
| SIR | (angl. Selected Ion Recording) |
| SPE | (angl. Solid Phase Extraction), ekstrakcija na trdni fazi |
| v/v | (angl. volume/volume), volumski delež |
| w/v | (angl. weight/volume), masni delež |
| w/w | (angl. weight/weight), masna koncentracija |
| \bar{x} | povprečna vrednost |
| x _{max} | največja vrednost |
| x _{min} | najmanjša vrednost |
| χ | električna prevodnost |

SLOVARČEK

| | |
|------|--|
| ABA1 | <i>trans-trans</i> abscizinska kislina |
| ABA2 | <i>cis-trans</i> abscizinska kislina |
| API | apigenin |
| CIM | cimetna kislina |
| ELA | elaginska kislina |
| ERI | eriodiktiol |
| FIS | fisetin |
| FM | β -fenilmlečna kislina |
| GA | galna kislina |
| GAL | galangin |
| HES | hesperetin |
| IR | izoramnetin |
| KAM | kamferol |
| KAV | kavna kislina |
| KLO | klorogenska kislina |
| KRI | krizin |
| KUM | <i>p</i> -kumarna kislina |
| KVE | kvercetin |
| LUT | luteolin |
| MIR | miricetin |
| NAR | naringenin |
| PB | pinobanksin |
| PC | pinocembrin |
| PS | pinostrobin |
| TRI | tricetin |

1 UVOD

Nekatere raziskave v zadnjih letih so pokazale, da je med učinkovito sredstvo proti oksidacijskim procesom v živilih, npr. proti oksidaciji lipidov v mesu in proti encimskemu porjanjenju sadja in zelenjave. Tako se kaže velik potencial in možnost njegove uporabe kot naravnega antioksidanta in hkrati potrjuje uporabnost medu v preventivne in terapevtske namene (Chen in sod., 2000; McKibben in Engeseth, 2002).

Antioksidanti so molekule s stabilno strukturo, ki upočasnijo ali preprečijo oksidacijo pomembnih celičnih sestavin na različne načine. Kot lovilci radikalov se po reakciji z radikali pretvorijo v stabilnejše in manj škodljive snovi, ki jih organizem izloči. Raziskave dokazujejo, da antioksidanti pomagajo zavirati razvoj nekaterih obolenj, zmanjšujejo tveganje za razvoj rakavih obolenj, ateroskleroze, bolezni srca in ožilja, raznih vnetij in artritisa. Izboljšajo delovanje imunskega sistema in preventivno delujejo pred procesi staranja (The National Honey Board, 2003).

V zadnjem času je veliko raziskav namenjenih antioksidativni učinkovitosti medu. Med je zelo kompleksno živilo, saj vsebuje več kot 200 različnih fitokemijskih sestavin – biološko aktivnih snovi, katerih sestava je odvisna od botaničnega in tudi geografskega porekla medu. Glavne sestavine medu so ogljikovi hidrati, predvsem glukoza in fruktoza, voda in mineralne snovi. Spojine, ki so v medu prisotne v manjših količinah in kažejo antioksidativne lastnosti, so fenolne kisline in flavonoidi, nekateri encimi (katalaza, peroksidaza, glukoza-oksidaza), askorbinska kislina, α -tokoferol, karotenoidi, organske kisline, produkti Maillardove reakcije, aminokisline in proteini (Gheldorf in sod., 2002). Po ugotovitvah različnih raziskovalcev je antioksidativni potencial medu rezultat kombinirane aktivnosti teh komponent, s čimer lahko razložimo biološko-terapevtske lastnosti medu. Antioksidativna učinkovitost medu je odvisna tudi od botaničnega porekla. Znano je, da imajo temnejši medovi večjo vsebnost antioksidantov.

Viri flavonoidov v medu so propolis, čebelji vosek, nektar in cvetni prah. Glede na to ločimo flavonoide, ki izvirajo iz propolisa in/ali čebeljega voska, kot so npr. pinocembrin, pinobanksin, krizin, tektokrizin, galangin, ter flavonoide, katerih vir je nektar in/ali cvetni prah, kamor sodijo večkrat hidroksilirani aglikoni flavonoidov, npr. kamferol, kvercetin, luteolin, apigenin in drugi (Soler in sod., 1995). Vsebnost flavonoidov v posameznem vzorcu medu je močno odvisna od sestave nektarja ter njegovega izvora. Skupna vsebnost flavonoidov znaša okoli 0,5 % v cvetnem prahu in 10 % v propolisu, medtem ko je v medu flavonoidov znatno manj (Anklam, 1998).

Določanje antioksidativnega potenciala medu in karakterizacija fenolnih in ostalih komponent v medu, ki bi utegnile biti odgovorne za njegov antioksidativni učinek, je bistvenega pomena za izpopolnitve znanja o medu, kot viru antioksidantov.

1.1 NAMEN DELA

V zadnjem času je bilo opravljenih veliko raziskav, ki se nanašajo na identifikacijo in vsebnost fenolnih spojin v medu različnega botaničnega in geografskega porekla kot tudi določitev antioksidativne učinkovitosti medu, vendar zaenkrat teh podatkov še nimamo o slovenskem medu. Predstavljena študija bo dala vpogled v polifenolno sestavo medu kot tudi oceno o antioksidativni učinkovitosti različnih vrst slovenskega medu.

V Sloveniji imamo zaradi raznolikosti flore različne vrste medu, najpogosteji so kostanjev, akacijev, lipov, hojev, smrekov, cvetlični in gozdni med.

Pri spremeljanju tuje literature smo ugotovili, da obstajajo podatki za antioksidativno učinkovitost in fenolni profil akacijevega, lipovega, kostanjevega, mešanega cvetličnega medu ter medu iz mane, vendar je rezultatov relativno malo in zajemajo le manjše število vzorcev, zato so za potrditev dobljenih rezultatov potrebne nadaljnje analize. Poleg tega še ni razpoložljivih podatkov za hojev in smrekov med, ki sta tudi značilna za Slovenijo.

Zato smo z našo študijo želeli na večjem številu vzorcev različnih vrst slovenskega medu določiti antioksidativni potencial medu in karakterizirati fenolne in ostale spojine, ki bi utegnile biti odgovorne za njegov antioksidativni učinek ter tako izpopolniti naše znanje o medu, kot viru antioksidantov. Ugotovili bomo ali lahko analiza fenolnih spojin, med njimi flavonoidov, poleg ostalih fizikalno-kemijskih in mikroskopskih metod ter senzorične analize, služi kot tehnika za določanje botaničnega porekla medu.

V raziskavo smo vključili večje število vzorcev slovenskega medu različnega botaničnega porekla: akacijev, lipov, cvetlični, kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med. Vzorce smo zbirali tri leta neposredno pri čebelarjih na območju cele Slovenije in opravili naslednje analize:

- določanje nekaterih osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu (vsebnost vode, vsebnost skupnih kislin, vrednost pH, električna prevodnost) in senzorična analiza za potrditev vrste medu,
- spektrofotometrično določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin,
- identifikacijo in kvantitativno določitev posameznih fenolnih spojin (fenolnih kislin in flavonoidov) v več fazah: ekstrakcijo fenolnih spojin iz medu s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in uporabo HPLC v povezavi z masno spektrometrijo,
- spektrofotometrično določanje antioksidativne učinkovitosti z dvema metodama: merjenje sposobnosti lovljenja radikalov z DPPH metodo in določanje skupne antioksidativne učinkovitosti s FRAP metodo,
- merjenje barve medu spektrofotometrično in s kromometrom Minolta CR 200B (L^* a^* b^* sistem),
- določanje vsebnosti nekaterih nefenolnih komponent medu, ki lahko prispevajo k skupni antioksidativni aktivnosti (vsebnost proteinov, proline, skupnih kislin),
- statistično obdelavo rezultatov z namenom poiskati obstoj korelacij med obravnavanimi parametri ter ugotoviti, če obstajajo statistično značilne razlike med posameznimi vrstami slovenskega medu.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Znano je, da botanično poreklo medu vpliva na njegove fizikalno-kemijske in senzorične značilnosti in verjetno tudi njegovo sposobnost antioksidativnega učinkovanja. Zato smo na začetku poskusa postavili naslednje hipoteze:

- Pričakujemo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin ter posameznih flavonoidov in fenolnih kislin pa tudi razlike v antioksidativni učinkovitosti različnih vrst medu. Temnejši medovi (kostanjev, smrekov, hojev in gozdni) bodo imeli višji antioksidativni

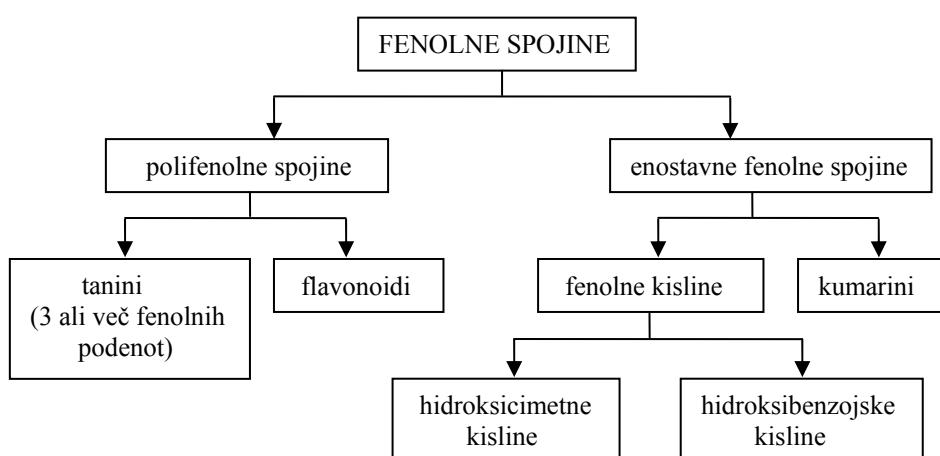
potencial ter večjo vsebnost fenolnih snovi v primerjavi s svetlejšimi vrstami medu (akacijev, lipov in cvetlični).

- Predvidevamo, da bomo z uporabo različnih metod dobili podobne rezultate za antioksidativno učinkovitost analiziranih vrst medu.
- Ker medu običajno ne uživamo popolnoma svežega, ampak šele nekaj časa po pridobivanju, bomo na nekaterih vzorcih medu spremljali vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost, določeno s FRAP metodo, tudi po določenem času skladiščenja na sobni temperaturi. Pričakujemo, da se bo vsebnost skupnih fenolnih spojin kot tudi antioksidativna učinkovitost s časom zmanjševala.
- Pričakujemo, da imajo nekateri medovi tipične markerje – flavonoide, ki so značilni samo za posamezno vrsto medu, zato bomo HPLC profil fenolnih spojin lahko uporabili za določitev botaničnega porekla nekaterih vrst medu.
- Pričakujemo, da bodo korelacije med obravnavanimi parametri statistično značilne.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti in so prisotne v vseh rastlinah. Imajo najmanj en aromatski obroč z eno ali več hidroksilnimi (-OH) skupinami direktno vezanimi na obroč. Njihova strukturna oblika variira od enostavnih fenolnih molekul do kompleksnih polimerov z visoko molsko maso. Običajno so v glikozilirani obliki, kar poveča njihovo topnost v vodi (Bravo, 1998).



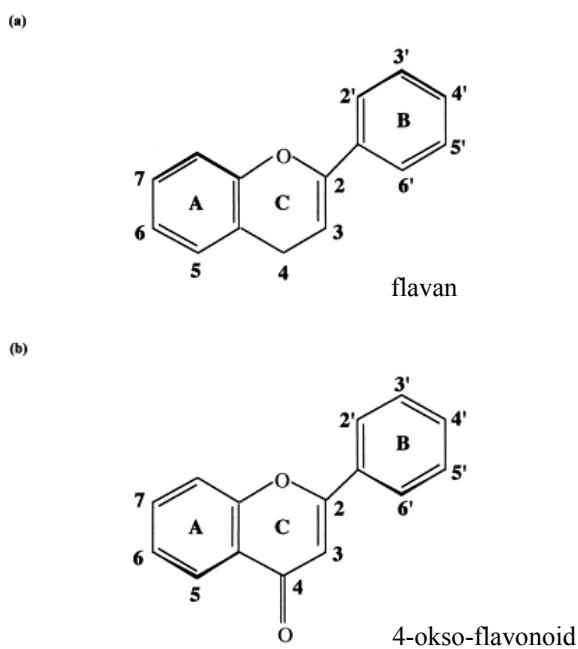
Slika 1: Shema fenolnih spojin glede na število fenolnih podenot (Robbins in Bean, 2004)
Figure 1: Classification scheme of phenolics according to number of phenol subunits (Robbins and Bean, 2004)

2.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi so zelo razširjene v vodi topne fenolne spojine, ki imajo 15 C-atomov in osnovno strukturo $C_6-C_3-C_6$, imenovano flavan (slika 2a) oziroma 2-fenilbenzopiran. Nekateri viri navajajo, da je poznanih več kot 5000 flavonoidov (Bravo, 1998; Abram, 2000; Sivam, 2002; Gómez-Caravaca in sod., 2006a).

Flavonoidi spadajo v skupino nizkomolekularnih polifenolnih snovi. Nastanejo v glavnem s povezavo dveh biosintežnih poti – šikimat/arogenat in acetat/malonatne poti. Najprej nastane aromatska aminokislina fenilalanin po šikimatni poti iz fosfoenolpiruvata in eritroze-4-fosfata. Fenilalanin preide najprej v *trans*-cinamat in po hidroksilaciji v 4-kumarat (C-9). Nato se ta spojina aktivira v 4-kumaroil-CoA in kondenzira s tremi malonil-CoA (C-2), tvori se intermediat halkon (C-15). Zaprtje obroča C in hidratacija vodi k nastanku spojin kot so 3-hidroksiflavonoidi (catehini) in 3,4-hidroksiflavonoidi (flavonoli). Struktura flavonoidov je odvisna od flavonoidnega jedra, ki sestoji iz treh fenolnih obročev A, B in C (slika 2a). Obroč A (benzen) je kondenziran s šestčlenskim obročem (C), ki ima na drugem mestu vezano fenilno skupino. Obroč C je lahko heterociklični piran ali piron. Izraz 4-okso-flavonoid (slika 2b) se pogosto uporablja za flavonoide, kot so flavanoni, flavonoli in flavoni, ki imajo karbonilno skupino na mestu

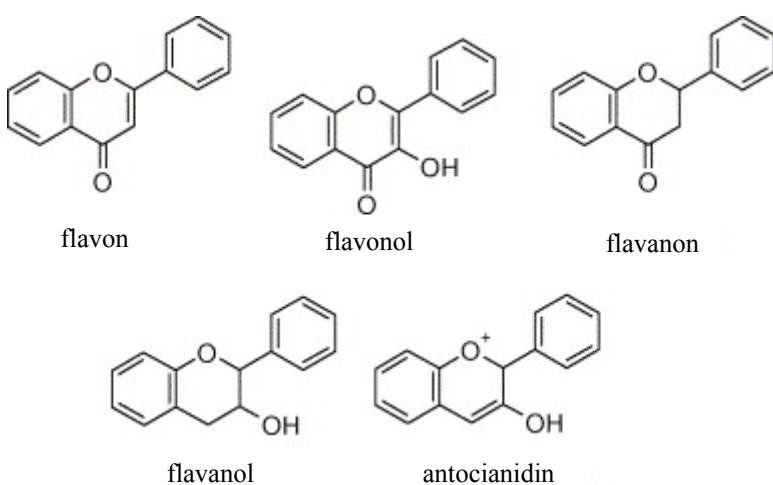
C-4 obroča C (Aherne in O'Brien, 2002). Ogljikovi atomi v obroču B se poleg številke označujejo še z opuščajem (1', 2',...) (slika 2).



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov: flavan (a) in 4-oxo-flavonoid (b) (Aherne in O'Brien, 2002)

Figure 2: Generic structure of a flavonoid molecule: flavan nucleus (a) and 4-oxo-flavonoid nucleus (b) (Aherne and O'Brien, 2002)

Flavonoidi so razdeljeni v skupine glede na stopnjo oksidacije na obroču C (C-2, 3, 4) in jih delimo na flavone, flavonole, flavanole (katehine), flavanone, izoflavone in antocianidine. Struktura flavonov, flavonolov, flavanonov, flavanolov in antocianidinov je prikazana na sliki 3.



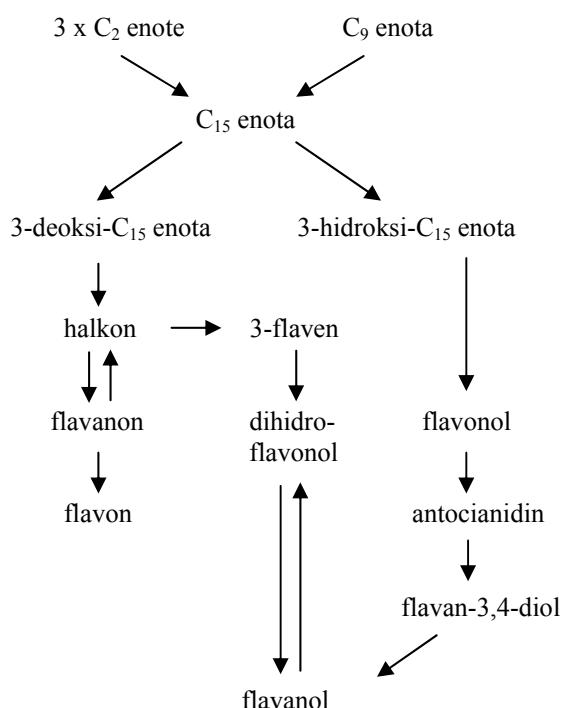
Slika 3: Struktura glavnih razredov flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)

Figure 3: Generic structure of major classes of flavonoids (Balasundram et al., 2006)

K flavonoidom prištevamo tudi halkone, dihidrohalkone in avrone, ki strukturno sicer niso flavonoidi, pač pa so njim zelo sorodne spojine, tako kemijsko kot biosintetsko (Hollman in sod., 1996; Bravo, 1998; Harborne, 2000). Flavonoidi so običajno hidroksilirani na mestih 3, 5, 7, 3', 4' in/ali 5'. Pogosto je H-atom v eni ali več hidroksilnih skupinah nadomeščen z metilno, acetilno, prenilno ali sulfatno skupino (de Rijke in sod., 2006).

Flavonoidi so rastlinske snovi, ki jih živali in ljudje ne morejo sintetizirati. Nahajajo se v sadju, zelenjavci, žitaricah, zrnih, zeliščih, stročnicah in tudi v medu. Prav tako vsebujejo flavonoide tudi pihače rastlinskega izvora, npr. vino, čaj, kava, sokovi, kakav. Meso, mleko, jajca, ribe in morski sadeži flavonoidov ne vsebujejo (Petersen in Dwyer, 1998).

Flavanoni in flavoni so pogosto prisotni v istih rastlinah, npr. v citrusih, medtem ko flavonov in flavonolov običajno ne najdemo skupaj, enako velja tudi za flavanone in antocianidine. Izoflavoni pa se od ostalih petih skupin flavonoidov ločijo po tem, da jih v večjih koncentracijah najdemo v stročnicah, zlasti soji. Flavone in flavonole so identificirali v skoraj vseh rastlinah, najpogostejši pa so tisti s hidroksi skupino na mestih C-3' in C-4' obroča B (Rice-Evans in sod., 1996; Aherne in O'Brien, 2002).



Slika 4: Medsebojne povezave različnih podskupin flavonoidov (Rice-Evans in sod., 1996)
Figure 4: Interconnections of flavonoid subgroups (Rice-Evans et al., 1996)

V rastlinah so flavonoidi pogosto kot *O*- ali *C*-glikozidi; *O*-glikozidna vez je veliko bolj pogosta kot *C*-glikozidna. *O*-glikozidi imajo ogljikov hidrat vezan na hidroksilno skupino aglikona, običajno na mestu 3 ali 7, medtem ko imajo *C*-glikozidi ogljikohidratno komponento vezano na ogljikov atom aglikona, običajno na mestu C-6 ali C-8. Le redki flavonoidi imajo ogljikov hidrat vezan na obroču B. Vezani ogljikovi hidrati so najbolj pogosto glukoza, galaktoza, arabinosa, ramnoza, redkeje ksiloza ali manzo. Hidroksi

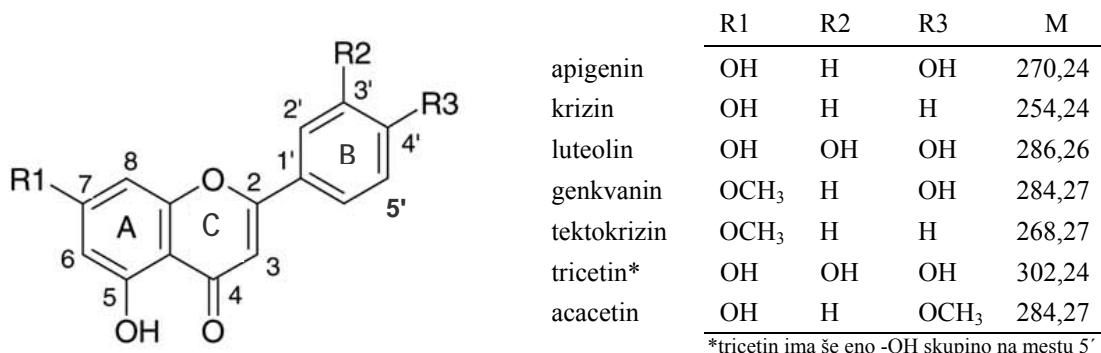
skupine na ogljikohidratni komponenti so lahko zaestrene še z alifatsko ali aromatsko kislino. Nesladkorni del molekule v taki spojni imenujemo aglikon. Različni aglikoni imajo eno ali več -OH skupin, ki se lahko povežejo z glikozidno vezjo na ogljikove hidrate. Ponavadi je taka vez β -glikozidna. Flavonoidi imajo lahko na eno -OH skupino vezan en monosaharid, disaharid ali trisaharid. Tedaj govorimo o monozidih, diozidih in triozidih. Lahko je tudi več -OH skupin vezanih na ogljikove hidrate. Če je na dve -OH skupini vezan po en monosaharid, se tak flavonoid imenuje dimonozid. Nastanek glikozidov je pomemben za rastlino, ker se s tem zmanjša toksičnost, poveča pa topnost fenolne spojine v vodi (Rice-Evans in sod., 1996; Bravo, 1998; Heim in sod., 2002; de Rijke in sod., 2006).

2.1.1.1 Flavonoidi v medu

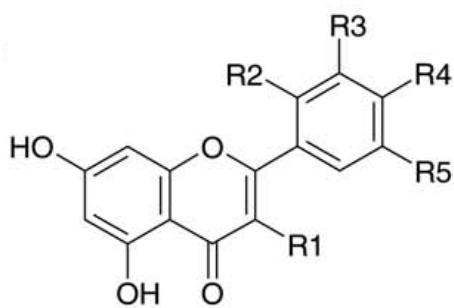
Viri flavonoidov v medu so propolis, čebelji vosek, nektar in cvetni prah. Glede na to ločimo flavonoide, ki izvirajo iz propolisa in/ali čebeljega voska, kot so npr. pinocembrin, pinobanksin, krizin, tektokrizin, galangin, ter flavonoide, katerih vir je nektar in/ali cvetni prah, kamor sodijo večkrat hidroksilirani aglikoni flavonoidov npr. kamferol, kvercetin, luteolin, apigenin in drugi (Soler in sod., 1995).

Propolis je naravni izdelek čebel, sestavljen iz različnih rastlinskih smol, balzamov, voskov in eteričnih olj, ki jih proizvajajo rastline ter obogaten z izločki čebeljih žlez (Pietta in sod., 2002; Ahn in sod., 2007). Kemijske sestavine propolisa čebele vgradijo v med, v katerem so najpogosteje zastopani flavonoidi, ki izvirajo iz propolisa. Flavonoidi, ki izvirajo iz nektarja in peloda, se tam večinoma nahajajo v obliki glikozidov, vendar pod vplivom delovanja encima glikozidaze, ki je prisotna v čebeljih žlezah slinovkah, hidrolizirajo, zato v medu najdemo samo flavonoide v obliki aglikonov (Gil in sod., 1995; Serra Bonvehí in sod., 2001; D'Arcy, 2005).

Glavne skupine flavonoidov v medu so flavoni, flavonoli in flavanoni, katerih strukturne formule in značilni predstavniki so prikazani na slikah 5 do 7.



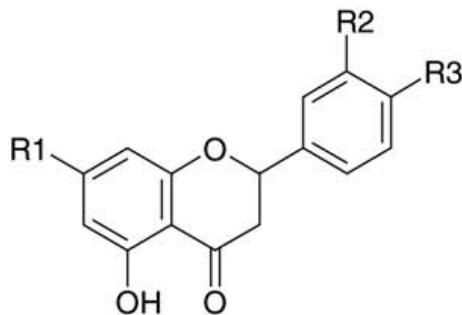
Slika 5: Kemijska struktura flavonov in glavni predstavniki v medu (de Rijke in sod., 2006)
Figure 5: Flavone chemical structure and common honey flavones (de Rijke et al., 2006)



| | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | M |
|-------------|----|----|------------------|----|----|--------|
| kvercetin | OH | H | OH | OH | H | 302,23 |
| kamferol | OH | H | H | OH | H | 286,24 |
| miricetin | OH | H | OH | OH | OH | 318,24 |
| galangin | OH | H | H | H | H | 270,24 |
| izoramnetin | OH | H | OCH ₃ | OH | H | 316,26 |

Slika 6: Kemijska struktura flavonolov in glavni predstavniki v medu (de Rijke in sod., 2006)

Figure 6: Flavonol chemical structure and common honey flavonols (de Rijke et al., 2006)



| | R1 | R2 | R3 | M |
|--------------|------------------|----|------------------|--------|
| pinocembrin | OH | H | H | 256,25 |
| pinobanksin* | OH | H | H | 272,26 |
| pinostrobin | OCH ₃ | H | H | 270,28 |
| naringenin | OH | H | OH | 272,26 |
| hesperetin | OH | OH | OCH ₃ | 302,28 |
| eriodiktiol | OH | OH | OH | 288,06 |

*pinobanksin ima še eno -OH skupino na na mestu 3

Slika 7: Kemijska struktura flavanonov in glavni predstavniki v medu (de Rijke in sod., 2006)

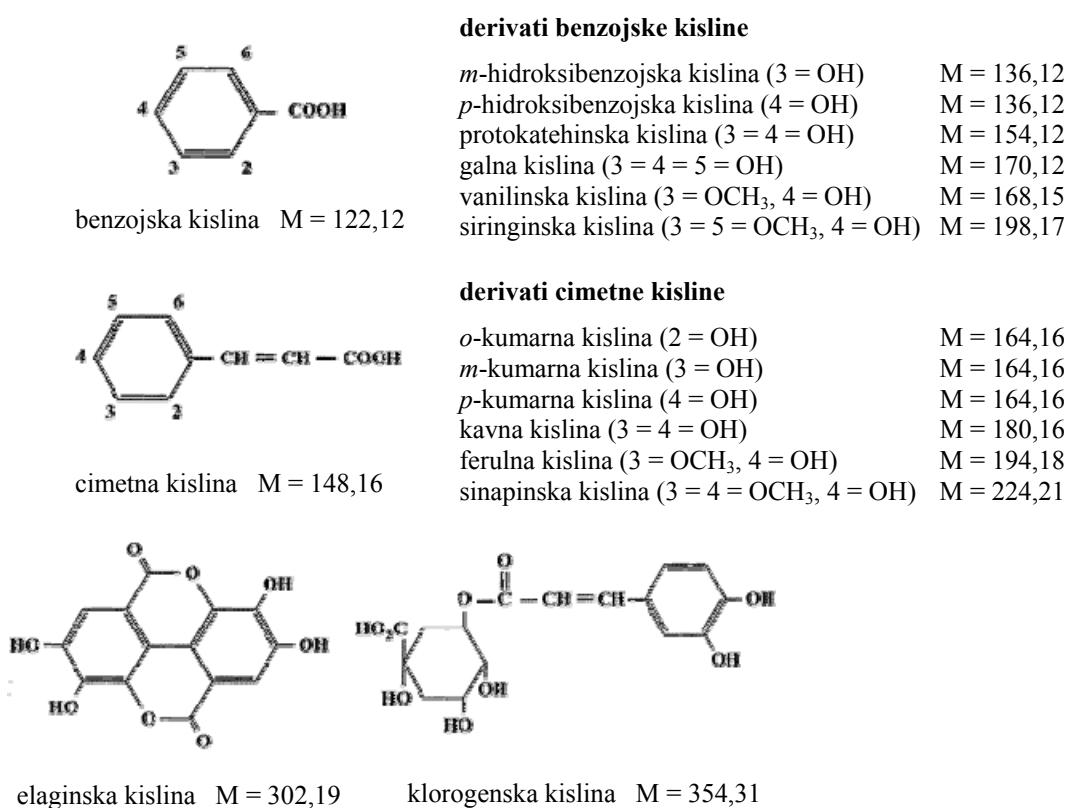
Figure 7: Flavanone chemical structure and common honey flavanones (de Rijke et al., 2006)

Različni avtorji (Soler in sod., 1995; Martos in sod., 1997; Martos in sod., 2000a; Tomás-Barberán in sod., 2001; Gheldof in sod., 2002; Yao in sod., 2004a; Pulcini in sod., 2006) so raziskovali vsebnost flavonoidov v medu z namenom ugotoviti, če obstaja korelacija z botaničnim poreklom. Botanično poreklo je eden glavnih parametrov kakovosti medu in igra pomembno vlogo pri ceni posameznih vrst medu. Karakteristični flavonoidi, ki izvirajo iz propolisa: pinocembrin, pinobanksin in krizin so prisotni v večini medov v različnih količinah. Zato iz njihove prisotnosti in vsebnosti v medu ne moremo sklepati na botanično poreklo medu. Nekatere vrste medu pa imajo t.i. tipične markerje – flavonoide, ki so značilni samo za posamezno vrsto medu. Tomás-Barberán in sodelavci (2001) so s pomočjo HPLC analizirali fenolni profil evropskih vrstnih medov z namenom določiti morebitne specifične markerje za posamezne vrste. Rezultati študije kažejo, da HPLC profil fenolnih spojin lahko uporabimo za določitev botaničnega porekla nekaterih vrst medu, npr. kostanjevega, lipovega, evkaliptusovega, resinega, repičinoga, rožmarinovega in sončničnega. Nekateri medovi, kot sta akacijev in sivkin, pa značilnih markerjev nimajo, zato pri njih določitev porekla, z vsebnostjo posameznih flavonoidov, ni mogoča. Gheldof in sod. (2002) so določali fenolni profil ameriškega medu različnega botaničnega porekla. Kromatogrami fenolnih frakcij medu, dobljeni s HPLC metodo, so pokazali, da imajo medovi različnih vrst podoben, toda kvantitativno različen fenolni profil.

2.1.2 Fenolne kisline

Fenolne kisline oziroma aromatske kisline izvirajo iz fenilpropanoidnega metabolizma v rastlinah. Sestavlja jih dve podskupini, gre za hidroksilirane derivate benzojske in cimetne kisline (slika 8). Med hidroksibenzojske kisline sodijo galna, *p*-hidroksibenzojska, protokatehinska, vanilinska in siringinska kislina, ki imajo C₆-C₁ strukturo. Druga podskupina so hidroksicimetne kisline, aromatske spojine s stransko verigo iz treh C-atomov (struktura C₆-C₃). Najbolj običajne so *p*-kumarna, kavna, ferulna in sinapinska kislina. Strukturne razlike med posameznimi fenolnimi kislinami so majhne in izvirajo iz števila in mesta hidroksilne in metoksi skupine na aromatskem obroču (Mattila in Kumpulainen, 2002; Robbins in Bean, 2004).

Samo majhen del fenolnih kislin je v rastlinah v prosti obliki. Hidroksicimetne kisline se pogosto nahajajo v obliki enostavnih estrov s kina kislino ali glukozo, najbolj znana je klorogenska kislina. Nasprotno so hidroksibenzojske kisline večinoma prisotne v obliki glikozidov. Elaginska kislina pa je dimerni kondenzacijski produkt oz. lakton galne kisline (Mattila in Kumpulainen, 2002).



Slika 8: Kemijska struktura nekaterih fenolnih kislin (Mattila in Kumpulainen, 2002)
Figure 8: Chemical structures of some phenolic acids (Mattila and Kumpulainen, 2002)

Fenolne kisline so, tako kot flavonoidi, v rastlinah ter zato prisotne v živilih rastlinskega izvora, v sadju, zelenjavji, žitaricah, čaju, vinu, začimbah in tudi v zdravilnih rastlinah.

Vplivajo na barvo, senzorično kakovost in prehranske ter antioksidativne lastnosti živil (Bravo, 1998; Robbins, 2003).

2.1.2.1 Fenolne kisline v medu

Med vsebuje predvsem benzojske in cimetne kisline in njihove estre. Rezultati različnih študij kažejo, da imajo različne vrste medu podoben profil fenolnih kislin, vendar so posamezne fenolne kisline prisotne v različnih koncentracijah (Anklam, 1998).

V evropskih vrstnih medovih prevladujejo hidroksicimetne kisline, zlasti kavna, *p*-kumarna in ferulna (Tomás-Barberán in sod., 2001). Dimitrova in sod. (2007) so v različnih vrstah evropskega medu določili 18 fenolnih kislin. Njihova zastopanost in vsebnost v medu sta močno variirali glede na botanično poreklo medu. Aljadi in Yusoff (2003) sta v malezijskem medu identificirala in kvantitativno ovrednotila naslednje fenolne kisline: galno, kavno, ferulno, benzojsko in cimetno kislino.

Prav tako kot flavonoidi, tudi nekatere fenolne kisline lahko služijo kot markerji za določitev botaničnega porekla medu, npr. elaginska kislina za resin med.

2.1.3 Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin (flavonoidov in fenolnih kislin)

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin določa njihova kemijska struktura.

Flavonoidi so antioksidanti, ki lahko preprečijo peroksidacijo lipidov na različne načine (Rice-Evans in sod., 1996; Abram, 2000; Halliwell, 2000; Heim in sod., 2002):

- lovljenje radikalov (O_2^{\cdot} , HO^{\cdot} , HOO^{\cdot}),
- vezava (keliranje) kovinskih ionov,
- aktivacija antioksidativnih encimov,
- inhibicija oksidaz,
- odstranjevanje in/ali popravilo zaradi oksidacije poškodovanih molekul.

Za flavonoide je značilna predvsem zmožnost lovljenja radikalov. Za preprečevanje lipidne peroksidacije je pomembno sledeče (Rice-Evans in sod., 1996; Bravo, 1998; Abram, 2000; Madsen in sod., 2000):

- stopnja hidroksilacije in razporeditev -OH skupin na B obroču (*o*-položaj dveh -OH skupin),
- dvojna vez med C-2 in C-3 ter keto skupina na mestu C-4 na C obroču,
- razporeditev -OH skupin na A obroču (-OH na mestih C-5 in C-7).

Da je nek flavonoid dober antioksidant, je potrebna -OH skupina na mestu C-3, dvojna vez med C-2 in C-3, keto skupina na C-4 ter *o*-položaj dveh -OH skupin na B obroču. Če pa je odsotna -OH skupina na mestu C-3 in ni tudi dveh -OH skupin v *o*-položaju na B obroču, se antioksidativna učinkovitost zmanjša. Izgleda, da je pri teh spojinah pomembna prisotnost -OH skupine na mestu C-3.

Pomen prostih -OH skupin na mestih C-5 in C-7 se kaže ob primerjavi antioksidativne učinkovitosti glikozidov in aglikonov. Glikoziliranje flavonoidov očitno zmanjša njihovo antioksidativno sposobnost glede na odgovarjajoči aglikon. Glikozilirana -OH skupina na mestu C-7 zmanjša antioksidativno učinkovitost, saj znaša prispevek proste -OH skupine na mestu C-5 v obroču A le 55-70 % prvtne vrednosti.

Antioksidativna učinkovitost antocianidinov je odvisna od *o*-dihidroksi razporeditve -OH skupin na obroču B. Če -OH skupine na mestu C-3' ni, se antioksidativna sposobnost zniža, enako velja, če je ta skupina metilirana (Rice-Evans in sod., 1996; Abram, 2000; Burda in Oleszek, 2001; Balasundram in sod., 2006).

Pri flavonoidih z nasičenim C obročem (npr. flavanoli – katehini in sorodne spojine) je za antioksidativno učinkovitost pomembno število vseh -OH skupin v molekuli; več -OH skupin pomeni večjo antioksidativno učinkovitost (Abram, 2000).

V primeru fenolnih kislin je antioksidativna učinkovitost odvisna od števila in mesta hidroksilne skupine glede na karboksilno funkcionalno skupino. Antioksidativna učinkovitost fenolnih kislin narašča z naraščajočo stopnjo hidroksilacije, npr. galna kislina s tremi -OH skupinami je zelo učinkovit antioksidant. Če so -OH skupine na obroču nadomeščene z metoksi skupino (-OCH₃), primer je siringinska kislina, se aktivnost zmanjša (Rice-Evans in sod., 1996). Hidroksicimetne kisline v primerjavi s hidroksibenzojskimi kislinami kažejo večjo antioksidativno učinkovitost, kar je lahko posledica -CH=CH-COOH skupine, ki zagotavlja večjo sposobnost oddajanja H-atoma in posledično stabilizacijo radikalov, kot -COOH skupina pri hidroksibenzojskih kislinah (Rice-Evans in sod., 1996).

Zaradi antioksidativnega delovanja (predvsem lovljenja radikalov) se fenolnim spojinam pripisuje širok spekter fizioloških lastnosti, kot so antialergeno, antiaterogeno, antiinflamatorno, antimikrobo in antimutageno delovanje (Cushnie in Lamb, 2005; Balasundram in sod., 2006). Kaže se njihov vpliv na preprečevanje nastanka rakavih obolenj, raznih vnetij, bolezni srca in ožilja, artritisa, flavonoidi pa naj bi tudi preventivno delovali pred procesi staranja (Petersen in Dwyer, 1998; Bravo, 1998; Merken in Beecher, 2000a; Heim in sod., 2002; The National Honey Board, 2003; Tripoli in sod., 2007).

2.1.4 Metode za določanje antioksidativne učinkovitosti (AU)

Za *in vitro* določanje antioksidativne učinkovitosti (AU) naravnih substanc lahko uporabljamo različne metode, ki temeljijo na različnih principih: od relativno enostavnih spektroskopskih metod, s katerimi določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov v sistemih s kovinskimi ioni ali sintetičnimi radikali, do metod, s katerimi določamo vpliv antioksidantov na stabilnost realnih vzorcev, kot so proteini ali lipidi (Miquel Becker in sod., 2004; Roginsky in Lissi, 2004). Kompleksna sestava snovi in zapletenost oksidacijskih procesov, ki potekajo v različnih sistemih, zahtevajo uporabo različnih metod, ker na podlagi ene same metode dobljenih rezultatov ne moremo natančno interpretirati in jih dokončno potrditi. Mehanizem antioksidativne aktivnosti v enem sistemu lahko, ali pa tudi ne, predvidi aktivnost v drugem sistemu, zato večjo zanesljivost dosežemo z uporabo različnih analitičnih metod (Fukumoto in Mazza, 2000; Gheldof in Engeseth, 2002; Vela in sod., 2007).

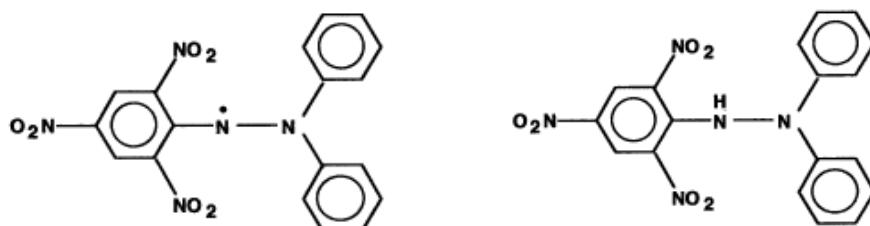
Za določanje AU uporabljamo direktne metode (metode na osnovi kinetike peroksidacije lipidov, ORAC metodo, določanje AU z β -karotenom) in indirektne metode (DPPH, ABTS, FRAP). Tako indirektne kot direktne metode imajo svoje prednosti in slabosti, so

pa indirektne metode v praksi bolj pogosto uporabljene, ker so preprostejše in bolj primerne za rutinsko analizo. Direktne metode pa so bolj občutljive in natančne. Z direktnimi metodami raziskujemo učinke antioksidantov prisotnih v analiziranih živilih na oksidativno razgradnjo substratov (lipidov, proteinov, krvne plazme, bioloških membran, liposomov, DNA). Indirektne metode uporabljamo za proučevanje učinkov prisotnosti kovinskih ionov ter sposobnost antioksidantov za lovljenje radikalov, ki pa niso vedno v povezavi z oksidativno razgradnjo. Primer indirektnega določanja je uporaba obarvanih radikalov, kot sta npr. DPPH[•] in ABTS⁺, kjer ne določamo antioksidativne učinkovitosti direktno, marveč določimo sposobnost antioksidanta, da odda vodikov atom, čeprav sta ti dve lastnosti včasih neposredno povezani. Podatki, pridobljeni s pomočjo direktnih in indirektnih metod, so bolj zanesljivi, če jih med seboj primerjamo (Roginsky in Lissi, 2004).

2.1.4.1 DPPH metoda

Metoda z radikalom DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) spada med najstarejše indirektne metode za določanje antioksidativne učinkovitosti. Razvil jo je Blois leta 1958 in o njej poročal v reviji Nature (Molyneux, 2004). Metoda temelji na reakciji med stabilnim radikalom DPPH[•] in donorji vodika, kamor sodijo tudi fenolne spojine.

DPPH[•] je stabilen radikal, ker ima sposobnost delokalizacije prostega elektrona okoli celotne molekule. S tem je onemogočen nastanek dimer ali dimerizacije, kar pa ne velja za večino radikalov. Delokalizacija elektronov je odgovorna tudi za nastanek intenzivne vijolične barve v etanolu oziroma metanolu. Ko alkoholna raztopina DPPH[•] reagira z antioksidantom se tvori reducirana oblika DPPH₂ (slika 9), kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno (Molyneux, 2004).



Slika 9: Strukturna formula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila – radikal DPPH[•] in reducirana oblika DPPH₂ (Molyneux, 2004)

Figure 9: Structure of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl – radical DPPH[•] and the reduced non-radical DPPH₂ (Molyneux, 2004)

Če molekula DPPH[•] reagira samo z eno molekulo antioksidanta, potem je stehiometrično razmerje reakcije 1:1. V naslednji enačbi je prikazan primer reakcije radikala DPPH[•] z antioksidantom, ki je donor vodika (Brand-Williams in sod., 1995):



DPPH[•] ima velik molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom od 515 do 520 nm, kar pomeni, da lahko koncentracijo radikala DPPH[•] določamo spektrofotometrično (Roginsky in Lissi, 2004).

Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 µM, da so vrednosti absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Valovna dolžina, pri kateri merimo absorbanco, je običajno med 515 in 520 nm. Reakcijski čas metode je različen, običajno 30 min, vendar so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši oziroma daljši čas (Molyneux, 2004).

Rezultate pri DPPH metodi lahko podajamo na različne načine. Sposobnost lovljenja radikalov lahko izrazimo kot delež inhibicije (%):

$$Inhibicija (\%) = [(A_0 - A_t)/A_0] \cdot 100 \quad \dots (2)$$

A_0 je absorbanca slepega vzorca ob času 0, medtem, ko je A_t absorbanca testirane raztopine pri določenem času.

Eden izmed načinov podajanja rezultatov DPPH metode pa je tudi tako imenovana koncentracija učinkovitosti, pogosto imenovana IC₅₀, ki je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za 50 % redukcijo absorbance radikala DPPH[•] oz. podaja koncentracijo substrata, ki vodi do 50 % zmanjšanja absorbance DPPH[•] in se kaže kot izguba intenzivnosti vijolične barve. Čeprav se ta način podajanja rezultatov pogostokrat pojavlja v literaturi, ima določene pomanjkljivosti. Morda je največja ta, da avtorji pogosto ne podajo koncentracije radikala DPPH[•] v testirani raztopini, kar onemogoča primerjavo antioksidativne učinkovitosti z rezultati drugih avtorjev. Pomanjkljivost pa je tudi ta, da se z večanjem AU zmanjšuje vrednost IC₅₀, kar je nerodno pri grafični predstavitvi rezultatov. Temu se običajno izognemo s podajanjem rezultatov v obliki 1/IC₅₀ (Molyneux, 2004).

2.1.4.2 ABTS metoda

Ta metoda je primerna za določanje antioksidativne učinkovitosti lipofilnih in hidrofilnih antioksidantov, hidroksicimetnih kislin, karotenoidov in antioksidantov v krvni plazmi in je danes med najbolj razširjenimi metodami za indirektno določanje AU. ABTS⁺ radikal (2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)) se tvori pri oksidaciji med ABTS⁺ in kalijevim persulfatom in močno absorbira pri valovni dolžini med 600 in 750 nm, zato ga lahko enostavno spektrofotometrično določimo. V prisotnosti antioksidantov, ki so donorji vodika, se reducira, kar vodi do razbarvanja. Rezultati se izražajo kot antioksidativna učinkovitost v ekvivalentih Troloxa, sintetičnega analoga vitamina E (Re in sod., 1999; Roginsky in Lissi, 2004).

Stabilnost ABTS⁺ in možnost njegove uporabe v vodnih in etanolnih raztopinah ter širokem območju vrednosti pH omogočajo uporabo ABTS⁺ metode za določanje AU tako v čistih komponentah kot v kompleksnih matriksih (Labrinea in Georgiou, 2005). Prednost metode ABTS⁺ v primerjavi z ostalimi testi je predvsem njena preprosta uporaba in možnost za rutinsko uporabo v vsakem laboratoriju. Slabost metode pa je, da dejansko podaja sposobnost spojin za reakcijo z ABTS⁺ in ne AU (Roginsky in Lissi, 2004).

2.1.4.3 FRAP metoda

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda oziroma antioksidativna moč redukcije feri iona je sposobnost fenolnih spojin, da reducirajo Fe³⁺ do Fe²⁺ (fero oblika). Prva sta to preprosto, poceni in hitro metodo opisala Benzie in Strain (1996). Pri nizki vrednosti pH se pri reakciji antioksidanta z reagentom TPTZ (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin)

razvije intenzivno modro obarvan kompleks z Fe^{2+} – fero tripiridiltriazin, ki ima absorpcijski maksimum pri 593 nm.

2.1.4.4 ORAC metoda

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda se zelo pogosto uporablja za določanje AU naravnih fenolnih antioksidantov in različnih živil – sadja, zelenjave, pijač. Pri tej metodi določamo učinkovitost lovljenja kisikovih radikalov. Fluorescentni marker β -fikoeritrin se uporablja kot tarča, na katero delujejo peroksilni radikali, katerih izvor je AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid). Preiskovanemu ozioroma standardnemu vzorcu dodamo β -fikoeritrin. Po dodatku AAPH se fikoeritrin oksidira in zato se zmanjša njegova fluorescensa. Trolox – sintetični analog vitamina E, služi kot standard, zato se ORAC vrednosti izražajo v $\mu\text{mol Trolox/g}$ (Roginsky in Lissi, 2004; Beretta in sod., 2005).

2.1.4.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti z β -karotenom

Metoda temelji na antioksidativnih sposobnostih sestavin vzorcev za zmanjševanje oksidacije β -karotena. Meri manjšanje intenzitete barve β -karotena v emulziji β -karotena in linolne kisline ob prisotnosti antioksidanta. Slabost metode je dolgotrajnost in rezultat izmerjene vrednosti AU je podan samo v odstotkih inhibicije (Roginsky in Lissi, 2004; Chaillou in Nazareno, 2006).

2.1.5 Analize fenolnih spojin

Analitika fenolnih spojin je zelo zahtevna predvsem zaradi njihove raznolikosti. Analizo otežujeta različna kemijska struktura in različna občutljivost fenolnih spojin na pogoje ekstrakcije in hidrolize. Za določitev fenolnih spojin v živilih se uporablajo različne metode. Večina metod je specifična, pogosto tudi prilagojena za ločbo znotraj posameznih skupin fenolnih spojin, zato so v literaturi opisani številni postopki, ki se razlikujejo glede na vrsto vzorca, ki ga analiziramo.

Analitični postopki določanja individualnih fenolnih spojin vključujejo tri osnovne korake: ekstrakcijo iz vzorca, ločevanje in kvantitativno določitev (Gómez-Caravaca in sod., 2006a).

Ekstrakcija ozioroma izolacija fenolnih spojin je odvisna od matriksa vzorca, iz katerega jih moramo izolirati (rastline, živila, tekoči vzorci). Uporabljata se predvsem dva načina, klasična ekstrakcija z metanolom in nekaterimi drugimi topili ter ekstrakcija na trdni fazi (SPE – solid phase extraction). SPE je hitra in občutljiva tehnika za pripravo vzorcev, ki je uspešno nadomestila nekatere dolgotrajne, konvencionalne metode izolacije in ekstrakcije (npr. ekstrakcijo v tekočo fazo (LLE – liquid-liquid extraction)). Pri SPE so stacionarne faze napolnjene v plastične ali steklene kolone (kartuše) in vsebujejo od 100 do 500 mg sorbenta. Za analizo fenolnih spojin običajno uporabljamo reverznofazne (RP) kolone, napolnjene s silikagelom, na katerega je vezana oktaedcilna (C-18) ali oktilna skupina (C-8). Izolacija analita iz matriksa poteka v več fazah. SPE kolono najprej kondicioniramo z izbrano mobilno fazo, nato sledi nanos vzorca in spiranje neželenih sestavin. Potem sorbent posušimo, sledi eluiranje analita iz kolone z ustreznim organskim topilom (Tura in

Robards, 2002; Molnár-Perl in Füzfai, 2005; de Rijke in sod., 2006). SPE je zelo uporabna za ekstrakcijo in čiščenje analitov zaradi svoje visoke selektivnosti, hitrosti ekstrakcije, visokih izkoristkov, možnosti avtomatizacije postopka in bistveno manjše porabe organskih topil v primerjavi z LLE (Xing in sod., 2007).

Za grobo oceno vsebnosti skupnih fenolnih spojin ali posameznih skupin fenolnih spojin se uporablajo spektrofotometrične metode, ki so dokaj preproste in zelo primerne za rutinsko analizo. Temeljijo na reakciji določenih fenolnih spojin z izbranim reagentom. Končni rezultat teh reakcij so obarvani produkti, ki jih lahko spektrofotometrično določimo pri ustreznih valovnih dolžinah. Tako se za določanje skupnih fenolnih spojin najpogosteje uporablja Folin-Ciocalteujeva metoda. Slabost metode je, da FC reagent ni specifičen in reagira z vsemi fenolnimi skupinami v ekstraktu, druga slabost pa je vpliv reducirajočih snovi, npr. askorbinske kisline (Robards, 2003; Naczk in Shahidi, 2004). Če analizirani vzorci vsebujejo poleg fenolnih spojin tudi ogljikove hidrate, karotenoide, aminokisline in vitamin C, lahko s to metodo določimo večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, kot jih vzorci dejansko vsebujejo (Bahorun in sod., 2004).

Prav tako lahko spektrofotometrično določamo vsebnost skupnih flavonoidov kot tudi vsebnost posameznih skupin flavonoidov. Vse te metode pa nam dajo samo neko oceno vsebnosti, nič pa ne povedo o posameznih fenolnih spojinah (Naczk in Shahidi, 2004).

Bolj zanesljive rezultate pri analizi fenolnih spojin v naravnih proizvodih dobimo z uporabo kromatografskih metod, kot so tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), tankoplastna kromatografija, plinska kromatografija ter kapilarna elektroforeza. Te tehnike se lahko uporabljo tako za kvalitativno in kvantitativno analizo kot tudi za izolacijo in čiščenje analitov (Sivam, 2002; Robards, 2003; Naczk in Shahidi, 2004).

Omejena uporaba plinske kromatografije v analitiki fenolnih spojin je posledica premajhne hlapnosti teh spojin in s tem komplikirane priprave vzorca za analizo (potrebna je derivatizacija), zato se je bolj uveljavila metoda HPLC. Prednost HPLC v primerjavi z ostalimi kromatografskimi metodami je večja občutljivost, hitrost in dokaj preprosta uporaba. Pri tekočinski kromatografiji fenolnih spojin se običajno uporabljo reverznofazne C-8 ali C-18 kolone (stacionarna faza je na silikagel vezan n-alkan z 8 ali 18 C-atomi). Tekočinska kromatografija z obrnjeno fazo (RP-HPLC) je tista, kjer je stacionarna faza manj polarna od mobilne faze. Gradientna elucija poteka z dvema mobilnima fazama: polarno topilo, običajno voda z dodatkom kisline (mravljinčna, ocetna, fosforjeva (V) kislina) in manj polarno organsko topilo, acetonitril ali metanol. Običajno poteka ločba pri sobni temperaturi, lahko pa kolono termostatiramo na določeno temperaturo (do 40 °C), da skrajšamo čas analize in dosežemo boljšo ponovljivost retencijskih časov. Polarne komponente eluirajo iz kolone prej kot nepolarne, vrstni red eluiranja fenolnih spojin je običajno naslednji: hidroksibenzojske kisline < hidroksicimetne kisline < glikozidi flavonoidov (flavanoni < flavonoli < flavoni) < prosti aglikoni (flavanoni < flavonoli < flavoni) (Merken in Beecher, 2000a,b; Sivam, 2002; Robards, 2003; de Rijke in sod., 2006; Repollés in sod., 2006).

HPLC se lahko uporablja v povezavi z različnimi detektorji, kot so UV-Vis, detektor z diodno matriko (DAD), fluorescenčni detektor, elektrokemijski detektor in masni spektrometer (MS). V posameznih primerih UV-Vis spektri ne zagotavljajo identifikacije

analitov, zato se je v zadnjem času zelo uveljavila uporaba tekočinske kromatografije v povezavi z masno spektrometrijo (HPLC/MS). HPLC omogoči kromatografsko ločitev analitov pred MS analizo. Masni spektrometer je instrument, kjer v plinski fazi nastanejo iz molekul spojin ioni, ki jih aparat potem loči glede na razmerje masa/naboj (m/z). Masni spekter je graf, ki prikazuje odvisnost posameznih mas od njihove intenzitete in daje podatke o molski masi, strukturi, količini in čistosti vzorca. Razvite so bile različne metode ionizacije, med njimi se zelo pogosto uporablja ionizacija z elektrorazprševanjem (ESI-MS) tako v pozitivnem (ESI-PI), kot v negativnem (ESI-NI) načinu. Poznana je še kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI-MS) in fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (APPI-MS) (Sánchez-Rabaneda in sod., 2003; Naczk in Shahidi, 2004; de Rijke in sod., 2006; Savarese in sod., 2007; Rudan-Tasič in Klofutar, 2007; Xing in sod., 2007). V večini primerov se HPLC/MS uporablja v kombinaciji z UV detektorjem za potrditev identitete fenolnih spojin v vzorcu s pomočjo standardov in referenčnih podatkov. Za identifikacijo neznanih spojin v vzorcu pa se je uveljavila tudi uporaba tandemse masne spektrometrije (MS/MS) (de Rijke in sod., 2006).

V zadnjem času se pri analitiki fenolnih spojin uveljavlja tudi uporaba nuklearne magnetne resonance (NMR) in povezava te tehnike z masno spektrometrijo (sistem HPLC-MS-NMR), ki omogoča popolno analizo fenolnih spojin, vključno z njihovo natančno strukturo, konfiguracijo, številom dvojnih vezi, prostimi in substituiranimi hidroksilnimi skupinami (Robards, 2003; Molnár-Perl in Füzfai, 2005; de Rijke in sod., 2006).

2.1.5.1 Določanje flavonoidov in fenolnih kislin v medu

Začetki določanja antioksidativnih komponent v medu segajo v leto 1990, ko so različni avtorji začeli raziskovati vsebnost posameznih fenolnih spojin (fenolnih kislin in flavonoidov) ter razvili metodo za njihovo določanje (Amiot in sod., 1989; Ferreres in sod., 1991 in 1994a; Tomás-Barberán in sod., 1993a,b).

Pri določanju fenolnih spojin v medu s pomočjo HPLC se uporablajo reverznofazne C-18 kolone, mobilna faza je polarno topilo. V večini objavljenih študij so raziskovalci uporabili gradientno elucijo z dvema mobilnima fazama: vodno raztopino mravljinčne kisline in metanola. Ločba poteka približno eno uro. Za detekcijo se najpogosteje uporablja detektor z diodno matriko, najpogosteje uporabljeni valovni dolžini sta 290 in 340 nm, v manjši meri se uporablja še masni in elektrokemijski detektor. Fenolne spojine v medu se identificirajo s primerjavo retencijskih časov, UV spektrov in kromatogramov (Gómez-Caravaca in sod., 2006a).

Med je zaradi svoje sestave, predvsem velike vsebnosti ogljikovih hidratov, zelo zahtevno živilo za analizo fenolnih spojin. Pred samo analitiko je zato potrebno ogljikove hidrate in ostale moteče komponente (kisline, proteine) odstraniti in vzorce koncentrirati. Postopek ekstrakcije, uporabljen v številnih raziskavah, poteka v več fazah. Vzorci medu se običajno raztopijo v vodi z dodatkom HCl (pH = 2) v razmerju 1:5 in filtrirajo. Kljub temu, da so flavonoidi v medu že v obliki aglikonov, se izvede hidroliza, da se zmanjšajo interference v nadaljnji ločbi in poenostavijo kromatografski podatki (Robards, 2003). Nato se filtrat spusti skozi kolono, napolnjeno z ionskim izmenjevalcem Amberlite XAD-2. Druga

možnost ekstrakcije je, da se filtrat predhodno 10 minut meša z Amberlitom XAD-2 na magnetnem mešalu in se z mešanico napolni kolono. Fenolne spojine ostanejo na nosilcu, ogljikovi hidrati in ostale polarne snovi pa se eluirajo s topilom. Sledi spiranje kolone z vodo z dodatkom HCl (pH = 2) in z destilirano vodo. Celotna fenolna frakcija se nato eluira z metanolom. Sledi odstranjevanje metanola (ekstrakt se koncentrirja do suhega), potem se ostanek raztopi v dvakrat destilirani vodi in večkrat ekstrahira z dietiletem ali etil acetatom. Etrni oziroma etil acetatni ekstrakti, v katerih ostanejo fenolne spojine, se nato združijo, dietileter ali etil acetat pa se odstranita. Suh ostanek (fenolna frakcija) se raztopi v metanolu in filtrira preko 0,45 µm membranskega filtra pred HPLC analizo (Amiot in sod., 1989; Ferreres in sod., 1991 in 1994a; Tomás-Barberán in sod., 1993a,b; Gil in sod., 1995; Soler in sod., 1995; Martos in sod., 1997; Vit in sod., 1997; Weston in sod., 1999; Martos in sod., 2000a,b; Tomás-Barberán in sod., 2001; Gheldorf in sod., 2002; Yao in sod., 2003; Yao in sod., 2004a,b; D'Arcy, 2005; Čeksterytē in sod., 2006; Arráez-Román in sod., 2006; Fiorani in sod., 2006; Kenjerić in sod. 2007; Baltrušaitytē in sod., 2007). Slabost omenjenega postopka ekstrakcije je, da nekatere fenolne kisline zelo verjetno eluirajo skupaj z ogljikovimi hidrati v procesu čiščenja (Weston in sod., 1999). Podobno je D'Arcy (2005) v obsežni študiji fenolnega profila avstralskih medov ugotovil, da se nekatere od fenolnih kislin, galna, klorogenska in elaginska, sploh ne vežejo na izmenjevalec Amberlite XAD-2. Ostale fenolne kisline, analizirane v raziskavi, kavna, *p*-kumarna in ferulna, pa so imele izkoristke od 16 – 62 %, kar kaže na to, da opisan postopek ekstrakcije za te fenolne kisline ni najbolj primeren. Za flavonoide je metoda primerna, saj so bili izkoristki večinoma višji od 80 %.

Slabost postopka ekstrakcije s pomočjo izmenjevalca Amberlita XAD-2 je tudi dolgotrajna priprava vzorcev za analizo fenolnih spojin in velika poraba organskih topil, predvsem metanola, potrebna pa je tudi velika količina medu. Zato se v zadnjem času vse bolj uporablja metoda SPE, kjer so stacionarne faze napolnjene v plastične ali steklene kolone (kartuše) za enkratno uporabo. Tako so Pulcini in sod. (2006) razvili enostavno in hitro SPE metodo za ekstrakcijo flavonoidov in fenolnih kislin v različnih vrstah italijanskega medu (kostanjevem, akacijevem, sončničnem, resinem in evkaliptusovem medu). S pomočjo SDB-L kolon (500 mg/3 ml, Phenomenex) so dobili čiste frakcije flavonoidov in fenolnih kislin, ki so jih nato analizirali s pomočjo LC/ESI/MS/MS metode in dobili ponovljive rezultate in visoke izkoristke.

Michalkiewicz in sod. (2008) so razvili SPE metodo za določanje petih fenolnih kislin (galne, *p*-hidroksibenzojske, vanilinske, kavne in siringinske) ter treh flavonoidov (rutina, kvercetina in kamferola) v medu. Metoda vključuje ekstrakcijo fenolnih snovi iz vodne raztopine medu in njihovo kvalitativno in kvantitativno določitev s HPLC z detektorjem z diodno matriko in s fluorescentnim detektorjem. Obenem so ugotavliali tudi izkoristek ekstrakcije s štirimi različnimi sorbenti, Amberlitom XAD-2, BondElut C18 (500 mg), Oasis HLB (200 mg) in Strata-X (30 mg). Kot najmanj primeren se je izkazal Amberlite XAD-2, kjer so bili izkoristki najslabši, galna kislina se nanj sploh ni vezala, ostale fenolne kisline pa le deloma. Najboljše rezultate so dosegli z uporabo Oasis HLB kolon.

Dimitrova in sod. (2007) so za določanje fenolnih kislin v medu uporabili SPE (BondElut C18 kartuše) in tekočinsko kromatografijo z obrnjeno fazo, z UV detektorjem ter v 49 vzorcih medu različnega botaničnega izvora določili naslednje kisline: benzojsko,

salicilno, 3-hidroksibenzojsko 4-hidroksibenzojsko, protokatehinsko, galno, siringinsko, vanilinsko, cimetno, *o*-kumarno, *m*-kumarno, *p*-kumarno, kavno, ferulno, fenilocetno, β -fenilmlečno in *p*-hidroksifenilmlečno kislino.

Inoue in sod. (2005) so za ekstrakcijo fenolnih snovi iz medu uporabili GL-Pak PLS-2 kolone (270 mg/6 ml, GL Sciences) in fenolno frakcijo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije z elektrokemijskim detektorjem (LC/ED) in LC/ESI/MS metodo.

Kot alternativa HPLC metodi se za določanje fenolnih snovi v medu lahko uporablja tudi kapilarna elektroforeza, objavljenih študij pa je relativno malo. Prednosti so krajši čas analize v primerjavi s HPLC, učinkovita separacija, preprostost in nizki stroški obratovanja. Gómez-Caravaca in sod. (2006b) so določali fenolne snovi v medu s kapilarno elektroforezo z UV-Vis detektorjem in uspešno identificirali le 5 spojin – kamferol, pinocembrin, krizin, ferulno in *p*-kumarno kislino. Ugotovili so, da bi bilo potrebno uporabiti bolj zanesljiv sistem detekcije, kot je npr. masni detektor. Andrade in sod. (1997) pa so s kapilarno consko elektroforezo in detektorjem z diodno matriko uspešno identificirali 26 fenolnih spojin (flavonoidov in fenolnih kislin) v različnih vrstah medu in ovrednotili razlike v fenolnem profilu glede na botanično poreklo medu.

Arráez-Román in sod. (2006) so pri analitiki fenolnih spojin v medu prvi uporabili metodo ki je vključevala SPE in kapilarno consko elektroforezo v povezavi z masno spektrometrijo (CZE-ESI-MS). S pomočjo elekroforetskih rezultatov, molskih mas spojin in strukturnih informacij, so uspešno identificirali različne fenolne spojine v rožmarinovem medu in ugotovili, da je postavljena metoda zaradi hitre in učinkovite separacije dobra alternativa HPLC metodi.

Pojavlja se tudi vprašanje uporabe internega standarda pri določanju fenolnih spojin v medu. Interni standard se uporablja za korekcijo naključnih in sistematskih napak celotne metode, vključno s pripravo vzorca s SPE, kromatografijo in detekcijo. Potreba po internem standardu je odvisna od priprave in stopnje čiščenja vzorcev in kromatografske separacije (Wieling, 2002). Pri doslej objavljenih študijah o določanju fenolnih spojin v medu z uporabo izmenjevalca Amberlita XAD-2 in nadaljnjo HPLC, večina raziskovalcev internega standarda ni vključila v analizo. So pa nekateri raziskovalci interni standard uporabili pri določanju ostankov antibiotikov v medu s SPE in LC/MS metodo (Forti in sod., 2005; Thompson in Noot, 2005; Nozal in sod., 2006).

2.1.6 Povezava med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo

Številne raziskave podajajo statistično značilne pozitivne korelacije med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo v naravnih produktih, kar kaže na to, da so fenolne spojine, predvsem flavonoidi in fenolne kisline, v veliki meri odgovorne za antioksidativni potencial. Različni avtorji so iskali povezave med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, določeno s Folin-Ciocalteujevo metodo, in antioksidativno učinkovitostjo, določeno predvsem z naslednjimi metodami: FRAP, DPPH in ABTS, ter tudi korelacije med uporabljenimi metodami za določanje AU (Bahorun in sod., 2004; Miliauskas in sod., 2004; Mansouri in sod., 2005; Hukkanen in sod., 2006; Stratil in sod., 2006; Othman in sod., 2007; Surveswaran in sod., 2007; Verzelloni in sod., 2007; Wojdyło in sod., 2007).

2.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST MEDU

Rezultati številnih raziskav kažejo, da mnoge rastline sintetizirajo spojine z antioksidativno učinkovitostjo, ki veljajo za naravni vir obrambe človeškega organizma pred delovanjem radikalov. Na nekaterih od teh rastlin čebele nabirajo nektar oziroma mano in s tem prenesejo bioaktivne komponente v med (Baltrušaitytė in sod., 2007). Zato spada med k živilom, ki služijo kot vir naravnih antioksidantov in so lahko učinkoviti pri zmanjševanju tveganja za nastanek rakavih obolenj, bolezni srca in ožilja, artritisa, raznih vnetij ter zavirajo procese staranja (The National Honey Board, 2003). Prav tako lahko med ščiti pred škodljivimi oksidacijskimi procesi v živilih, kot so encimsko porjavenje sadja in zelenjave (Chen in sod., 2000; Vela in sod., 2007) in oksidacija lipidov v mesu (Gheldorf in Engeseth, 2002; McKibben in Engeseth, 2002), ter zavira rast kvarljivcev živil in mikroorganizmov, ki so lahko zdravju škodljivi (Taormina in sod., 2001; Mundo in sod., 2004; Nagai in sod., 2006; Küçük in sod., 2007). Komponente v medu, ki so odgovorne za njegov antioksidativni učinek, so lahko fenolnega ali nefenolnega izvora in so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Vrste fenolnih in nefenolnih spojin medu z antioksidativnim delovanjem (Tomás-Barberán in sod., 2001; Gheldorf in sod., 2002; Al-Mamary in sod., 2002)

Table 1: Honey phenolic and non-phenolic compounds with antioxidant activity (Tomás-Barberán et al., 2001; Gheldorf et al., 2002; Al-Mamary et al., 2002)

| Fenolne spojine | | Nefenolne spojine |
|---------------------|-------------|-------------------------------|
| fenolne kislina | flavonoidi | |
| benzojska kislina | pinobanksin | abscizinska kislina |
| cimetna kislina | pinocembrin | proteini |
| kavna kislina | krizin | prolin |
| p-kumarna kislina | galangin | glukonska kislina |
| ferulna kislina | apigenin | askorbinska kislina |
| galna kislina | kvercetin | katalaza |
| elaginska kislina | kamferol | peroksidaza |
| vanilinska kislina | luteolin | vodikov peroksid |
| klorogenska kislina | tektokrizin | hidroksimetilfurfural (HMF) |
| | hesperetin | produkti Maillardove reakcije |
| | pinostrobin | |
| | miricetin | |

Vsebnost teh sestavin v medu je majhna in lahko zelo variira glede na botanično pa tudi geografsko poreklo medu. V manjši meri pa lahko na vsebnost teh sestavin vplivajo tudi postopki pridobivanja medu in pogoji skladisčenja (Frankel in sod., 1998; Gheldorf in Engeseth, 2002; Wang in sod., 2004; Turkmen in sod., 2005).

Za določanje antioksidativne aktivnosti medu ni neke standardizirane metode. Uporablajo se različni testi, ki temeljijo na različnih principih in eksperimentalnih pogojih. Najpogosteje uporabljene metode so DPPH, FRAP, ABTS in ORAC. Problem, ki se pojavlja pa je, da raziskovalci za določitev antioksidativnega potenciala medu lahko uporabijo isto metodo, vendar z različnimi modifikacijami, zato so rezultati različnih študij težko primerljivi. Beretta in sod. (2005) so ugotovili, da ni nekega sistematičnega pristopa za vrednotenje antioksidativne učinkovitosti medu, kjer bi upoštevali različne spojine z

antioksidativnim potencialom ter ustrezne korelacije, kar bi potrdilo mnenje o medu kot viru antioksidantov. Zato so s svojo raziskavo žeeli postaviti zanesljive in enostavne smernice za standardizacijo antioksidativnih lastnosti medu različnega geografskega in botaničnega porekla s kombinacijo različnih metod. Določali so intenzivnost barve medu, vsebnost skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo, skupno antioksidativno učinkovitost s FRAP metodo, sposobnost lovljenja radikalov z DPPH metodo ter merili učinkovitost lovljenja kisikovih radikalov z ORAC metodo. Ugotovili so, da se različne vrste medu med seboj značilno razlikujejo v vrednostih posameznih parametrov, korelacije med analiziranimi parametri pa so bile visoko statistično značilne. Medovi istih vrst iz različnih geografskih področij imajo podoben antioksidativni potencial, kar kaže na to, da ima botanično poreklo glavni vpliv na antioksidativno učinkovitost medu, medtem ko geografsko poreklo, način pridobivanja medu in njegovo skladiščenje vplivajo v manjši meri.

Gheldorf in sod. (2002) so določali antioksidativno aktivnost ameriškega medu različnega botaničnega porekla z ORAC metodo in ugotovili, da je antioksidativni potencial medu rezultat medsebojnega delovanja širokega spektra komponent, vključno fenolnih snovi (fenolnih kislin in flavonoidov), peptidov, organskih kislin, encimov, produktov Maillardove reakcije in ostalih minornih komponent. Medovi različnih vrst se med seboj značilno razlikujejo v antioksidativni učinkovitosti. Ugotovili so, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena z modificirano Folin-Ciocalteujevo metodo, očitno večja kot skupna vsebnost posameznih fenolnih spojin, določenih s HPLC. Fenolne spojine značilno prispevajo k antioksidativni aktivnosti medu, vendar zanjo niso izključno odgovorne, saj je njihova vsebnost v medu premajhna. Zato so določili tudi vsebnost nekaterih nefenolnih spojin, ki prispevajo k celotni antioksidativni kapaciteti medu: proteinov, glukonske in askorbinske kisline, hidroksimetilfurfurala (HMF) in vodikovega peroksida.

Frankel in sod. (1998) so določali antioksidativno aktivnost različnih vrst ameriškega medu s pomočjo spektrofotometrije, brez določanja individualnih komponent odgovornih za aktivnost. Rezultati študije kažejo, da antioksidativna učinkovitost variira glede na vrsto medu ter je v pozitivni korelacijski z vsebnostjo vode in barvo medu.

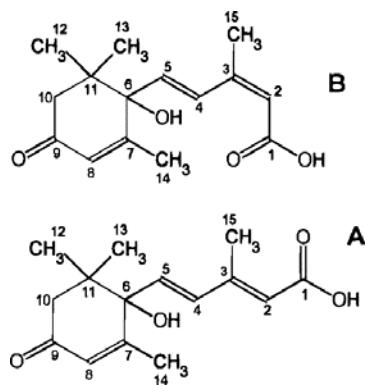
Aljadi in Kamaruddin (2004) sta analizirala dve vrsti malezijskega cvetličnega medu. Za določanje antioksidativne učinkovitosti medu sta uporabila FRAP in DPPH metodo in ugotovila, da ima malezijski med antioksidativne lastnosti, h katerim značilno prispevajo fenolne spojine.

Buratti in sod. (2007) so razvili hitro in enostavno elektrokemijsko metodo za spremljanje antioksidativne učinkovitosti medu, matičnega mlečka in propolisa. Uporabljena metoda – pretočna injekcijska analiza z amperometrično detekcijo, temelji na sposobnosti redukcije antioksidativnih komponent in ne zahteva uporabe radikalov ali oksidantov.

V vsakdanji prehrani lahko med, kot naravno živilo, služi kot dodaten vir antioksidantov, čeprav ne more nadomestiti sadja in zelenjave, ki jih zaužijemo znatno več. Po strokovnih ugotovitvah je zaradi bogate hrnilne sestave dobro nadomestilo za namizni sladkor (saharozo) in ima še dodatni dietni učinek, ker zmanjšuje nivo lipidov v krvi (Schramm in sod., 2003).

K antioksidativni učinkovitosti medu lahko prispevajo tudi produkti Maillardove reakcije, pri kateri reducirajoči ogljikovi hidrati reagirajo s prostimi aminokislinami in nastanejo rjavi pigmenti. Turkmen in sod. (2005) so vzorce medu segrevali pri različnih temperaturah in ugotovili, da se AU bolj poveča pri tistih vzorcih medu, pri katerih je bila uporabljeni višja temperatura segrevanja. Med toplotno obdelavo medu pa lahko pride do izgube naravno prisotnih antioksidantov (flavonoidov in fenolnih kislin), kar lahko z nastankom produktov Maillardove reakcije kompenziramo (Turkmen in sod., 2005).

Veliko raziskovalcev pri analizi fenolnih spojin v medu s pomočjo HPLC, določa tudi vsebnost abscizinske kisline (ABA). ABA (slika 10) je neflavonoidna spojina – izoprenoid seskviterpen, spada med rastlinske hormone in kot rastni inhibitor služi za zaščito rastline v času suše in negativnih vplivov okolja. Prisotna je v cvetličnem nektarju in mani ter posledično v različnih količinah tudi v samem medu. Nekateri raziskovalci (Ferreres in sod., 1996; Tomás-Barberán in sod., 2001) navajajo, da lahko ABA, tako kot posamezni flavonoidi, služi kot marker za botanično poreklo medu.



Slika 10: Abscizinska kislina, A: *trans-trans*, B: *cis-trans* izomera (Ferreres in sod., 1996)

Figure 10: Abscisic acid, A: *trans-trans* isomer, B: *cis-trans* isomer (Ferreres et al., 1996)

Abscizinsko kislino so določili v resinem, citrusovem, lipovem in akacijevem medu ter medu oljne repice (Tomás-Barberán in sod., 2001). Ferreres in sod. (1996) so ugotovili, da vsebuje ekstrakt resinega medu, pridobljen z ekstrakcijo z ionskim izmenjevalcem Amberlitom, znatno več abscizinske kisline kot flavonoidov in fenolnih kislin.

2.2.1 Vpliv skladiščenja na antioksidativno učinkovitost medu

V literaturi obstaja zelo malo raziskav o vplivu skladiščenja na AU medu. Wang in sod. (2004) poročajo o zmanjšanju antioksidativne učinkovitosti, določene z ORAC metodo, preiskovanih vzorcev medu, skladiščenih 6 mesecev. V tem času so opazili, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin ni bistveno zmanjšala. Poleg tega so ugotovili, da vrsta embalaže in temperatura skladiščenja nimata bistvenega vpliva na AU in vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu. Nagai in sod. (2001) pa so prav tako ugotovili, da se AU različnih vrst medu s časom postopoma zmanjšuje.

2.3 BARVA MEDU

Barva medu je, poleg okusa in arome, ena izmed karakteristik, ki služijo za prepoznavanje rastline, iz katere med izvira. Barva je zelo raznolika in variira, glede na botanično poreklo, od skoraj brezbarvne in bledo rumene preko jantarne in rdeče barve do temno rjave oz. skoraj črne barve (Mateo Castro in sod., 1992; Terrab in sod., 2004). Odvisna je od vsebnosti elementov, cvetnega prahu, vrednosti pH in prisotnih pigmentov, ki dajejo medu značilno barvo in vplivajo na njeno intenzivnost (Lazaridou in sod., 2004; González-Miret in sod., 2005; Baltrušaiytė in sod., 2007).

Barva je odvisna tudi od nečistoč, ki so prisotne v nektarju, ter od stopnje kristalizacije. Nastanek in rast kristalov v medu je naraven pojav, odvisen od razmerja fruktoze in glukoze v medu. Običajno se zgodi v večini medov in ne povzroča nobenih kemijskih sprememb. Zaradi nastalih kristalov pride le do spremembe barve, kristaliziran med je nekoliko svetlejši. Tak med je pogosto podvržen toplotni obdelavi, da se ponovno utekočini. Segrevanje medu navadno poteka nekaj dni pri temperaturi 45 – 50 °C ali v vroči vodni kopeli. Ena izmed posledic segrevanja je pojav neencimskega porjavenja, tako imenovana Maillardova reakcija, pri kateri nastanejo rjavo obarvani produkti (Turkmen in sod., 2005).

Nekateri avtorji so iskali povezave med barvo medu in botaničnim poreklom, industrijsko predelavo, temperaturo in časom skladiščenja. Znano je, da med pri skladisčenju med postaja temnejši. Sprememba barve medu med skladisčenjem se lahko pojavi zaradi produktov Maillardove reakcije in reakcij fenolnih spojin. Med drugim tudi sama sestava medu (vsebnost glukoze, fruktoze, prostih aminokislin in vode) in njegova začetna barva vplivajo na stopnjo potemnitve, ki je odvisna tudi od temperature in/ali časa skladisčenja. Potemnitev medu se linearno veča s časom skladisčenja (Pereyra Gonzales in sod., 1999). Na barvo medu vplivajo tudi naravno prisotna pelodna zrna, predvsem njihova barva in morfologija. Ugotovljeno je bilo, da rumena pelodna zrna dajejo svetlejšo barvo medu, medtem ko rjava barva pelodnih zrn prispeva k temnejši barvi medu (Terrab in sod., 2004).

Barva medu je tudi eden izmed faktorjev, ki lahko vpliva na njegovo tržno ceno in sprejemljivost za potrošnika. Svetlejši med ima ponavadi nežnejšo aroma ter posledično večjo tržno vrednost kot temnejši med. Kot je bilo že omenjeno, se med samim transportom in/ali med skladisčenjem barva medu spreminja. Posledično lahko nastopijo različne senzorične spremembe, ki vplivajo na samo kakovost medu (Pereyra Gonzales in sod., 1999).

Barva medu lahko, poleg ostalih fizikalno-kemijskih parametrov, kot so električna prevodnost, vsebnost vode, vsebnost posameznih ogljikovih hidratov, vrednost pH in vsebnost pepela, služi kot orodje za klasifikacijo medu glede na botanično poreklo. Mateo in Bosch-Reig (1998) sta analizirala 93 vzorcev sedmih vrst španskega medu ter z uporabo rezultatov električne prevodnosti, barve, vsebnosti vode, fruktoze in glukoze v medu, s pomočjo diskriminantne analize, pravilno razvrstila 95,7 % vzorcev medu glede na botanično poreklo.

V Sloveniji imamo, zaradi raznolikosti pokrajin s specifičnimi klimatskimi razmerami in raznovrstnimi medonosnimi rastlinami, veliko različnih vrst medu, katerih barva lahko zelo variira. Barvne karakteristike posameznih vrst slovenskega medu so podane v preglednici 2.

Preglednica 2: Značilnosti barve različnih vrst slovenskega medu (Golob in sod., 2002; Bertoncej in sod., 2007)

Table 2: Colour characteristics of different types of Slovenian honey (Golob et al., 2002; Bertoncej et al., 2007)

| Vrsta medu | Barva |
|------------|---|
| akacijev | skoraj brezbarvna do slavnato rumena |
| lipov | svetlo rumena do svetlo jantarna, slavnata, z zelenim odtenkom |
| cvetlični | zelo raznolika; od rumene do rjave, odvisna od vrste rastlin in deleža medu iz mane |
| kostanjev | rjava, jantarna, bolj ali manj temna z rdečkastim odtenkom |
| hojev | sivo-rjava, z zelenim odtenkom |
| smrekov | srednje do temno jantarna z rdečim odtenkom, sijoča površina |
| gozdni | svetlo do temno rjava, lahko z rdečkastim ali zelenim odtenkom |

Različni avtorji uporabljajo različne pristope za vrednotenje barve medu in zato lahko metode za merjenje barve razdelimo v subjektivne oziroma senzorične in objektivne oziroma instrumentalne (Terrab in sod., 2004). Instrumentalne metode, ki se najpogosteje uporabljajo za vrednotenje barve medu, so merjenje barve v CIE L* a* b* sistemu, merjenje absorbance raztopine medu in določanje barve po Pfundu (Terrab in sod., 2002; Bogdanov in sod., 2004).

2.4 POVEZAVA MED VSEBNOSTJO FENOLNIH SPOJIN V MEDU, NJEGOVO ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO IN BARVO

Številni raziskovalci so proučevali povezavo med vsebnostjo fenolnih spojin v medu, njegovo antioksidativno učinkovitostjo in barvo. Njihove ugotovitve so si zelo podobne. Beretta in sod. (2005) so dokazali tesno medsebojno odvisnost med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AU, določeno s tremi metodami (FRAP, DPPH in ORAC). Vrednosti koreacijskih koeficientov so se gibale od 0,885 do 0,918, kar nakazuje, da ima med antioksidativen potencial predvsem zaradi prisotnih fenolnih spojin. Prav tako so ugotovili, da je tudi barva medu v tesni zvezi z analiziranimi parametri.

Raziskava španskega medu (Pérez in sod., 2007), kjer so poleg ostalih fizikalno-kemijskih parametrov, določali tudi vsebnost skupnih fenolnih spojin, sposobnost lovljenja radikalov z DPPH metodo in barvo medu (neto absorbanca), je pokazala, da so korelacije med analiziranimi parametri statistično značilne.

Meda in sod. (2005) so, poleg vsebnosti skupnih fenolnih spojin in AU medu s poreklom iz Burkine Faso, določali tudi vsebnost skupnih flavonoidov. Medtem ko je obstajala zmerna korelacija ($R = 0,5$) med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AU medu, določeno z DPPH metodo, je zanimiv podatek, da niso dokazali korelacije med AU medu in vsebnostjo skupnih flavonoidov ($R = -0,11$). Vzrok je verjetno v tem, da je bila vsebnost flavonoidov določena spektrofotometrično samo z reakcijo z AlCl_3 , ki je specifičen reagent za flavone in flavonole. Chang in sod. (2002) pa so v svoji raziskavi, kjer so določali vsebnost flavonoidov v propolisu, ugotovili, da pravo vsebnost skupnih flavonoidov dobimo s pomočjo dveh neodvisnih reakcij (končni rezultat je šeštevek obeh vrednosti), poleg reakcije z AlCl_3 , še z reakcijo z 2,4-dinitrofenilhidrazinom, ki je specifična za flavanone (pinocembrin, pinobanksin), ki jih med tudi vsebuje. To bi lahko pojasnilo koreacijski koeficient z vrednostjo $-0,11$, ki so ga za zvezo med AU medu in vsebnostjo skupnih flavonoidov določili Meda in sod. (2005).

Tudi raziskava slovenskega medu (Bertoncej in sod., 2007) je pokazala, da imajo svetlejši medovi (akacijev, lipov in cvetlični) manjšo vsebnost skupnih fenolnih spojin in nižjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi s temnejšimi medovi (kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med).

Blasa in sod. (2006) so v svoji študiji ovrednotili vsebnost skupnih fenolnih spojin in skupnih flavonoidov ter antioksidativno učinkovitost, določeno s FRAP metodo, dveh najbolj pogostih vrst italijanskega medu, akacijevega in cvetličnega. Cvetlični med je bogatejši s fenolnimi spojinami in kaže večji antioksidativni potencial v primerjavi z akacijevim medom, korelacije med obravnavanimi parametri pa so bile visoko statistično značilne. Vzporedna primerjava med svežim in termično obdelanim medom je pokazala, da ima slednji manjšo vsebnost fenolnih snovi in nižjo antioksidativno učinkovitost.

Zalibera in sod. (2008) so določali vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativno učinkovitost in barvo nekaterih vrst slovaškega medu. Sposobnost lovljenja radikalov DPPH[•] in ABTS^{•+} niso določali spektrofotometrično, temveč z elektronsko paramagnetno resonanco. Ugotovili so, da barva medu značilno vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin in sposobnost lovljenja radikalov.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Analizirali smo 205 vzorcev medu različnega botaničnega porekla in različnih letnikov. V analizo smo vključili tipične vzorce sedmih, najpogosteje zastopanih vrst slovenskega medu. Vrsto medu, deklarirano s strani čebelarjev, smo preverili s senzorično analizo. Podatki o analiziranih vzorcih, to je vrsta medu, njegov izvor, letnik pridelave, število vzorcev po letnikih, oznaka vzorcev ter skupno število vzorcev posamezne vrste, so zbrani v preglednici 3.

Preglednica 3: Analizirani vzorci medu

Table 3: Analysed honey samples

| Vrsta medu | Izvor medu | Letnik | Število vzorcev | Oznaka vzorcev | Skupno št. vzorcev |
|---|----------------|--------|-----------------|-------------------------|--------------------|
| akacijev (A) (<i>Robinia pseudoacacia</i>) | nekter | 2004 | 15 | A1-A15 | 30 |
| | | 2005 | 15 | A16-A27, A29, A30, A32 | |
| lipov (L) (<i>Tilia spp.</i>) | nekter in mana | 2004 | 15 | L1-L15 | 28 |
| | | 2006 | 13 | L16-L24, L26-L29 | |
| cvetlični (C) | nekter | 2004 | 14 | C1, C3-C15 | 29 |
| | | 2005 | 15 | C16-C27, C29-C31 | |
| kostanjev (K) (<i>Castanea sativa</i>) | nekter in mana | 2004 | 11 | K1-K5, K7-K12 | 29 |
| | | 2005 | 5 | K14, K16, K17, K20, K24 | |
| | | 2006 | 13 | K27-K31, K33-K40 | |
| smrekov (S) (<i>Picea abies</i>) | mana | 2004 | 14 | S1-S7, S9-S15 | 29 |
| | | 2005 | 10 | S16, S18-S26 | |
| | | 2006 | 5 | S27-S31 | |
| hojev (H) (<i>Abies alba</i>) | mana | 2004 | 15 | H1-H15 | 30 |
| | | 2006 | 15 | H16-H30 | |
| gozdni (G) | mana | 2004 | 15 | G1-G15 | 30 |
| | | 2005 | 15 | G16-G30 | |

Vzorci so bili hranjeni v zaprtih plastičnih posodah, v temnem prostoru pri sobni temperaturi. V času analiz so bili vzorci stari približno 2 – 10 mesecev.

Za določitev vsebnosti flavonoidov, fenolnih kislin in abscizinske kisline v medu smo, glede na rezultate senzorične analize, izbrali 10 najbolj značilnih vzorcev medu vsake vrste, po 5 vzorcev istega letnika. Analizirani vzorci so bili naslednji:

- akacijev med: A2, A3, A5, A8, A14, A18, A19, A21, A25, A32
- lipov med: L3, L9, L12, L13, L14, L16, L18, L19, L20, L26
- cvetlični med: C1, C4, C6, C12, C13, C20, C21, C22, C24, C29
- kostanjev med: K2, K3, K5, K7, K9, K27, K29, K30, K36, K40
- smrekov med: S18, S20, S22, S25, S26, S27, S28, S29, S30, S31
- hojev med: H1, H4, H10, H12, H13, H19, H23, H24, H25, H27
- gozdni med: G5, G9, G12, G13, G15, G18, G20, G23, G24, G25

3.2 METODE DELA

3.2.1 Določanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov in senzorična analiza medu

3.2.1.1 Določanje vsebnosti vode

Princip:

Določanje vsebnosti vode temelji na osnovi merjenja lomnega količnika s pomočjo ročnega refraktometra.

Aparatura:

- Abbejev refraktometer s prilagojeno skalo za med (ATAGO, HHR-2N, Japonska).

Izvedba:

Tekoče medove smo pred merjenjem dobro premešali. V primeru, da je bil vzorec medu kristaliziran, smo ga v zaprti posodi segrevali pri 50 °C, dokler se ni raztopil in potem ohladili. Pred nanašanjem vzorca na prizmo refraktometra mora biti le-ta popolnoma čista in suha. S stekleno palčko smo enakomerno nanesli tanko plast medu na prizmo refraktometra in na skali direktno odčitali vsebnost vode v %. Upoštevali smo tudi temperaturno korekcijsko vrednost. Vsako meritev smo opravili dvakrat in rezultat podali kot povprečno vrednost dveh določitev.

3.2.1.2 Določanje električne prevodnosti medu

Princip:

Določanje električne prevodnosti 20 % (w/w) vodne raztopine medu pri 20 °C, s konduktometrom temelji na merjenju električne upornosti, ki je recipročna vrednost električne prevodnosti. Metoda za konduktometrično določanje specifične električne prevodnosti v medu je opisana v Harmoniziranih metodah Mednarodne komisije za med (Bogdanov in sod., 1997). Uporabili smo modifikacijo te metode (Kropf in sod., 2008).

Reagenti:

- destilirana voda,
- 0,1 M raztopina KCl za umerjanje celice konduktometra.

Aparatura:

- konduktometer CyberScan 510 PC (Eutech Instruments, Singapur).

Izvedba:

Odtehta medu je odvisna od količine vode, ki jo med vsebuje. Odtehtali smo količino medu, ekvivalentno 20,0 g brezvodnega medu in ga raztopili v destilirani vodi. Raztopini smo dodali destilirano vodo do 100 g. Dobili smo 20 % raztopino medu (w/w), ki smo ji izmerili prevodnost tako, da smo v raztopino potopili elektrodo konduktometra in odčitali električno prevodnost raztopine v mili Siemensih na centimeter (mS/cm).

3.2.1.3 Določanje kislosti medu s titrimetrično metodo (AOAC 962.19, 1999)

Princip:

Titracija razredčenega vzorca z 0,05 M NaOH do pH 8,5, dodatek 10 mL 0,05 M NaOH in ponovna titracija z 0,05 M HCl do pH 8,3. Pri titraciji z NaOH se sprostijo proste kisline, pri titraciji s HCl pa laktoni. Vsebnost laktonov je presežek kislosti, ko med postane alkalen.

Reagenti:

- 0,05 M NaOH (Merck, Nemčija),
- 0,05 M HCl (Merck, Nemčija).

Aparatura:

- pH meter MA 5736 (Metrel, Slovenija).

Izvedba:

V čašo smo odtehtali 10,0 g vzorca in ga raztopili v 75 mL destilirane vode ter vzorec dobro premešali na električnem mešalu. Po umerjanju pH metra smo potopili elektrode pH metra v raztopino in zabeležili pH vrednost. Titrirali smo z 0,05 M NaOH do pH 8,5. Nato smo dodali 10 mL 0,05 M NaOH in ponovno titrirali do pH 8,3 z 0,05 M HCl.

Slepi vzorec: Titracija 85 mL destilirane vode z 0,05 M NaOH do pH 8,5.

Kislost izrazimo kot miliekvivalent dodanega NaOH/kg vzorca.

$$Vsebnost prostih kislin = (a - b) \cdot c \text{ (NaOH)} \cdot 100 \quad \dots(3)$$

- a volumen 0,05 M NaOH pri 1. titraciji vzorca (mL)
b volumen 0,05 M NaOH pri titraciji slepega vzorca (mL)

$$Vsebnost laktonov = (10 - d) \cdot c \text{ (HCl)} \cdot 100 \quad \dots(4)$$

- d volumen 0,05 M HCl pri 2. titraciji vzorca (mL)

$$Vsebnost skupnih kislin = vsebnost prostih kislin + vsebnost laktonov \quad \dots(5)$$

3.2.1.4 Senzorična analiza medu

Princip:

Pri senzorični analizi ugotavljamo in vrednotimo lastnosti medu s čutili. Ocenjujemo videz, vonj, okus in aroma. S senzorično analizo potrdimo vrsto medu, deklarirano s strani čebelarjev, brez točkovanja.

Izvedba:

Ocenjevalno senzorično komisijo so sestavljali trije preskuševalci, ki so pri ocenjevanju videza, vonja, okusa in arome upoštevali značilne lastnosti za posamezno vrsto medu. Pri ocenjevanju medu je bila preskuševalcem v pomoč predhodno izmerjena vrednost električne prevodnosti. Za med iz nektarja mora biti vrednost le-te $\leq 0,8 \text{ mS/cm}$, za gozdni in kostanjev med pa $> 0,8 \text{ mS/cm}$. Dovoljeno je odstopanje $\pm 10\%$.

3.2.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo

Princip:

Spektrofotometrična metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin s FC reagentom, ki vsebuje volframat in molibdat. Obarvanemu produktu izmerimo absorbanco pri 750 nm. Za umeritveno krivuljo uporabimo raztopino galne kisline, ki se uporablja kot standardna referenčna raztopina za določanje skupnih fenolnih spojin. Rezultate izrazimo v mg galne kisline na kilogram medu (mg_{GA}/kg medu). Analiza poteka v kislem pH območju, s čimer preprečimo vpliv prisotnih ogljikovih hidratov inobarjanje med samim izvajanjem analize (Beretta in sod., 2005).

Reagenti:

- Folin-Ciocalteujev reagent (Merck, Nemčija), razredčen z dest. vodo v razmerju 1:10,
- galna kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- sladkorni analog (40 % fruktoze, 30 % glukoze, 10 % maltoze in 20 % vode),
- destilirana voda.

Aparatura:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 750 nm).

Izvedba:

V stekleno čašo smo odtehtali 5,0 g vzorca medu in ga s pomočjo ultrazvočne kopeli raztopili v približno 20 mL destilirane vode. Nato smo vzorec prelili v 50 ml bučko in jo dopolnili do oznake. Za analizo smo odpipetirali 100 µL vzorca, dodali 1,0 mL FC reagenta ter na stresalniku mešali 2 min. Po 20 min smo na spektrofotometru izmerili absorbanco proti sladkornemu analogu, ki služi kot slepi vzorec. Vsak vzorec medu smo analizirali v treh vzporednih določitvah. Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v medu smo določili s pomočjo umeritvene krivulje (prilogi A1 in A2), ki smo jo pripravili z raztopinami galne kisline v koncentraciji od 8,0 do 120,0 mg/L.

3.2.3 Določanje vsebnosti posameznih fenolnih spojin (fenolnih kislin in flavonoidov) s HPLC/MS

3.2.3.1 Ekstrakcija fenolnih spojin iz medu s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi – SPE

Princip:

Na trdno fazo v koloni Strata X se vežejo fenolne spojine, druge komponente pa ne. Fenolne spojine smo eluirali z mešanico metanol/acetonitril.

Reagenti:

- voda z dodatkom HCl (Merck, Nemčija), pH = 2,
- dvakrat destilirana voda (Milli-Q, Millipore S.A., Francija),
- metanol, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija),
- 10 mM žveplova (VI) kislina, H₂SO₄ (Merck, Nemčija),
- hesperetin (Sigma-Aldrich, Nemčija): interni standard (200 µg/mL v metanolu).

Aparatura:

- naprava za SPE: Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, ZDA),
- ekstrakcijske kolone Strata X, 33 µm (200 mg/6 mL) (Phenomenex, ZDA).

Izvedba:

V čašo smo odtehtali 10,0 g vzorca medu, dodali 100 µL raztopine internega standarda hesperetina in dobro raztopili v 15 mL vode z dodatkom HCl.

Kolono Strata X smo kondicionirali s 3 mL metanola in 3 mL dvakrat destilirane vode s pretokom približno 1 mL/min (eluat zavrzemo). Nato smo na kolono uvajali raztopino medu s pretokom približno 1 mL/min (eluat zavrzemo). Sledilo je izpiranje neželenih komponent, predvsem ogljikovih hidratov, kislin in morebitnih nečistoč, najprej s 5 mL vode z dodatkom HCl in nato še s 15 mL dvakrat destilirane vode. Po izpiranju smo kolono, na kateri so ostale vezane fenolne spojine osušili, tako da smo za 3 minute spustili zrak skozi kolono. Nato smo kolono sprali trikrat s po 1 mL mešanice metanola in acetonitrila v razmerju 2:1 (v/v) in eluate lovili v epruveto. Ekstrakt fenolnih spojin smo nato nakisali z 10 mM H₂SO₄ v razmerju 1:1 (v/v) in filtrirali preko 0,45 µm membranskega PTFE filtra v vialo ter analizirali s HPLC/MS.

3.2.3.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masnim spektrometrom (HPLC/MS)

Princip:

Separacija fenolnih spojin je potekala na reverznofazni koloni z gradientom dveh mobilnih faz. Posamezne flavonoide in fenolne kisline smo identificirali na osnovi retencijskih časov in molskih mas spojin. Kvantitativna določitev je bila možna s pomočjo umeritvene krivulje in internega standarda.

Reagenti:

- acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija),
- 1 % mravljinčna kislina, HCOOH (Merck, Nemčija),
- standardi:
 - galna kislina (G7384), kavna kislina (C0625), klorogenska kislina (C3878), *p*-kumarna kislina (C9008), elaginska kislina (E2250), (A1049), hesperetin (H4125), luteolin (L9283), pinocembrin (P5239), kvercetin (Q0125), miricetin (M6760), galangin (282200) in *cis-trans* abscizinska kislina proizvajalca Sigma-Aldrich (Nemčija)
 - apigenin (10798), krizin (27214) in kamferol (600109) proizvajalca Fluka (Švica).

Aparatura in kromatografski pogoji ločbe:

| | |
|-----------------------------|---|
| HPLC sistem | Agilent 1100 |
| Binarna gradientna črpalka: | Agilent 1100, G1312A |
| Avtomatski podajalnik: | Agilent 1100, G1330B |
| Volumen injiciranja: | 20 µl |
| Predkolona: | Gemini C18 (Phenomenex, ZDA), 4,0 mm x 2,0 mm |
| Kolona: | Luna C18(2) (Phenomenex, ZDA), 3 µm, 150 mm x 2,0 mm |
| Mobilna faza: | mobilna faza A: 1 % HCOOH (Merck, Nemčija) mobilna faza B: acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija) |

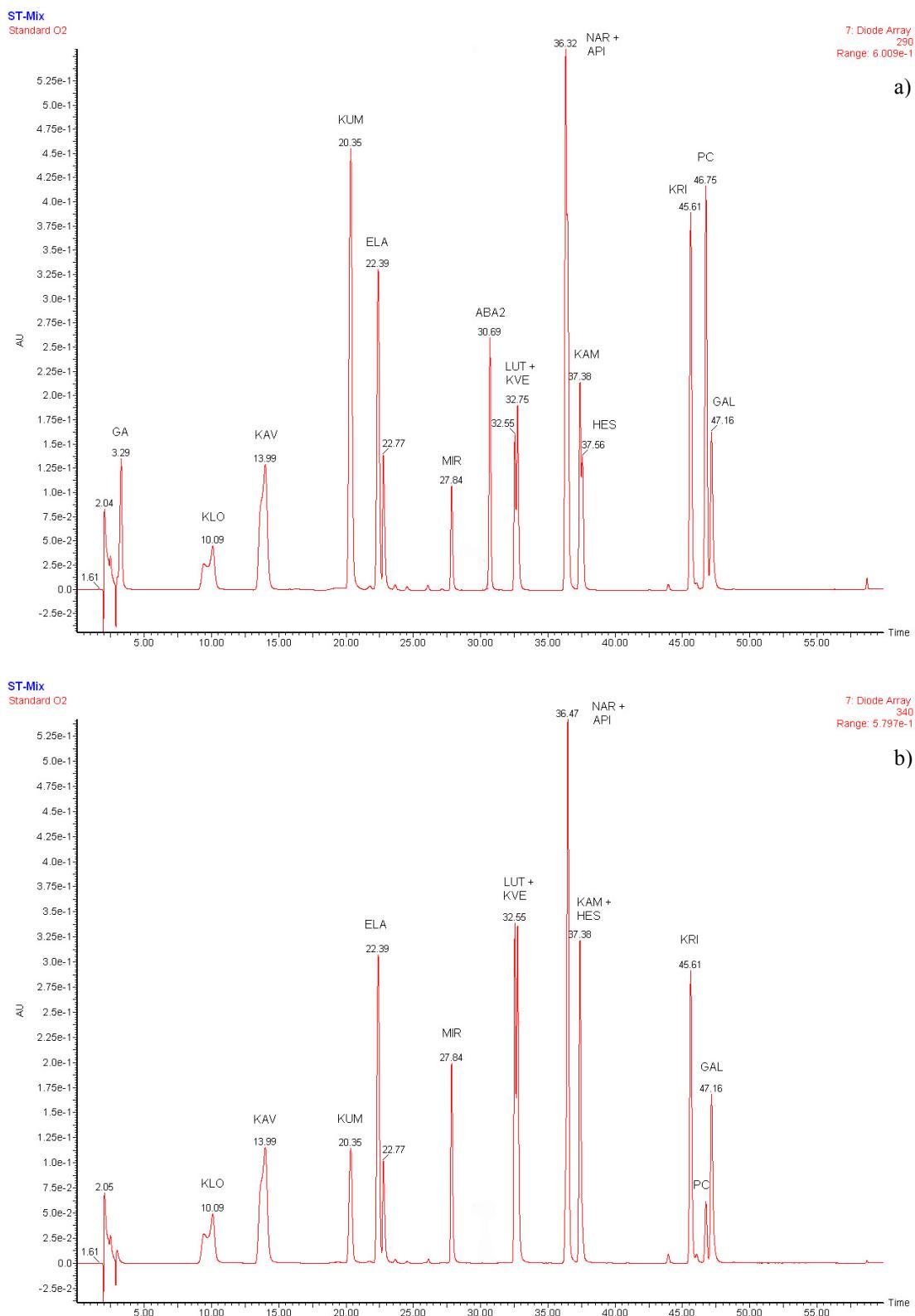
| Pretok: | 0,2 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|---------|---|---|---|------|------|---|------|------|----|------|------|----|------|------|----|------|------|----|------|------|----|------|------|
| Temperatura kolone: | 25 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gradient: | <table><thead><tr><th>t (min)</th><th>A</th><th>B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>90 %</td><td>10 %</td></tr><tr><td>5</td><td>90 %</td><td>10 %</td></tr><tr><td>50</td><td>40 %</td><td>60 %</td></tr><tr><td>52</td><td>20 %</td><td>80 %</td></tr><tr><td>60</td><td>20 %</td><td>80 %</td></tr><tr><td>70</td><td>90 %</td><td>10 %</td></tr><tr><td>80</td><td>90 %</td><td>10 %</td></tr></tbody></table> | t (min) | A | B | 0 | 90 % | 10 % | 5 | 90 % | 10 % | 50 | 40 % | 60 % | 52 | 20 % | 80 % | 60 | 20 % | 80 % | 70 | 90 % | 10 % | 80 | 90 % | 10 % |
| t (min) | A | B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 90 % | 10 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 90 % | 10 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | 40 % | 60 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 52 | 20 % | 80 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | 20 % | 80 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 70 | 90 % | 10 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 80 | 90 % | 10 % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detektor: | DAD (Agilent 1100, G1315B) masni spektrometer (Micromass Quattro micro® API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI–) (negativen način ionizacije) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Program za obdelavo podatkov: | MassLynx™ V4,0 (Micromass, 2004) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pogoji ionizacije (ESI–): | napetost kapilare (kV) 2,5 napetost vhodne leče (V) 25 temperatura izvora (°C) 100 temperatura razpršilnega plina dušika (°C) 350 pretok razpršilnega plina dušika (L/h) 500 pretok plina dušika vhodne leče (L/h) 70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

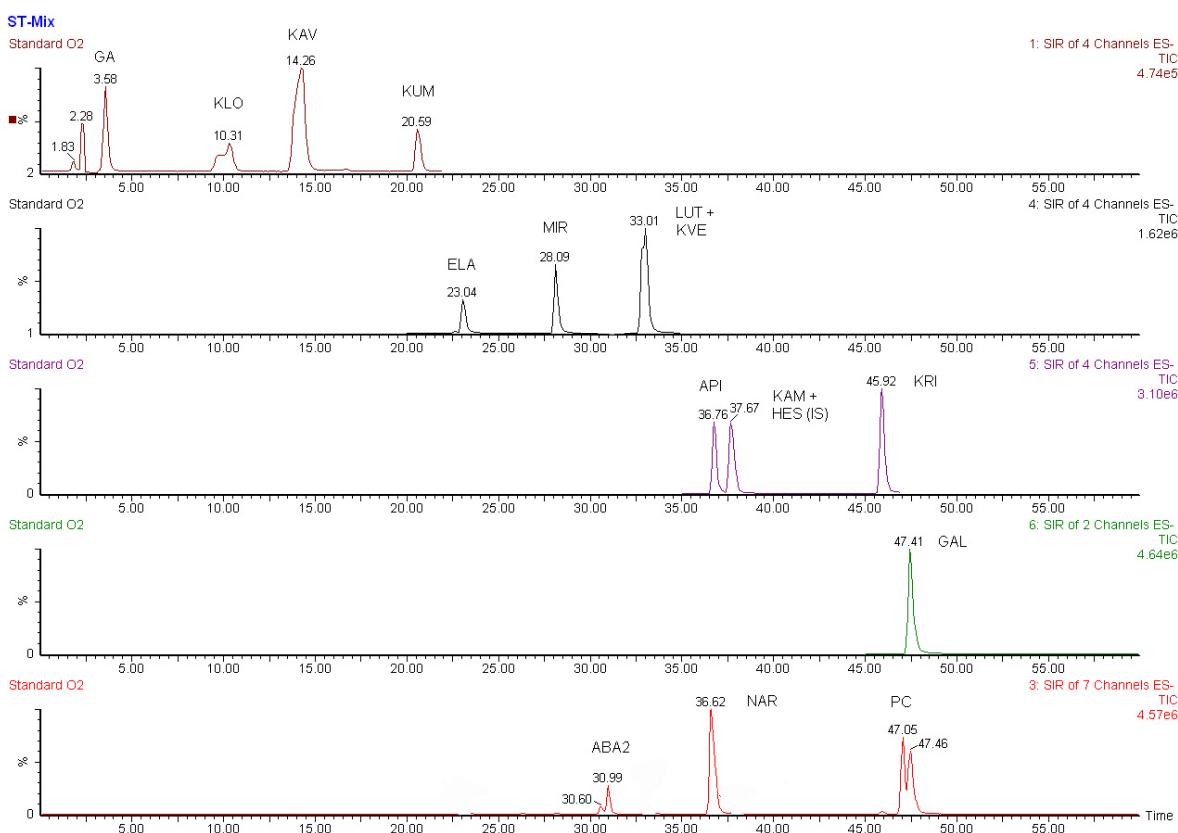
Fenolne kisline in flavonoide smo določili s primerjavo retencijskih časov in molskih mas oz. m/z vrednosti standardov – mase molekulskih negativno nabitih ionov (preglednica 4). HPLC/DAD kromatogram standardne raztopine je na sliki 11.

Preglednica 4: Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti posameznih fenolnih kislin in flavonoidov
Table 4: Retention times, molecular weights and m/z values of phenolic acids and flavonoids

| Spojina | Oznaka | Rt (min) | M (g/mol) | m/z vrednost [M–H]– |
|-------------------------------|--------|----------|-----------|---------------------|
| galna kislina | GA | 3,58 | 170,12 | 168,96 |
| klorogenska kislina | KLO | 10,31 | 354,31 | 353,50 |
| kavna kislina | KAV | 14,26 | 180,16 | 179,01 |
| p-kumarna kislina | KUM | 20,59 | 164,16 | 162,99 |
| elaginska kislina | ELA | 23,04 | 302,19 | 300,91 |
| miricetin | MIR | 28,09 | 318,24 | 317,24 |
| cis-trans abscizinska kislina | ABA2 | 30,99 | 264,30 | 263,30 |
| luteolin | LUT | 33,06 | 286,26 | 285,20 |
| kvercetin | KVE | 33,01 | 302,23 | 301,01 |
| naringenin | NAR | 36,62 | 272,26 | 271,20 |
| apigenin | API | 36,76 | 270,24 | 269,24 |
| kamferol | KAM | 37,67 | 286,24 | 285,20 |
| hesperetin – interni standard | HES | 37,86 | 302,28 | 301,08 |
| krizin | KRI | 45,92 | 254,24 | 253,11 |
| pinocembrin | PC | 47,05 | 256,25 | 255,20 |
| galangin | GAL | 47,41 | 270,24 | 269,24 |

Rt: retencijski čas; M: molska masa





Slika 12: HPLC/ESI(–)/MS kromatogram standardne raztopine. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4

Figure 12: HPLC/ESI(–)/MS chromatogram of a standard mixture. See Table 4 for peak identification

Iz preglednice 4 in iz HPLC/DAD kromatogramov standardne raztopine (slika 11) je razvidno, da se nekatere spojine iz kolone eluirajo skoraj istočasno. To so luteolin in kvercetin, apigenin in naringenin ter hesperetin in kamferol. Zato jih je pri danih pogojih ločbe z DAD detektorjem nemogoče ločiti in kvantitativno ovrednotiti. To lahko vodi tudi k precenitvi vsebnosti določenih spojin in hkrati odsotnosti drugih. Zato smo uporabili HPLC v povezavi z MS detektorjem, kjer spojine s podobnimi retencijskimi časi lahko obravnavamo v ločenih kanalih glede na njihove odgovarjajoče m/z vrednosti (način SIR – Selected Ion Recording) (slika 12 in priloga B1).

MS detektor je v primerjavi z DAD detektorjem bolj občutljiv in nam omogoča tudi kvantifikacijo nekaterih spojin, ki so v medu prisotne v zelo nizkih koncentracijah.

Umeritvena krivulja s standardnim dodatkom in internim standardom:

Kot standardni dodatek smo uporabili mešan standard posameznih flavonoidov, fenolnih kislin in *cis-trans* abscizinske kisline v metanolu (vse spojine, ki so navedene v preglednici 4, razen internega standarda hesperetina), s koncentracijo ca 40 µg/mL. Mešan standard smo hranili v temi pri -18 °C.

Vzorcu akacijevega medu z oznako A3 smo dodali naraščajočo količino mešanega standarda fenolnih spojin in konstantni volumen (100 µL) raztopine (200 µg/mL) internega standarda hesperetina (preglednica 5) ter dobro raztoplili v 15 mL vode z dodatkom HCl in naprej postopali enako kot z vzorci brez dodanega mešanega standarda.

Preglednica 5: Priprava umeritvene krivulje za kvantitativno določanje flavonoidov in fenolnih kislin po metodi standardnega dodatka in internega standarda

Table 5: Preparation of a calibration curve for flavonoids and phenolic acids quantification by the standard addition method and internal standard method.

| Vzorec | Masa vzorca (g) | Masa internega standarda (μg) | Masa posamezne fenolne spojine v standardu (μg) |
|--------|-----------------|--|--|
| slepi | 5,0 | 20,0 | 0 |
| 1 | 5,0 | 20,0 | 0,6 |
| 2 | 5,0 | 20,0 | 1,2 |
| 3 | 5,0 | 20,0 | 2,4 |
| 4 | 5,0 | 20,0 | 6,0 |
| 5 | 5,0 | 20,0 | 12,0 |
| 6 | 5,0 | 20,0 | 30,0 |

Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti posamezne fenolne spojine kaže na linearno zvezo med analitičnim signalom in vsebnostjo analita (priloga B2). Koeficient determinacije (R^2) je bil pri vseh flavonoidih in fenolnih kislinah, kot tudi pri *cis-trans* abscizinski kislini, večji od 0,99.

Enačba premice:

$$\frac{S_{F_i}}{S_{IS}} = k_i \cdot \frac{m_{F_i}}{m_{IS}} \quad \dots (6)$$

Izračun vsebnosti posamezne fenolne spojine:

$$F_i (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{S_{F_i} \cdot m_{IS}}{S_{IS} \cdot k_i \cdot m_{vz}} \cdot 1000 \quad \dots (7)$$

- F_i vsebnost posamezne opazovane fenolne spojine ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vzorca),
 S_{F_i} površina pod vrhom opazovane fenolne spojine,
 S_{IS} površina pod vrhom internega standarda,
 k_i naklon premice za opazovano fenolno spojino,
 m_{F_i} masa standardnega dodatka opazovane fenolne spojine (μg),
 m_{IS} masa dodanega internega standarda (μg),
 m_{vz} masa vzorca (g),
1000 faktor pretvorbe.

3.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti

3.2.4.1 DPPH metoda (Beretta in sod., 2005)

Princip:

Ko raztopina radikala DPPH[•] reagira z antioksidativno komponento, ki je donor vodika, pride do redukcije, kar povzroči spremembo barve raztopine. Vijoličasta barva prostega radikala DPPH[•] ob prisotnosti antioksidanta prehaja v rumeno. Spremembo absorbance spremljamo spektrofotometrično pri 517 nm.

Reagenti:

- absolutni etanol (Merck, Nemčija),
- $130 \mu\text{M}$ DPPH' (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma, Nemčija) v absolutnem etanolu,
- 100 mM acetatni pufer, pH 5,5,
- sladkorni analog (40 % fruktoze, 30 % glukoze, 10 % maltoze in 20 % vode),
- destilirana voda.

Aparatura:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 517 nm).

Izvedba:

Pripravili smo izhodno raztopino medu (15 g/25 mL, w/v) in iz nje z razredčevanjem dobili 11 različnih raztopin medu z masnimi deleži od 30 do 600 mg/mL (preglednica 6). Nato smo v epruvete odpipetirali 0,1 mL posamezne raztopine medu in v vsako dodali 1 mL acetatnega pufra in 1,9 mL DPPH' reagenta. V primeru lipovega in akacijevega medu, ki imata nižjo antioksidativno učinkovitost, koncentracije medu v merjeni raztopini ne zadoščajo za dosego 50 % redukcije absorbance radikala DPPH'. Zato smo volumen raztopine medu in acetatnega pufra ustrezno prilagodili. Za lipov med smo odpipetirali 0,2 mL raztopine medu, 0,9 mL acetatnega pufra in 1,9 mL DPPH' reagenta, tako da je bila koncentracija medu v merjeni raztopini v območju od 2 do 40 mg/mL. V primeru akacijevega medu pa smo odpipetirali 0,3 mL raztopine medu, 0,8 mL acetatnega pufra in 1,9 mL DPPH' reagenta, koncentracija medu v merjeni raztopini je bila tako v območju od 3 do 60 mg/mL. Vzporedno smo pripravili tudi kontrolni in slepi vzorec. Pri kontrolnem vzorcu smo namesto raztopine medu uporabili sladkorni analog, pri slepem pa smo za posamezne koncentracije vzorca uporabili vse reagente razen DPPH' in tako eliminirali vpliv barve medu. Tako pripravljeni raztopine smo premešali na vrtinčniku ter jih za 90 minut postavili v temo pri sobni temperaturi. Po tem času smo na spektrofotometru pri 517 nm izmerili absorbance posameznim raztopinam vzorca, slepim vzorcem in kontrolnemu vzorcu.

Preglednica 6: Razredčitve izhodne raztopine medu

Table 6: Dilution of honey stock solution

| Oznaka | $V_{\text{razt. medu}}$ (mL) | V_{vode} (mL) | c (mg/mL) | c^* (mg/mL) | c^{**} (mg/mL) | c^{***} (mg/mL) |
|--------|------------------------------|------------------------|-----------|---------------|------------------|-------------------|
| 1 | 0,1 | 1,9 | 30 | 1 | 2 | 3 |
| 2 | 0,2 | 1,8 | 60 | 2 | 4 | 6 |
| 3 | 0,4 | 1,6 | 120 | 4 | 8 | 12 |
| 4 | 0,6 | 1,4 | 180 | 6 | 12 | 18 |
| 5 | 0,8 | 1,2 | 240 | 8 | 16 | 24 |
| 6 | 1,0 | 1,0 | 300 | 10 | 20 | 30 |
| 7 | 1,2 | 0,8 | 360 | 12 | 24 | 36 |
| 8 | 1,4 | 0,6 | 420 | 14 | 28 | 42 |
| 9 | 1,6 | 0,4 | 480 | 16 | 32 | 48 |
| 10 | 1,8 | 0,2 | 540 | 18 | 36 | 54 |
| 11 | 2,0 | 0,0 | 600 | 20 | 40 | 60 |

*končna koncentracija medu v merjeni raztopini za cvetlični, kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med

**končna koncentracija medu v merjeni raztopini za lipov med

***končna koncentracija medu v merjeni raztopini za akacijev med

Iz dobljenih rezultatov smo narisali graf, in sicer odvisnost preostalega DPPH[•] od koncentracije medu. Preostali DPPH[•] smo izračunali po enačbi 8 in rezultate podali v odstotkih. IC₅₀ (koncentracijo učinkovitosti) izračunamo iz enačbe premice (prilogi C1 in C2).

$$\text{preostali DPPH (\%)} = \frac{A_{VZ} - A_{SL}}{A_K} \cdot 100 \quad \dots (8)$$

A_{VZ} absorbanca vzorca medu
 A_K absorbanca kontrolnega vzorca
 A_{SL} absorbanca slepega vzorca

3.2.4.2 FRAP metoda (Benzie in Strain, 1996)

Princip:

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) temelji na redukciji Fe³⁺ v Fe²⁺ ob prisotnosti antioksidanta. Nastali Fe²⁺ ioni z TPTZ reagentom (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin) tvorijo obarvan kompleks, ki doseže absorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija poteka v kislem mediju (Benzie in Strain, 1996).

Reagenti:

- 10 mM TPTZ (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- 40 mM HCl (Merck, Nemčija),
- 20 mM železov klorid (FeCl₃·6H₂O) (Merck, Nemčija),
- 300 mM acetatni pufer, pH 3,6: 3,1 g CH₃COONa·3H₂O (Kemika, Zagreb) raztopimo v destilirani vodi, dodamo 16 mL CH₃COOH (Merck, Nemčija) in dopolnimo do 1 L,
- 20 mM železov sulfat (FeSO₄·7H₂O) (Merck, Nemčija),
- destilirana voda.

Aparatura:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 593 nm).

Izvedba:

Priprava FRAP reagenta:

Na analitski tehnici smo odtehtali 31,0 mg TPTZ reagenta in mu dodali 10 mL 40 mM HCl ter mešanico popolnoma raztopili v vodni kopeli na 50 °C. Nato smo odtehtali 54,0 mg železovega klorida in ga raztopili v 10 mL destilirane vode. Za pripravo FRAP reagenta smo odpipetirali TPTZ reagent, FeCl₃·6H₂O in acetatni pufer v razmerju 1:1:10. FRAP reagent vedno pripravimo tik pred uporabo in ga med analizo hranimo v vodni kopeli pri 37 °C.

Umeritvena krivulja:

Pripravili smo standardne raztopine železovega sulfata s koncentracijami od 0,1 do 1,0 mM. Odpipetirali smo 200 µL posamezne standardne raztopine, dodali 1,8 mL FRAP reagenta, dobro premešali in inkubirali 10 min pri 37 °C.

Nato smo na spektrofotometru pri valovni dolžini 593 nm izmerili absorbance standardnih raztopin proti slepemu vzorcu. Iz izmerjenih absorbanc in znanih koncentracij standardnih raztopin (priloga D1) smo narisali umeritveno krivuljo (priloga D2).

Vzorci:

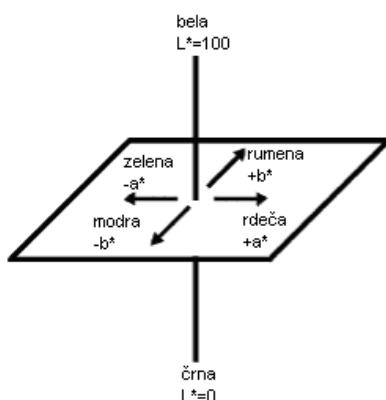
V stekleno čašo smo odtehtali 5,0 g vzorca medu in ga raztopili v ca 20 mL destilirane vode. Nato smo vzorec kvantitativno prenesli v 50 mL bučko in jo dopolnili do oznake. Za analizo smo odpipetirali 200 μL vzorca in mu dodali 1,8 mL FRAP reagenta ter inkubirali 10 min pri 37 °C. Nato smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri 593 nm proti slepemu vzorcu. Vsak vzorec smo analizirali v treh vzporednih določitvah. Rezultate smo izrazili kot FRAP vrednost ($\mu\text{M Fe(II)}$) 10 % raztopine medu.

3.2.5 Merjenje barve medu

3.2.5.1 Instrumentalno merjenje barve z Minolta kromametrom

Princip:

Kromameter Minolta CR-200B v CIE $L^* a^* b^*$ sistemu je splošno znan sistem za merjenje barve živil. Deluje na principu odboja svetlobe, ki ga naše oko zazna v obliki barve. Barvo vzorca razdeli na tri komponente (L^* , a^* in b^*), ki jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu. Vrednost L^* določa svetlost barve vzorca: večja kot je vrednost, svetlejše je živilo, vrednosti a^* in b^* pa določata odtenek barve. Parameter a^* določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem območju. Parameter b^* pa predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem.



Slika 13: CIE $L^* a^* b^*$ barvni prostor (HunterLab color space, 1996)

Figure 13: CIE $L^* a^* b^*$ color scale (HunterLab color space, 1996)

Sistem CIE $L^* a^* b^*$ s kromametrom Minolta CR-200B ima priključen računalnik DATA DP 100 za obdelavo podatkov. Sestavlja ga merilna glava in mikroprocesorska podatkovna enota. Pred merjenjem je potrebno kromameter umeriti na beli standard (Gonzáles-Miret in sod., 2005).

Aparatura:

- kromameter Minolta CR-200B (Konica Minolta, Japonska),
- računalnik DATA DP 100.

Izvedba:

Plastične prozorne petrijevke smo napolnili z medom in jih previdno pokrili s pokrovom tako, da smo se izognili nastanku zračnih mehurčkov. Če so bili vzorci medu kristalizirani, smo jih predhodno utekočinili s segrevanjem v zaprtih kozarčkih v sušilniku pri 40 °C. Nato smo na petrijevko nastavili merilno glavo kromametra Minolta CR-200B in na računalniku odčitali L^* , a^* in b^* vrednosti za posamezne vzorce medu. Meritev smo za vsak vzorec trikrat ponovili na različnih mestih in rezultat podali kot povprečno vrednost treh določitev.

3.2.5.2 Spektrofotometrično merjenje barve

Princip:

Vodne raztopine medu absorbirajo svetlobo pri določenih valovnih dolžinah (Beretta in sod., 2005).

Aparatura:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovni dolžini 450 nm in 720 nm).

Izvedba:

Pripravili smo 50 % raztopino posameznega vzorca medu (w/v) in jo filtrirali preko filtrirnega papirja (modri trak, 391 Sartorius). Filtratu smo izmerili absorbanco pri dveh valovnih dolžinah, 450 in 720 nm. Rezultat smo podali kot vrednost neto absorbance – razlika v izmerjenih absorbancbah ($A_{450} - A_{720}$), pomnožena s 1000 (Beretta in sod., 2005).

3.2.6 Določanje vsebnosti prolina

Princip:

Vsebnost prolina smo določali z Oughovo fotometrično metodo, modificirano po Bogdanovu in sod. (1997). Prolin in ninhidrin tvorita rumen barvni kompleks. Po dodatku 2-propanola smo merili absorbanco v raztopini vzorca in referenčni (standardni) raztopini pri valovni dolžini 510 nm. Vsebnost prolina smo izračunali z relacijo 11.

Reagenti:

- 3 % raztopina ninhidrina: 3,0 g ninhidrina (Merck, Nemčija) smo raztopili v 100 mL etilenglikolmonometil etra (Merck, Nemčija). Raztopina je obstojna 1 teden v temi.
- L(-) prolin (Merck, Nemčija): vakumsko osušen prolin hranimo do uporabe v eksikatorju
 - a) Standardna raztopina prolina (0,8 mg/mL): 40 mg vakuumsko osušenega prolina smo razredčili z destilirano vodo do volumna 50 mL. Raztopino smo pripravljali tedensko in jo do uporabe hranili v hladilniku.

- b) Delovna raztopina prolina (0,032 mg/mL): 1 mL standardne raztopine prolina smo razredčili do 25 mL z destilirano vodo. Raztopino smo pripravili vsak dan svežo.
- 2-propanol (Merck, Nemčija), razredčen z destilirano vodo v razmerju 1:1 (v:v),
 - mravljinčna kislina, HCOOH (Merck, Nemčija).

Aparatura:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 510 nm).

Izvedba:

Priprava raztopine vzorca medu: V čašo smo odtehtali 2,5 g vzorca medu, dodali ca 10 mL destilirane vode ter vzorec kvantitativno prenesli v 50 mL bučko. Bučko smo dopolnili do oznake z destilirano vodo in vsebino dobro premešali.

V dve epruveti smo odpipetirali 0,5 mL raztopine vzorca medu, v drugi dve epruveti 0,5 mL destilirane vode (slepi vzorec) in v tri epruvete 0,5 mL standardne raztopine prolina. V vsako epruveto smo dodali še 1 mL mravljinčne kisline, 1 mL raztopine ninhidrina, dobro zaprli in 15 minut mešali na stresalniku. Sledilo je 15 minutno termostatiranje v vreli vodni kopeli in nato 10 minut pri temperaturi 70 °C. Po dodatku 5 mL raztopine izopropanola smo epruvete pustili na sobni temperaturi in po 45 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 510 nm.

Izračun:

Vsebnost prolina smo izrazili v miligramih prolina na kilogram medu (enačba 9).

$$vsebnost\ prolina\ (mg/kg) = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot \frac{E_1}{E_2} \cdot R \quad \dots (9)$$

A_{vz} izmerjena absorbanca raztopine vzorca,
 A_{st} izmerjena absorbanca standardne raztopine prolina,
 E_1 miligrami prolina za pripravo standardne raztopine prolina (40 mg v 50 mL),
 E_2 grami medu za pripravo raztopine vzorca (2,5 g v 50 mL),
 R faktor razredčevanja:

$$R = \frac{R_{vzorca}}{R_{standara}} \cdot R' = \frac{100}{2500} \cdot 1000 = 40 \quad \dots (10)$$

R_{vzorca} 100 (2,5 g medu v 50 mL H₂O → od tega v analizo 0,5 mL raztopine vzorca),
 R_{stand} $R_1 \cdot R_2 = 2500$,
 R_1 50 (40 mg standarda v 50 mL H₂O → odvzamemo 1 mL),
 R_2 50 (odvzeti 1 mL v 50 mL H₂O → v analizo 0,5 mL standardne raztopine),
 R' 1000 (1 kg = 1000 g).

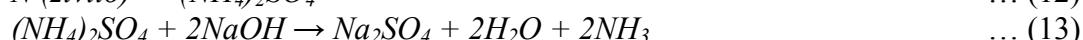
Končna enačba (11) z upoštevanjem razredčitev:

$$vsebnost\ prolina\ (mg/kg) = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot \frac{40}{2,5} \cdot 40 = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot 640 \quad \dots (11)$$

3.2.7 Določanje vsebnosti skupnih beljakovin

Princip:

Kjeldahlova metoda (Golob in Plestenjak, 2000) temelji na posrednem določanju beljakovin preko dušika, ob upoštevanju, da je ves, v živilu prisoten dušik, beljakovinski. Za preračunavanje dušika v beljakovine uporabljamo ustrezne empirične faktorje. Proteine v vzorcu pred analizo razklopimo z mokrim sežigom ob pomoči kisline, katalizatorja in visoke temperature. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo amoniak (NH_3), ki ga lovimo v prebitek borove kisline in nato nastali amonijev borat titriramo s standardno raztopino klorovodikove kisline. Pri tem potekajo naslednje kemijske reakcije:



Če enačbi (14) in (15) združimo, dobimo:



Iz enačbe (16) sledi:

- 1 mol HCl = 1 mol N = 14 g N
- 1 mL 0,1 M HCl = 0,0014 g N

Reagenti:

- koncentrirana H_2SO_4 , d = 1,84 mg/mL (Merck, Nemčija),
- katalizator Kjeltabs Cu / 3,5 (305 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) (Foss, Švedska),
- nasičena raztopina (ca 3 %) H_3BO_3 (Merck, Nemčija),
- 30 % raztopina NaOH (Merck, Nemčija),
- 0,1 M HCl (Merck, Nemčija).

Aparatura in pribor:

- blok za razklop oz. mokri sežig vzorca (Digestion Unit K-426, Büchi, Švica),
- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber, Büchi, Švica),
- destilacijska enota (Distillation Unit B-324, Büchi, Švica),
- titracijska enota (Titrino 702 SM, Metrohm, Švica),
- sežigne epruvete (Büchi, Švica).

Izvedba:

a) Priprava vzorca

V čašo smo odtehtali 3,0 g vzorca medu, ga raztopili v ca 10 mL vode in kvantitativno prenesli v sežigno epruveto. Sežigne epruvete smo postavili v stojalo ter nepokrite prenesli v blok za razklop vzorca in pri nizki temperaturi peči odparili večji del v začetku dodane vode. V nasprotnem primeru bi presežek vode lahko povzročal nekontrolirano penjenje med mokrim sežigom.

b) Razklop (mokri sežig vzorca)

Po odparevanju smo v vsako sežigno epruveto dodali 1,5 tablete bakrovega katalizatorja in 20 mL koncentrirane H_2SO_4 . Epruvete smo pokrili s steklenimi

zvonci in postavili v ogreto enoto za razklop (Digestion Unit) s temperaturo 370 °C. Sežig je končan v približno 1 uri oziroma takrat, ko se vsebina v epruveti preneha peniti in postane bistro zelena.

c) Destilacija

Vzorce smo v epruveti ohladili na sobno temperaturo. Epruveto smo nato vstavili v destilacijsko enoto, kjer poteka doziranje 50 mL destilirane vode in 70 mL baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko predložko se doda 60 mL borove kisline (H_3BO_3). Nato se začne dovajati para v vzorce. Destilacija traja 4 minute.

d) Titracija

Raztopino nastalega amonijevega borata v predložki smo titrirali z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija je potekla avtomatsko po vnosu podatka o količini vzorca (v mg) v titracijsko enoto. V končni točki titracije se zabeleži poraba kisline, iz katere se izračuna vsebnost dušika ter beljakovin v vzorcu. V primeru medu se uporabi splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine, ki je enak 6,25.

Izračun:

$$\text{vsebnost beljakovin (g/100 g)} = \frac{V_{0,1M\ HCl} \text{ (mL)} \cdot 1,4}{m_{odtehta} \text{ (mg)}} \cdot 100 \cdot 6,25 \quad \dots (17)$$

V_{HCl} volumen 0,1 M HCl (mL)
1,4 ekvivalent (1 mL 0,1 M HCl = 1,4 mg N)
 $6,25 = F$ splošni empirični faktor za preračun N v beljakovine

3.2.8 Statistična obdelava podatkov

Dobljene rezultate smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel 2003. Tako urejene podatke smo statistično obdelali v programu SPSS (SPSS 15.0 for Windows, Evaluation Version, 2006) in jih ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri:

- povprečna vrednost (\bar{x}),
- minimalna vrednost (x_{min}),
- maksimalna vrednost (x_{max}),
- standardni odklon (SO),
- koeficient variabilnosti (KV),
- koeficient determinacije (R^2),
- Pearsonov koeficient korelacije (R).

Analiza variance (ANOVA)

S testom ANOVA preverjamo domnevo o enakosti povprečij po vzorcih. Ta test spada med parametrične teste in temelji na predpostavkah, da so spremenljivke normalno porazdeljene in da so variance po vzorcih enake oz. homogene. Slednje preverjamo z Levenovim preizkusom homogenosti varianc po obravnavanjih. Ničelna hipoteza (H_0)

Levenovega preizkusa pravi, da med variancami vzorcev ni razlik, alternativna hipoteza (H) pa da med vsaj enim parom variance obstaja statistično značilna razlika. Vrednost statistične značilnosti, ki je manjša od 0,05 vodi k sprejetju H (vzorci niso homogeni, ne moremo nadaljevati z ANOVO), vrednost večja od 0,05 pa vodi k potrditvi H_0 . Kadar je sprejeta H_0 , se potrdi homogenost vzorcev in lahko nadaljujemo s statistično obravnavo. Prednost Levenovega preizkusa je manjša občutljivost za morebitna odstopanja podatkov od normalne porazdelitve, zato je primeren tudi takrat, ko za obravnavano spremenljivko ne moremo privzeti normalne porazdelitve.

Ničelna hipoteza – H_0 pri testu ANOVA trdi, da so povprečja po obravnavanjih enaka, alternativna hipoteza – H pa, da obstaja vsaj en par, kjer povprečji po obravnavanjih nista enaki. V primeru, da H_0 ne moremo zavrniti, je statistična analiza končana. Kadar H_0 zavrnemo, sprejmemo alternativno hipotezo in s tem domnevo, da med povprečnimi vrednostmi po obravnavanjih obstajajo statistično značilne razlike. V tem primeru lahko statistično obravnavo nadgradimo z uporabo post-hoc testov ali testov mnogoterih primerjav. ANOVA je tako preliminaren test, ki pove ali se statistična obravnavava nadaljuje ali ne (Košmelj in Kastelec, 2003).

Duncanov test je eden izmed najbolj uporabnih post-hoc testov (testov mnogoterih primerjav), s katerim ugotavljam, kakšne so razlike med povprečnimi vrednostmi posameznih statističnih vzorcev.

4 REZULTATI

Eksperimentalni del doktorske disertacije je obsegal kvantitativno ovrednotenje nekaterih fizikalno-kemijskih parametrov ter skupnih kot tudi individualnih fenolnih spojin v vzorcih različnih vrst slovenskega medu. Ker so fenolne spojine znane po svojem antioksidativnem delovanju, smo z dvema metodama določili antioksidativno učinkovitost medu. Podatki iz literature kažejo, da je AU medu odvisna tudi od njegove barve, zato smo le-to ovrednotili z instrumentalnimi metodami. Rezultate smo opisali z osnovnimi statističnimi parametri, jih z različnimi metodami statistično obdelali ter iskali morebitne povezave med njimi. Levenov preizkus homogenosti variance, ki je predpogoj za test analize variance – ANOVA, v primeru obravnavanih parametrov v poglavjih 4.1, 4.2, 4.4, 4.6 in 4.8 ni bil izpolnjen, kar pomeni, da so bile variance podatkov pri različnih vrstah medu različne. Zato testa ANOVA nismo mogli izvesti.

4.1 REZULTATI DOLOČANJA NEKATERIH OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV IN SENZORIČNA ANALIZA MEDU

Rezultati analiz nekaterih osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov (vsebnosti vode, električne prevodnosti, vrednosti pH in vsebnosti skupnih kislin) so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Vsebnost vode, električna prevodnost (χ), vrednost pH in vsebnost skupnih kislin v različnih vrstah medu

Table 7: Water content, electrical conductivity (χ), pH value and total acids content in different honey types

| Vrsta medu | n | Statistični parameter | Vsebnost vode (g/100 g) | χ (mS/cm) | pH | Skupne kisline (mekv/kg) |
|------------|----|-----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|--------------------------|
| akacijev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | $15,7 \pm 0,9$ | $0,194 \pm 0,038$ | $4,01 \pm 0,17$ | $17,43 \pm 4,17$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $14,2 - 17,5$ | $0,114 - 0,265$ | $3,65 - 4,38$ | $11,51 - 25,52$ |
| lipov | 28 | $\bar{x} \pm SD$ | $16,1 \pm 1,0$ | $0,783 \pm 0,106$ | $4,88 \pm 0,44$ | $16,40 \pm 6,20$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $14,5 - 17,8$ | $0,548 - 0,993$ | $4,14 - 6,02$ | $8,37 - 36,25$ |
| cvetlični | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | $15,8 \pm 0,9$ | $0,551 \pm 0,137$ | $4,36 \pm 0,24$ | $27,07 \pm 8,41$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $14,4 - 18,0$ | $0,325 - 0,838$ | $3,98 - 4,84$ | $12,43 - 36,25$ |
| kostanjev | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | $15,9 \pm 0,9$ | $1,605 \pm 0,235$ | $5,51 \pm 0,42$ | $15,72 \pm 5,66$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $13,7 - 17,7$ | $1,050 - 2,245$ | $4,75 - 6,18$ | $8,85 - 32,51$ |
| smrekov | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | $15,6 \pm 1,0$ | $1,278 \pm 0,210$ | $4,78 \pm 0,25$ | $33,12 \pm 6,31$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $14,3 - 18,5$ | $0,915 - 1,632$ | $4,33 - 5,49$ | $19,07 - 45,33$ |
| hojev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | $15,2 \pm 0,9$ | $1,320 \pm 0,178$ | $5,14 \pm 0,25$ | $22,37 \pm 4,02$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $13,8 - 17,7$ | $0,894 - 1,566$ | $4,73 - 5,75$ | $12,31 - 30,46$ |
| gozdni | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | $15,2 \pm 0,8$ | $1,222 \pm 0,189$ | $4,77 \pm 0,20$ | $29,02 \pm 7,15$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $13,5 - 17,0$ | $0,807 - 1,677$ | $4,39 - 5,22$ | $15,65 - 43,83$ |

n: število vzorcev, \bar{x} : povprečna vrednost, SD: standardni odklon, x_{\min} : minimalna vrednost, x_{\max} : maksimalna vrednost, χ : električna prevodnost

Iz preglednice 7 je razvidno, da so imele analizirane vrste medu zelo podobne vrednosti za vsebnost vode, povprečne vrednosti so znašale od 15,2 g/100 g v hojevem in gozdnem medu, do 16,1 g/100 g v lipovem medu.

Električna prevodnost je bila najnižja v akacijevem medu ter najvišja v kostanjevem medu in v medovih iz mane, to je smrekovem, hojevem in gozdnem medu.

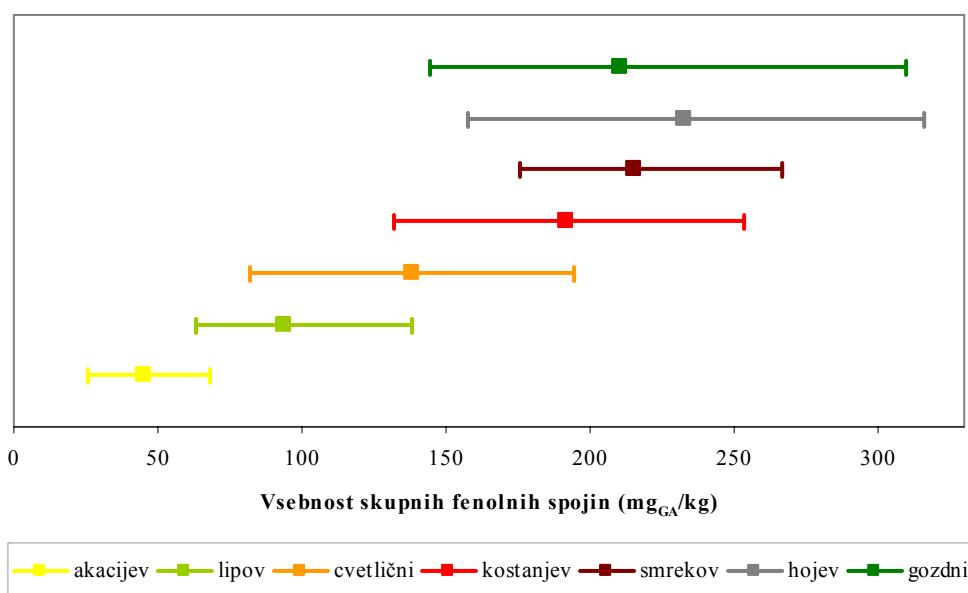
Vrednost pH je bila najnižja v akacijevem in cvetličnem medu, ki izvirata iz nektarja, 4,01 oz. 4,36. Lipov, smrekov in gozjni med imajo zelo podoben pH, povprečne vrednosti pH teh vrst medu so znašale od 4,77 do 4,88. Najvišjo povprečno vrednost pH je imel kostanjev med 5,51.

Najmanj skupnih kislin so vsebovali akacijev, lipov in kostanjev med (povprečne vrednosti za te vrste medu so se gibale od 15,72 do 17,43 mekv/kg medu), največ skupnih kislin pa je vseboval smrekov med s povprečno vsebnostjo 33,12 mekv/kg.

S senzorično analizo medu smo preverili vrsto medu, deklarirano s strani čebelarjev. V primeru nepravilno označene vrste smo vzorec medu, glede na njegove senzorične lastnosti, ustrezno prekvalificirali v določeno vrsto.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena s FC metodo, je v posameznih vrstah medu močno variirala, kar je razvidno na sliki 14, kjer so podane povprečne vrednosti (kvadratki) in območja (levi ročaj predstavlja minimalno, desni maksimalno vrednost). Najmanjšo povprečno vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili v akacijevem medu, 44,9 mg, izraženih kot mg galne kisline na kg medu, sledita lipov in cvetlični med. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v kostanjevem medu je znašala v povprečju 191,7 mg_{GA}/kg. Največ skupnih fenolnih spojin so vsebovali medovi iz mane, to so gozjni, smrekov in hojev med, povprečne vsebnosti so bile od 210,4 mg_{GA}/kg v gozdnem medu do 232,5 mg_{GA}/kg v hojevem medu in so bile približno petkrat višje kot v akacijevem medu.



Slika 14: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v različnih vrstah medu

Figure 14: Total phenolic content in different honey types

Intervali vrednosti za vsebnost skupnih fenolnih spojin so bili najmanjši pri akacijevem medu, od 25,7 do 67,9 mg_{GA}/kg, ter največji pri hojevem (157,9 do 316,0 mg_{GA}/kg) in gozdnem medu (144,6 do 310,1 mg_{GA}/kg).

Za določitev pravilnosti metode smo uporabili metodo standardnega dodatka. Izbranim vzorcem medu (A3, S25 in G1) smo dodali določene količine galne kisline in izračunali izkoristke (priloga A3), ki so znašali od 98,9 do 102,9 %.

4.3 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN (FENOLNIH KISLIN IN FLAVONOIDOV) S HPLC/MS

Rezultati določanja posameznih fenolnih kislin in flavonoidov, kot tudi abscizinske kisline, so podani za vse analizirane vzorce posameznih vrst medu (10 vzorcev vsake vrste) kot povprečne vrednosti dveh vzporednih določitev v podpoglavljih 4.3.2 – 4.3.8, v preglednicah 9 – 15. Povprečnih vrednosti za vsebnosti posameznih spojin za določene vrste medu nismo podali zaradi velike variabilnosti rezultatov in majhnega števila analiziranih vzorcev. Zato dobljenih rezultatov tudi nismo bolj statistično obdelali.

Od fenolnih kislin, prisotnih v analiziranih vzorcih medu, smo identificirali in kvantitativno določili klorogensko, *p*-kumarno in elaginsko kislino. Kavno kislino smo identificirali in kvantitativno določili le v akacijevem, lipovem in cvetličnem medu, v temnejših vrstah medu, kostanjevem, smrekovem, hojevem in gozdnem medu, pa smo kavno kislino samo identificirali. Pri temnejših medovih je namreč izolacija fenolnih kislin otežena zaradi zahtevnejše ekstrakcije, saj temnejši medovi vsebujejo večje količine motečih komponent. Galne kisline nismo kvantitativno ovrednotili, ker smo v predposkusu ugotovili, da se pri postopku ekstrakcije (SPE) samo deloma veže na ekstrakcijsko kolono Strata-X in smo jo izgubili pri spiranju z vodo s HCl in vodo. Paralelke pa so imele zelo slabo ponovljivost.

Od flavonoidov smo identificirali in kvantitativno določili miricetin, luteolin, kvercetin, naringenin, apigenin, kamferol, pinocembrin, krizin in galangin. Poleg naštetih spojin smo na podlagi molskih mas, m/z vrednosti in podatkov iz literature sklepali, da so v analiziranih vzorcih medu prisotni tudi cimetina in β -fenilmlečna kislina ter flavonoidi tricetin, fisetin, pinobanksin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol, kot tudi *trans-trans* abscizinska kislina (ABA1). Retencijski časi in m/z vrednosti domnevno identificiranih spojin so podani v preglednici 8. Ker za te spojine nismo imeli ustreznih standardov, smo, podobno kot nekateri drugi raziskovalci (Tomás-Barberán, 2001; D'Arcy, 2005), njihovo vsebnost v medu določili z naslednjimi standardnimi spojinami, za katere predvidevamo, da imajo podoben odziv na detektorju:

- pinobanksin in pinostrobin smo kvantitativno ovrednotili s standardom pinocembrinom,
- tricetin, fisetin, izoramnetin in eriodiktiol smo kvantitativno ovrednotili s standardom kvercetinom,
- cimetina in β -fenilmlečna kislina smo kvantitativno ovrednotili s standardom kavne kisline,
- *trans-trans* abscizinsko kislino (ABA1) smo kvantitativno ovrednotili s standardom *cis-trans* abscizinske kisline (ABA2).

Preglednica 8: Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti domnevno identificiranih fenolnih kislin in flavonoidov

Table 8: Retention times, molecular weights and m/z values of tentatively identified phenolic acids and flavonoids

| Domnevna spojina | Oznaka | Rt (min) | M (g/mol) | m/z vrednost [M-H] ⁻ |
|--|--------|-------------|--------------|------------------------------------|
| cimetna kislina | CIM | 20,57 | 148,17 | 147,20 |
| β -fenilmlečna kislina | FM | 20,76 | 166,18 | 165,20 |
| tricetin | TRI | 32,10 | 302,23 | 301,01 |
| fisetin | FIS | 33,14 | 286,24 | 285,20 |
| pinobanksin | PB | 36,81 | 272,26 | 271,30 |
| izoramnetin | IR | 37,91 | 316,20 | 315,20 |
| pinostrobin | PS | 45,34 | 270,28 | 269,24 |
| eriodiktiol | ERI | 45,60 | 288,06 | 287,10 |
| <i>trans-trans</i> abscizinska kislina | ABA1 | 28,72 | 264,30 | 263,30 |

Rt: retencijski čas, M: molska masa

Poleg naštetih spojin so v medu prisotne še nekatere druge fenolne kisline in flavonoidi, katerih nismo uspeli identificirati, zato v rezultatih niso vključeni.

4.3.1 Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih snovi v medu s HPLC/MS

Ponovljivost določanja vsebnosti nekaterih fenolnih kislin in flavonoidov ter *cis-trans* abscizinske kislino – ABA2 smo določili znotraj paralelke naključnega vzorca medu (vzorec S29). Vzorec smo pripravili enkrat in ga 6-krat zaporedoma injicirali (priloga B3). Določili smo tudi ponovljivost med paralelkami, in sicer tako, da smo vsebnost nekaterih fenolnih kislin in flavonoidov ter abscizinske kislino analizirali v šestih paralelkah. Ponovljivost smo ovrednotili z določitvijo koeficiente variabilnosti (KV). Ker barva medu zelo variira glede na vrsto, smo izbrali naključne vzorce za 3 vrste medu, akacijev, cvetlični in gozdni med. Rezultati so prikazani v prilogah B4 do B6. Koeficienti variabilnosti znotraj paralelke so se gibali med 2,5 % in 6,5 %, koeficienti variabilnosti med paralelkami pa so bili manjši od 10 %, razen pri luteolinu. Nizke vrednosti koeficientov variabilnosti kažejo na dobro ponovljivost uporabljenih metode.

Pričakovali smo, da bodo koeficienti variabilnosti višji pri temnejših medovih zaradi zahtevnejše ekstrakcije, saj temnejši medovi vsebujejo večje količine motečih komponent, vendar med akacijevim, cvetličnim in gozdnim medom ni bilo bistvenih razlik v vrednostih koeficientov variabilnosti.

4.3.2 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v akacijevem medu

Vsebnosti nekaterih fenolnih kislin, flavonoidov in abscizinske kislino v analiziranih vzorcih akacijevega medu so podane v preglednici 9. Iz nje je razvidno, da vzorci niso vsebovali klorogenske in elaginske kisline ter flavonoida miricetina, kot tudi ne spojine, ki smo jo samo domnevno identificirali kot flavonoid tricetin. Od vseh analiziranih vzorcev je vseboval flavonoid naringenin samo vzorec A14, in sicer 113 µg/kg medu. Trije vzorci so vsebovali luteolin, vendar so bile vsebnosti majhne, od 37 do 84 µg/kg.

Vsi vzorci so vsebovali flavonoide kvercetin, apigenin in kamferol, katerih vir je nektar in/ali cvetni prah. Vsebnosti kvercetina so se gibale od 133 do 293 µg/kg, vsebnost apigenina pa je bila manjša, vrednosti so znašale od 43 do 145 µg/kg. Vsebnosti kamferola v analiziranih vzorcih akacijevega medu so znašale od 212 do 365 µg/kg.

Preglednica 9: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline (µg/kg) v analiziranih vzorcih akacijevega medu

Table 9: Phenolics and abscisic acid content (µg/kg) of the analysed acacia honey samples

| Spojina (µg/kg) | Vzorec | | | | | | | | | |
|------------------|--------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | A2 | A3 | A5 | A8 | A14 | A18 | A19 | A21 | A25 | A32 |
| klorogenska k. | | | | | | | | | | |
| kavna k. | 616 | 258 | 187 | 376 | 257 | 419 | 385 | 171 | 106 | 311 |
| p-kumarna k. | 1574 | 988 | 1861 | 1624 | 2479 | 1945 | 2280 | 423 | 710 | 3794 |
| elaginska k. | | | | | | | | | | |
| miricetin | | | | | | | | | | |
| luteolin | | | 42 | | 84 | | | | | 37 |
| kvercetin | 273 | 196 | 228 | 222 | 253 | 293 | 261 | 133 | 166 | 284 |
| naringenin | | | | | 113 | | | | | |
| apigenin | 95 | 60 | 102 | 67 | 91 | 145 | 102 | 62 | 43 | 85 |
| kamferol | 337 | 260 | 242 | 297 | 212 | 365 | 305 | 298 | 232 | 299 |
| pinocembrin | 490 | 464 | 170 | 701 | 51 | 2019 | 978 | 771 | 802 | 263 |
| krizin | 681 | 642 | 230 | 808 | 70 | 1253 | 737 | 870 | 825 | 301 |
| galangin | 170 | 252 | 71 | 349 | 28 | 1109 | 582 | 383 | 381 | 143 |
| ABA2 | 877 | 803 | 1125 | 448 | 1159 | 1333 | 1223 | 1660 | 894 | 1959 |
| cimetna k.* | 245 | 98 | 108 | 210 | 171 | 157 | 131 | 77 | 45 | 56 |
| β-fenilmlečna k* | 546 | 214 | 215 | 410 | 327 | 332 | 266 | 115 | 86 | 97 |
| tricetin* | | | | | | | | | | |
| fisetin* | 378 | 325 | 22 | 164 | | 3899 | 1284 | 390 | 287 | 34 |
| pinobanksin* | 589 | 587 | 274 | 949 | 86 | 3392 | 1413 | 1136 | 1230 | 482 |
| izoramnetin* | 799 | 278 | 350 | 321 | 218 | 397 | 294 | 273 | 170 | 107 |
| pinostrobin* | 91 | 237 | 187 | 320 | 77 | 767 | 289 | 350 | 300 | 429 |
| eriodiktiol* | 207 | 138 | 258 | 258 | 81 | 177 | 114 | 269 | 263 | 216 |
| ABA1* | 298 | 204 | 199 | 219 | 288 | 275 | 204 | 301 | 166 | 369 |

*domnevna identifikacija

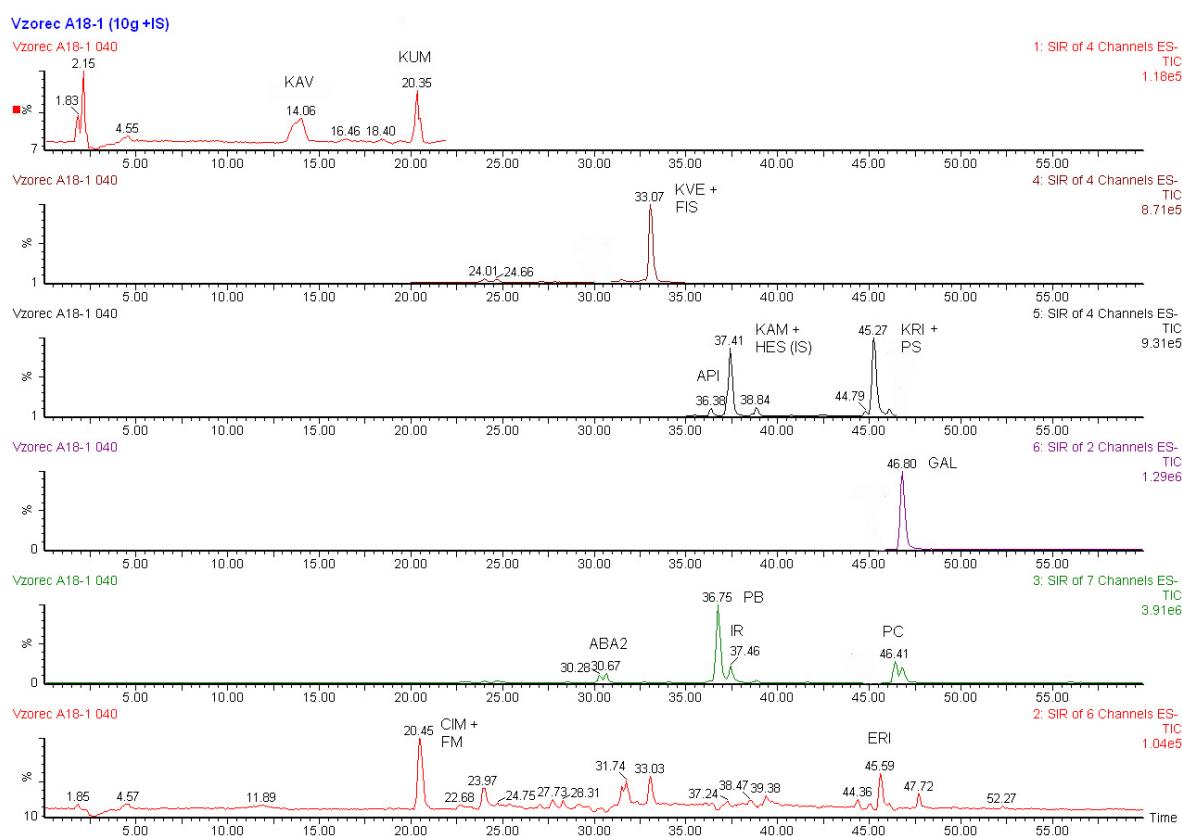
Flavonoidi, ki izvirajo iz propolisa, pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin, so bili prisotni v vseh analiziranih vzorcih akacijevega medu v zelo različnih količinah. Vsebnost teh spojin v medu je odvisna od prisotnosti propolisa v medu. Največ jih je vseboval vzorec A18, od 1109 µg/kg (galangin) do 3392 µg/kg (pinobanksin), najmanj pa vzorec A14, le od 28 µg/kg (galangin) do 86 µg/kg (pinobanksin). Ker je vzorec A14 ostale spojine vseboval v primerljivih količinah kot drugi vzorci akacijevega medu, sklepamo, da je bila v tem vzorcu vsebnost propolisa minimalna.

Fenolne kisline – kavna, p-kumarna, cimetna in β-fenilmlečna kislina so bile prisotne v vseh analiziranih vzorcih, njihove vsebnosti pa so bile zelo variabilne. Na splošno je bilo v vzorcih največ p-kumarne kisline in potem kavne kisline. Cimetna in β-fenilmlečna, ki smo

ju samo domnevno identificirali na podlagi molskih mas in razpoložljivih podatkov iz literature, sta bili v akacijevem medu prisotni v manjših količinah.

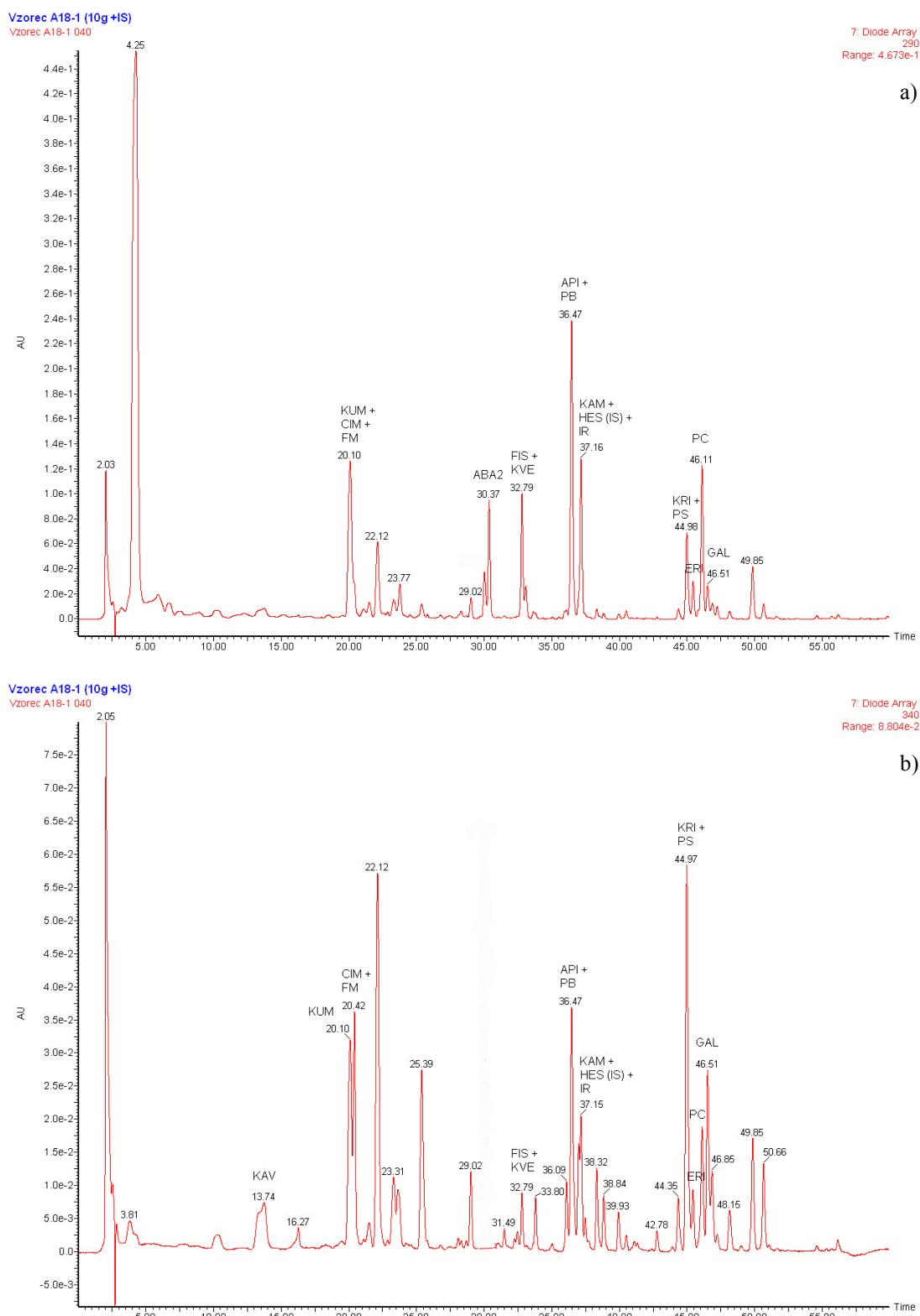
Za vse analizirane vzorce akacijevega medu je značilna tudi prisotnost dveh izomer abscizinske kisline, ABA1 (*trans-trans* abscizinska kislina) in ABA2 (*cis-trans* abscizinska kislina). ABA spada med rastlinske hormone, je neflavonoidna komponenta, ki služi za zaščito rastline v času suše in drugih sprememb v okolju. Vsi analizirani vzorci so vsebovali več *cis-trans* abscizinske kisline (ABA2), od 448 do 1959 µg/kg, medtem ko je bilo ABA1 od 166 do 369 µg/kg medu.

Kromatogrami za vzorec akacijevega medu A18 so prikazani na slikah 15 (HPLC/MS) in 16 (HPLC/DAD).



Slika 15: HPLC/ESI(–)/MS kromatogram akacijevega medu (vzorec A18). Za identifikacijo vrhov glej preglednici 4 in 8

Figure 15: HPLC/ESI(–)/MS chromatogram of acacia honey (sample A18). See Tables 4 and 8 for peak identification



Slika 16: HPLC/DAD kromatogram akacijevega medu (vzorec A18) pri 290 nm (a) in 340 nm (b). Za identifikacijo vrhov glej preglednici 4 in 8

Figure 16: HPLC/DAD chromatogram of acacia honey (sample A18) recorded at 290 nm (a) and 340 nm (b). See Tables 4 and 8 for peak identification

4.3.3 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v lipovem medu

V preglednici 10 je podana vsebnost nekaterih fenolnih kislin, flavonoidov in abscizinske kisline v analiziranih vzorcih lipovega medu. Iz nje je razvidno, da vzorci niso vsebovali flavonoidov miricetina in domnevno identificiranega tricetina. Klorogensko kislino je vseboval samo vzorec L20, naringenin pa le vzorca L16 in L18. Flavonoid luteolin je bil prisoten v štirih vzorcih lipovega medu. Sedem vzorcev je vsebovalo elaginsko kislino, od 81 do 359 µg/kg. Vsi analizirani vzorci lipovega medu so vsebovali kavno in *p*-kumarno kislino. Kavne kisline je bilo v lipovem medu od 1257 do 3075 µg/kg, *p*-kumarne pa od 1783 do 3396 µg/kg.

Največ flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa, kot so pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin, je vseboval vzorec L26, od 634 µg/kg (galangin) do 1317 µg/kg (krizin), nekaj manj vzorec L14. Ostali vzorci lipovega medu so vsebovali te flavonoide v manjših količinah, najmanj vzorec L16, le od 31 µg/kg (galangin) do 109 µg/kg (krizin).

Preglednica 10: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline (µg/kg) v analiziranih vzorcih lipovega medu

Table 10: Phenolics and abscisic acid content (µg/kg) of the analysed lime honey samples

| Spojina (µg/kg) | Vzorec | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | L3 | L9 | L12 | L13 | L14 | L16 | L18 | L19 | L20 | L26 |
| klorogenska k. | | | | | | | | | 94 | |
| kavna k. | 3075 | 2545 | 2779 | 2717 | 2015 | 2468 | 2110 | 2136 | 1257 | 2117 |
| <i>p</i> -kumarna k. | 3396 | 1828 | 1868 | 1956 | 2129 | 2988 | 2479 | 1783 | 2242 | 2782 |
| elaginska k. | 359 | 192 | 87 | 106 | | 131 | 192 | | | 81 |
| miricetin | | | | | | | | | | |
| luteolin | 31 | | | | | 23 | 33 | 106 | | |
| kvercetin | 284 | 330 | 284 | 195 | 209 | 220 | 275 | 470 | 283 | 300 |
| naringenin | | | | | | 58 | 61 | | | |
| apigenin | 89 | 49 | 63 | 88 | 97 | 75 | 80 | 87 | 381 | 185 |
| kamferol | 277 | 275 | 277 | 227 | 267 | 256 | 296 | 294 | 359 | 317 |
| pinocembrin | 319 | 504 | 323 | 535 | 764 | 49 | 379 | 445 | 158 | 1217 |
| krizin | 438 | 858 | 440 | 996 | 1233 | 109 | 545 | 643 | 205 | 1317 |
| galangin | 130 | 226 | 138 | 373 | 478 | 31 | 183 | 238 | 104 | 634 |
| ABA2 | 3115 | 2379 | 2699 | 2799 | 1886 | 2673 | 3478 | 4211 | 1998 | 3431 |
| cimetetna k.* | 722 | 385 | 649 | 1127 | 449 | 1984 | 1056 | 786 | 757 | 938 |
| β -fenilmlečna k* | 1468 | 773 | 1420 | 2545 | 912 | 4316 | 2265 | 1917 | 1769 | 2011 |
| tricetin* | | | | | | | | | | |
| fisetin* | 115 | 264 | 305 | 250 | 1366 | 19 | 433 | 264 | | 2117 |
| pinobanksin* | 348 | 460 | 316 | 804 | 1027 | 68 | 405 | 637 | 336 | 1290 |
| izoramnetin* | 452 | 692 | 429 | 319 | | 249 | 373 | 371 | 481 | 481 |
| pinostrobin* | 47 | 65 | 55 | 128 | 230 | 129 | 172 | 206 | 98 | 600 |
| eriodiktiol* | 752 | 575 | 481 | 1203 | 475 | 721 | 489 | 572 | 250 | 900 |
| ABA1* | 982 | 513 | 607 | 633 | 628 | 743 | 922 | 1111 | 390 | 863 |

*domnevna identifikacija

Vsebnost apigenina je bila največja v vzorcu L20, in sicer 381 µg/kg, sledi L26 s 185 µg/kg, v vseh ostalih vzorcih pa je bila vsebnost apigenina pod 100 µg/kg. Vsebnosti kamferola v analiziranih vzorcih lipovega medu so bile podobne kot pri akacijevem medu in so znašale od 227 do 359 µg/kg medu. Vsebnosti kvercetina pa so se gibale od 195 do 470 µg/kg.

Vsi analizirani vzorci lipovega medu so vsebovali tudi cimetno in β -fenilmlečno kislino ter flavonoide fisetin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol. Te spojine smo samo domnevno identificirali na podlagi molskih mas oz. njihovih m/z vrednosti in razpoložljivih podatkov iz literature, ker zanje nismo imeli ustreznih standardnih spojin. V vzorcih sta bili prisotni tudi obe izomeri abscizinske kisline. Vsebnosti so podane v preglednici 10. HPLC/MS kromatogram vzorca L26 je prikazan v prilogi B7.

4.3.4 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v cvetličnem medu

Vsebnosti nekaterih fenolnih kislin, flavonoidov in abscizinske kisline v analiziranih vzorcih cvetličnega medu so podane v preglednici 11, iz katere je razvidno, da rezultati zelo variirajo. To smo pričakovali, saj cvetlični med ne spada med vrstne medove, ampak gre za mešan med. Vsi analizirani vzorci cvetličnega medu so vsebovali *p*-kumarno, cimetno in β -fenilmlečno kislino ter flavonoide kvercetin, apigenin, kamferol, pinocembrin, krizin, galangin, pinobanksin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol kot tudi ABA1 in ABA2. Kavne kisline ni vseboval le vzorec C20.

Vzorec C22 je vseboval zelo nizke koncentracije flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa, le 32 µg pinocembrina, 51 µg krizina, 18 µg galangina in 57 µg pinobanksina v kg medu. Nasprotno pa smo v tem vzorcu določili ekstremno visoke vsebnosti cimetne in β -fenilmlečne kisline v primerjavi z ostalimi vzorci cvetličnega medu, kar 8178 oz. 16813 µg/kg.

Ostale spojine, kot so klorogenska in elaginska kislina, ter flavonoidi miricetin, luteolin in naringenin, niso bile prisotne v vseh analiziranih vzorcih. Nobeden izmed vzorcev cvetličnega medu, ki je nektarnega izvora, ni vseboval domnevno identificiranega flavonoida tricetina. HPLC/MS kromatogram vzorca C6 je prikazan v prilogi B8.

Preglednica 11: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih cvetličnega medu

Table 11: Phenolics and abscisic acid content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of the analysed multifloral honey samples

| Spojina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Vzorec | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|
| | C1 | C4 | C6 | C12 | C13 | C20 | C21 | C22 | C24 | C29 |
| klorogenska k. | | 94 | | 268 | 918 | | 77 | | 108 | |
| kavna k. | 1277 | 570 | 854 | 367 | 940 | | 330 | 475 | 396 | 936 |
| p-kumarna k. | 2473 | 1956 | 1327 | 2417 | 4534 | 4931 | 2740 | 1511 | 2173 | 1928 |
| elaginska k. | | 875 | 993 | | 515 | | | 131 | 136 | 928 |
| miricetin | | | 43 | | 44 | | 15 | 47 | 34 | |
| luteolin | | | | | 116 | | 27 | 34 | 29 | 46 |
| kvercetin | 436 | 401 | 348 | 251 | 392 | 357 | 231 | 304 | 233 | 361 |
| naringenin | | | 76 | | 119 | | 152 | 175 | 125 | |
| apigenin | 133 | 119 | 165 | 242 | 396 | 223 | 390 | 308 | 363 | 170 |
| kamferol | 622 | 355 | 397 | 280 | 460 | 348 | 273 | 351 | 276 | 400 |
| pinocembrin | 634 | 389 | 764 | 158 | 547 | 1032 | 90 | 32 | 68 | 951 |
| krizin | 1091 | 599 | 879 | 203 | 653 | 855 | 139 | 51 | 87 | 818 |
| galangin | 278 | 154 | 324 | 81 | 457 | 479 | 51 | 18 | 48 | 392 |
| ABA2 | 1482 | 904 | 5284 | 1403 | 5795 | 2508 | 1116 | 1764 | 937 | 945 |
| cimetna k.* | 513 | 273 | 3560 | 247 | 965 | 766 | 522 | 8178 | 2490 | 2185 |
| β -fenilmlečna k* | 1150 | 555 | 6843 | 477 | 1872 | 1770 | 1629 | 16813 | 5941 | 3396 |
| tricetin* | | | | | | | | | | |
| fisetin* | 510 | 206 | 509 | 69 | 750 | 1414 | | | 57 | 892 |
| pinobanksin* | 775 | 492 | 1110 | 297 | 1182 | 1047 | 167 | 57 | 125 | 1354 |
| izoramnetin* | 924 | 401 | 687 | 364 | 686 | 625 | 453 | 513 | 473 | 618 |
| pinostrobin* | 36 | 23 | 67 | 90 | 214 | 604 | 85 | 49 | 110 | 86 |
| eriodiktiol* | 666 | 777 | 494 | 226 | 358 | 600 | 286 | 280 | 299 | 383 |
| ABA1* | 1679 | 312 | 2891 | 303 | 1868 | 672 | 196 | 401 | 195 | 217 |

*domnevna identifikacija

4.3.5 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v kostanjevem medu

Preglednica 12 prikazuje fenolni profil desetih vzorcev kostanjevega medu. Vsi vzorci so vsebovali p-kumarno, cimetno in β -fenilmlečno kislino. V vseh vzorcih kostanjevega medu smo identificirali tudi kavno kislino, vendar je nismo kvantitativno določili.

Apigenin, kamferol, eriodiktiol in flavonoide, ki izvirajo iz propolisa so vsebovali vsi analizirani vzorci. Klorogenska in elaginska kislina ter flavonoidi miricetin, luteolin, kvercetin, pinostrobin in tricetin so bili prisotni le v nekaterih vzorcih, medtem ko naringenina v analiziranih vzorcih kostanjevega medu ni bilo. Vsi vzorci so vsebovali tudi abscizinsko kislino, vendar je bilo predvsem ABA2 znatno manj, kot v akacijevem, lipovem in cvetličnem medu. HPLC/MS kromatogram vzorca K36 je prikazan v prilogi B9.

Preglednica 12: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih kostanjevega medu

Table 12: Phenolics and abscisic acid content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of the analysed chestnut honey samples

| Spojina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Vzorec | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | K2 | K3 | K5 | K7 | K9 | K27 | K29 | K30 | K36 | K40 |
| klorogenska k. | 210 | 252 | | 149 | | | | | | |
| kavna k. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| p-kumarna k. | 1159 | 1446 | 1686 | 1988 | 1753 | 1472 | 1922 | 871 | 937 | 1045 |
| elaginska k. | | 271 | | 126 | 76 | 313 | 173 | | 258 | |
| miricetin | 14 | | | 22 | | | | | | |
| luteolin | | 38 | | 25 | | | 13 | | 42 | |
| kvercetin | 218 | 266 | | 352 | | | 203 | | 213 | 127 |
| naringenin | | | | | | | | | | |
| apigenin | 552 | 315 | 68 | 383 | 91 | 42 | 113 | 15 | 109 | 28 |
| kamferol | 223 | 238 | 166 | 251 | 154 | 128 | 200 | 179 | 232 | 158 |
| pinocembrin | 193 | 72 | 130 | 163 | 251 | 145 | 101 | 25 | 274 | 32 |
| krizin | 260 | 172 | 450 | 360 | 413 | 376 | 242 | 40 | 388 | 74 |
| galangin | 97 | 41 | 112 | 86 | 143 | 74 | 51 | 10 | 192 | 17 |
| ABA2 | 151 | 512 | 398 | 709 | 288 | 380 | 292 | 272 | 495 | 216 |
| cimetna k.* | 734 | 2453 | 354 | 1397 | 359 | 376 | 1218 | 651 | 2808 | 399 |
| β -fenilmlečna k* | 1215 | 4652 | 422 | 2346 | 528 | 674 | 2095 | 1019 | 4751 | 600 |
| tricetin* | | 291 | 187 | | 117 | 238 | | 1094 | | 469 |
| fisetin* | 219 | | 397 | 95 | 1241 | 1049 | 24 | 31 | 966 | 22 |
| pinobanksin* | 281 | 111 | 1213 | 206 | 265 | 145 | 117 | 23 | 409 | 39 |
| izoramnetin* | 506 | 360 | | 756 | 172 | | 402 | 276 | 382 | 305 |
| pinostrobin* | | | | | | 15 | 33 | | 23 | 19 |
| eriodiktiol* | 462 | 1137 | 1862 | 948 | 856 | 1955 | 962 | 1223 | 847 | 814 |
| ABA1* | 80 | 152 | 134 | 264 | 78 | 165 | 158 | 154 | 263 | 103 |

*domnevna identifikacija

+: spojino smo samo identificirali

4.3.6 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v smrekovem medu

V preglednici 13 je prikazana vsebnost nekaterih fenolnih kislin, flavonoidov in abscizinske kisline v vzorcih slovenskega smrekovega medu. Vsi vzorci so vsebovali flavonoide, ki izvirajo iz propolisa. Glede vsebnosti le-teh izstopa vzorec S27, kjer je bila vsebnost pinocembrina, pinobanksina, krizina in galangina občutno višja kot v ostalih vzorcih, kar kaže na večjo prisotnost propolisa v tem vzorcu medu v primerjavi z ostalimi vzorci smrekovega medu.

Od fenolnih kislin so vsi vzorci vsebovali p-kumarno, kavno, cimetno in β -fenilmlečno kislino. Klorogenske kisline ni vseboval samo vzorec S29, elaginska kislina je bila prisotna v šestih vzorcih.

Flavonoidi luteolin, kvercetin, apigenin, kamferol, tricetin, izoramnetin in eriodiktiol so bili prisotni v vseh vzorcih, vsebnosti za posamezne flavonoide so precej variirale.

Miricetin je vsebovalo 7 vzorcev smrekovega medu, vsebnosti so bile zelo majhne, od 13 do 30 µg/kg. Naringenin smo identificirali v osmih vzorcih, pinostrobin pa v sedmih. Vsebnosti teh dveh flavonoidov so se gibale v območju od 13 do 168 µg/kg. V dveh vzorcih smrekovega nismo določili flavonoida fisetina, v preostalih vzorcih pa so bile določene vsebnosti fisetina zelo variabilne, od 29 do 1472 µg/kg.

Preglednica 13: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline (µg/kg) v analiziranih vzorcih smrekovega medu

Table 13: Phenolics and abscisic acid content (µg/kg) of the analysed spruce honey samples

| Spojina (µg/kg) | Vzorec | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | S18 | S20 | S22 | S25 | S26 | S27 | S28 | S29 | S30 | S31 |
| klorogenska k. | 206 | 179 | 260 | 178 | 177 | 219 | 189 | | 167 | 215 |
| kavna k. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| p-kumarna k. | 1162 | 936 | 1483 | 2496 | 2119 | 2124 | 2385 | 2669 | 3104 | 630 |
| elaginska k. | 69 | 164 | 156 | | | 159 | | 424 | | 103 |
| miricetin | 19 | 13 | 17 | 30 | 17 | 22 | | 20 | | |
| luteolin | 46 | 28 | 63 | 103 | 30 | 126 | 49 | 37 | 47 | 25 |
| kvercetin | 416 | 292 | 271 | 458 | 679 | 559 | 227 | 450 | 465 | 493 |
| naringenin | | 32 | 53 | 108 | 90 | | 110 | 110 | 168 | 44 |
| apigenin | 71 | 131 | 161 | 222 | 239 | 439 | 103 | 245 | 203 | 134 |
| kamferol | 310 | 240 | 309 | 317 | 293 | 530 | 399 | 417 | 389 | 350 |
| pinocembrin | 357 | 143 | 105 | 167 | 168 | 1990 | 120 | 433 | 159 | 134 |
| krizin | 511 | 209 | 137 | 217 | 264 | 1276 | 189 | 425 | 218 | 219 |
| galangin | 191 | 56 | 59 | 90 | 91 | 654 | 71 | 260 | 103 | 72 |
| ABA2 | 647 | 688 | 399 | 460 | 544 | 1782 | 23664 | 1957 | 942 | 857 |
| cimetna k.* | 2307 | 1970 | 1023 | 1482 | 1411 | 1554 | 1022 | 1214 | 1111 | 1986 |
| β-fenilmlečna k* | 4368 | 3897 | 1742 | 2473 | 2584 | 3039 | 1929 | 2245 | 2499 | 3919 |
| tricetin* | 1086 | 1025 | 533 | 2635 | 3074 | 1230 | 440 | 406 | 2102 | 2237 |
| fisetin* | 60 | 55 | 33 | | 145 | 1472 | 29 | 561 | 123 | |
| pinobanksin* | 536 | 191 | 232 | 304 | 306 | 2199 | 195 | 621 | 324 | 235 |
| izoramnetin* | 539 | 552 | 355 | 353 | 584 | 653 | 301 | 641 | 457 | 317 |
| pinostrobin* | | | 13 | 20 | 19 | 132 | 52 | 50 | 109 | |
| eriodiktiol* | 853 | 570 | 281 | 674 | 1025 | 765 | 416 | 568 | 494 | 1371 |
| ABA1* | 246 | 252 | 146 | 279 | 247 | 714 | 8523 | 654 | 391 | 442 |

*domnevna identifikacija

+: spojino smo samo identificirali

Abscizinsko kislino smo identificirali in kvantitativno določili v vseh vzorcih. Vzorec S28 je vseboval izredno veliko ABA1 in ABA2 v primerjavi z drugimi vzorci smrekovega medu, 8523 oz. 23664 µg/kg. V ostalih vzorcih smrekovega medu so se vsebnosti ABA1 gibale od 146 do 714 µg/kg, medtem ko je bilo ABA2 od 399 do 1957 µg/kg medu. HPLC/MS kromatogram vzorca S27 je prikazan v prilogi B10.

4.3.7 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v hojevem medu

Kot je razvidno iz preglednice 14, so vsi vzorci hojevega medu vsebovali *p*-kumarno, kavno, cimetno in β -fenilmlečno kislino. Klorogenska in elaginska kislina sta bili prisotni v treh oz. štirih vzorcih hojevega medu.

Preglednica 14: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih hojevega medu

Table 14: Phenolics and abscisic acid content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of the analysed fir honey samples

| Spojina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Vzorec | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | H1 | H4 | H10 | H12 | H13 | H19 | H23 | H24 | H25 | H27 |
| klorogenska k. | 304 | 385 | | 206 | | | | | | |
| kavna k. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>p</i> -kumarna k. | 700 | 1502 | 788 | 236 | 990 | 1705 | 1664 | 1058 | 919 | 1485 |
| elaginska k. | 112 | 341 | 291 | | 123 | | | | | |
| miricetin | 12 | | 11 | | | | 17 | | | |
| luteolin | 51 | 112 | 145 | | | 126 | 14 | 14 | | 10 |
| kvercetin | 412 | 569 | 491 | | 389 | 537 | 878 | 732 | 700 | 651 |
| naringenin | 58 | 86 | | | | | 87 | 49 | | 45 |
| apigenin | 587 | 302 | 111 | 46 | 24 | 269 | 169 | 164 | 109 | 150 |
| kamferol | 267 | 292 | 265 | 215 | 184 | 347 | 190 | 215 | 155 | 309 |
| pinocembrin | 76 | 65 | 319 | 206 | 59 | 443 | 82 | 273 | 120 | 261 |
| krizin | 144 | 99 | 465 | 295 | 88 | 388 | 111 | 296 | 142 | 274 |
| galangin | 41 | 35 | 113 | 69 | 29 | 191 | 42 | 189 | 66 | 157 |
| ABA2 | 500 | 622 | 563 | 343 | 382 | 834 | 335 | 429 | 211 | 702 |
| cimetna k.* | 3006 | 1771 | 971 | 2118 | 744 | 2408 | 2175 | 2047 | 1937 | 1437 |
| β -fenilmlečna k* | 5058 | 3152 | 1748 | 3605 | 1231 | 4588 | 4094 | 3910 | 4348 | 2653 |
| tricetin* | 2006 | 3281 | 2776 | 3421 | 2550 | 3361 | 3802 | 3607 | 2994 | 3005 |
| fisetin* | | | 241 | 90 | | 282 | 34 | 366 | 148 | 478 |
| pinobanksin* | 162 | 95 | 382 | 206 | 81 | 411 | 125 | 536 | 218 | 430 |
| izoramnetin* | 286 | 237 | 334 | 298 | 376 | 210 | 379 | 338 | 250 | 316 |
| pinostrobin* | | | 19 | 29 | 31 | | 258 | 77 | 69 | 47 |
| eriodiktiol* | 267 | 260 | 303 | 275 | 442 | 516 | 492 | 553 | 310 | 261 |
| ABA1* | 141 | 268 | 266 | 150 | 138 | 468 | 115 | 194 | 99 | 176 |

*domnevna identifikacija

+: spojino smo samo identificirali

Vsi vzorci so vsebovali pinocembrin, pinobanksin, krizin, galangin, apigenin, kamferol, tricetin, izoramnetin, eriodiktiol in abscizinsko kislino. Vsebnosti so precej varirale. Kvercetina nismo določili v vzorcu H12. Le trije vzorci so vsebovali miricetin, vsebnosti so bile zelo majhne, od 11 do 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Luteolin, naringenin, fisetin in pinostrobin smo določili le v nekaterih vzorcih hojevega medu. HPLC/MS kromatogram vzorca H10 je prikazan v prilogi B12.

4.3.8 Vsebnost posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v gozdnem medu

Preglednica 15 prikazuje fenolni profil desetih vzorcev gozdnega medu. Od fenolnih kislin so vsi vzorci vsebovali *p*-kumarno, kavno, cimetno in β -fenilmlečno kislino. Elaginske kisline ni vseboval samo vzorec G24, klorogensko kislino smo določili v štirih vzorcih gozdnega medu.

Vzorca G9 in G15 sta vsebovala zelo malo flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa, vsebnosti pinocembrina, pinobanksina, krizina in galangina so bile nižje od 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ta dva vzorca gozdnega medu nista vsebovala domnevno identificiranega flavonoida fisetina. V preostalih vzorcih gozdnega medu je bilo več teh flavonoidov, največ v vzorcu G12.

Vsi vzorci so vsebovali apigenin, kamferol, kvercetin, tricetin, izoramnetin, eriodiktiol in abscizinsko kislino. Luteolin, miricetin, naringenin in pinostrobin smo določili le v nekaterih vzorcih gozdnega medu. HPLC/MS kromatogram vzorca G12 je prikazan v prilogi B13.

Preglednica 15: Vsebnost posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) v analiziranih vzorcih gozdnega medu

Table 15: Phenolics and abscisic acid content ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of the analysed forest honey samples

| Spojina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Vzorec | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | G5 | G9 | G12 | G13 | G15 | G18 | G20 | G23 | G24 | G25 |
| klorogenska k. | | | | 79 | 316 | | | 210 | | 123 |
| kavna k. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>p</i> -kumarna k. | 2903 | 965 | 857 | 509 | 3066 | 1535 | 583 | 721 | 1493 | 1057 |
| elaginska k. | 112 | 217 | 315 | 145 | 272 | 117 | 125 | 166 | | 131 |
| miricetin | | | 29 | | 22 | | 26 | | 15 | |
| luteolin | 21 | 19 | | 16 | 33 | | 19 | | 31 | 15 |
| kvercetin | 296 | 218 | 459 | 222 | 252 | 303 | 264 | 266 | 221 | 217 |
| naringenin | 82 | 74 | | | 109 | 36 | 33 | 32 | | 34 |
| apigenin | 103 | 47 | 243 | 70 | 119 | 48 | 85 | 75 | 275 | 75 |
| kamferol | 115 | 261 | 377 | 282 | 254 | 208 | 236 | 242 | 285 | 252 |
| pinocembrin | 187 | 38 | 843 | 249 | 42 | 137 | 201 | 311 | 398 | 213 |
| krizin | 314 | 61 | 940 | 410 | 56 | 199 | 299 | 382 | 463 | 309 |
| galangin | 95 | 20 | 472 | 135 | 29 | 88 | 98 | 122 | 314 | 156 |
| ABA2 | 2724 | 2550 | 1485 | 690 | 853 | 1021 | 414 | 486 | 875 | 339 |
| cimetna k.* | 1056 | 1015 | 1208 | 781 | 630 | 858 | 1214 | 738 | 1073 | 667 |
| β -fenilmlečna k* | 1988 | 1778 | 2158 | 1383 | 1095 | 1620 | 2083 | 1199 | 1804 | 1090 |
| tricetin* | 1532 | 667 | 1759 | 736 | 478 | 1190 | 723 | 995 | 582 | 656 |
| fisetin* | 178 | | 1467 | 184 | | 104 | 280 | 187 | 484 | 168 |
| pinobanksin* | 247 | 72 | 1431 | 356 | 78 | 265 | 306 | 408 | 900 | 519 |
| izoramnetin* | 112 | 223 | 319 | 403 | 408 | 352 | 394 | 236 | 264 | 268 |
| pinostrobin* | 11 | | | 22 | 20 | 32 | 37 | 62 | 52 | 27 |
| eriodiktiol* | 706 | 425 | 493 | 338 | 342 | 1080 | 209 | 205 | 235 | 403 |
| ABA1* | 1058 | 873 | 690 | 308 | 268 | 302 | 182 | 142 | 305 | 159 |

*domnevna identifikacija

+: spojino smo samo identificirali

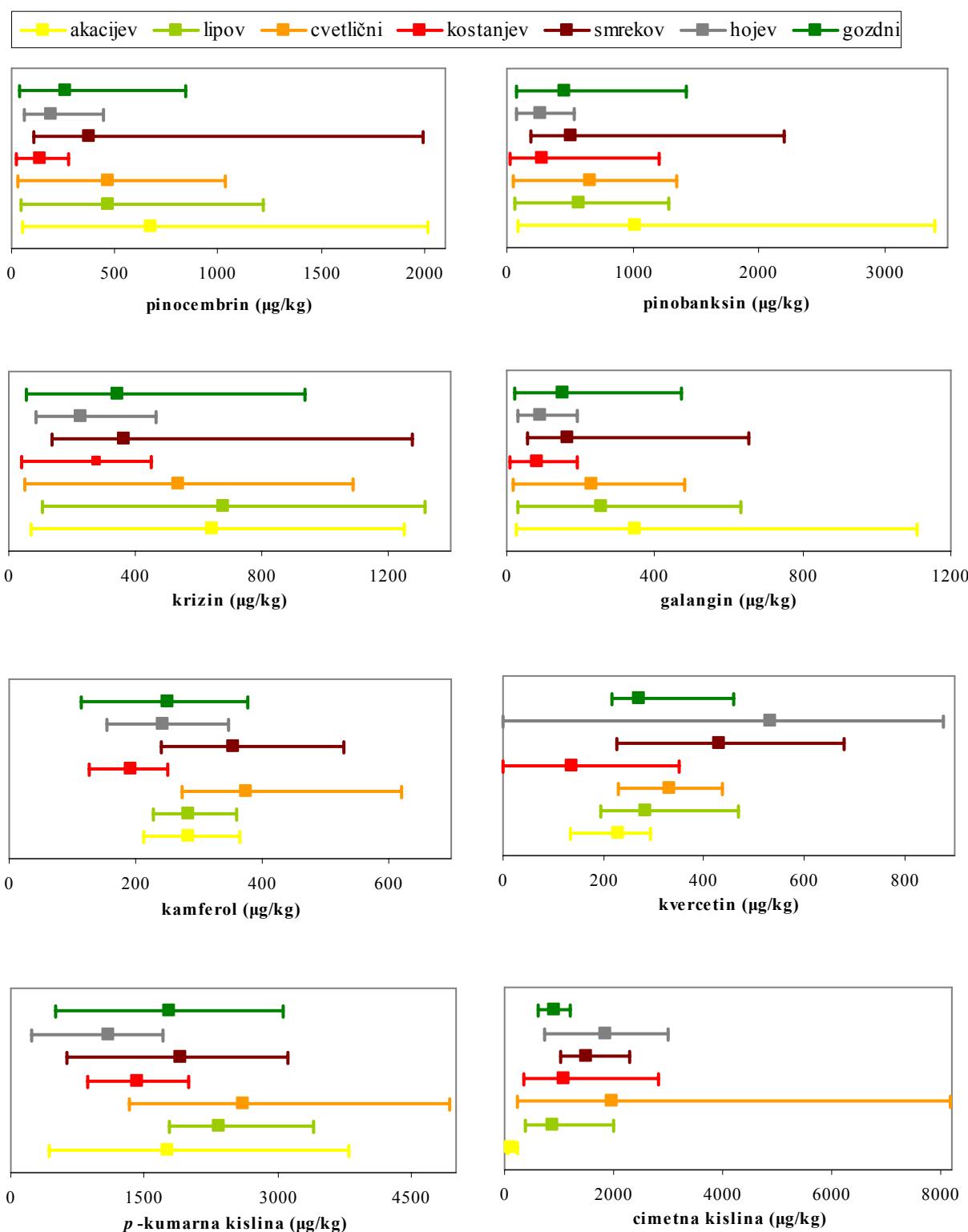
4.3.9 Primerjava vsebnosti posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline v različnih vrstah medu in prisotnost morebitnih markerjev za ugotavljanje botaničnega porekla medu

Iz rezultatov, podanih v preglednicah 9 – 15 in na sliki 17, je razvidno da analizirani vzorci slovenskih vrst medu kažejo zelo visoko variabilnost v vsebnosti posameznih fenolnih spojin in abscizinske kisline. Razlike so vidne med različnimi vrstami medu kot tudi znotraj iste vrste. Statistična obdelava je pokazala, da nekateri rezultati predstavljajo osamelce oz. ekstreme, vendar jih ne moremo izločiti, ker je bilo analiziranih le 10 vzorcev vsake vrste medu. Število vzorcev je premajhno, da bi lahko delali zaključke saj, statistično gledano, rezultati ne predstavljajo celotne vrste. Do sedaj v Sloveniji še ni bilo podobne raziskave, zato tudi nimamo podatkov za morebitno primerjavo. Rezultati vsebnosti za določene spojine pri posameznih vrstah medu, ki zelo izstopajo so npr. vsebnost pinocembrina, pinobanksina, krizina, galangina in fisetina v vzorcih A18, S27 in G12, vsebnost cimetne in β -fenilmlečne kisline v vzorcu C22, vsebnost apigenina v vzorcih K2 in H1, vsebnost abscizinske kisline v vzorcih C6, C13 in S28.

Na sliki 17 je predstavljena primerjava vsebnosti pinocembrina, pinobanksina, krizina, galangina, kamferola, kvercetina, *p*-kumarne kisline in cimetne kisline. Podana so območja vsebnosti spojin (levi ročaj predstavlja minimalno, desni maksimalno vrednost), označene pa so tudi povprečne vrednosti (kvadratki) v posameznih vrstah medu. Zaradi velike variabilnosti rezultatov in majhnega števila analiziranih vzorcev povprečne vrednosti nimajo velikega pomena in so zgolj informativne narave. Vsi analizirani vzorci medu so vsebovali flavonoide, ki izvirajo iz propolisa, to so pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin. Največ teh flavonoidov so vsebovali svetlejši medovi, akacijev, lipov in cvetlični med, najmanjše vsebnosti smo določili v kostanjevem in hojevem medu. Največjo vsebnost pinocembrina, pinobanksina in galangina smo določili v vzorcu A18, največ krizina so vsebovali vzorci A18, S27 in L26 (1253 do 1317 µg/kg).

Flavonoid kamferol, ki izvira iz nektarja, je bil prisoten v vseh vzorcih, vsebnosti so bile večinoma v območju med 200 – 400 µg/kg. Največjo vsebnost smo določili v vzorcih C1 in S27, 622 oz. 530 µg/kg, cvetlični in smrekov med sta imela tudi največjo povprečno vsebnost kamferola, kar je razvidno s slike 17. Največ kvercetina je vseboval hojev med. V tej vrsti medu so vsebnosti kvercetina najbolj variirale, saj je interval segal od 0 do 878 µg/kg, sledi smrekov med. Vsebnosti kvercetina v akacijevem, lipovem, cvetličnem in gozdnem medu so si bile dokaj podobne, širje vzorci kostanjevega medu pa kvercetina niso vsebovali. Flavonoid apigenin so vsebovali vsi vzorci medu, največ ga je vseboval cvetlični med, ta vrsta medu je imela povprečno vsebnost apigenina 251 µg/kg, vsebnosti večje od 500 µg/kg pa smo določili v dveh vzorcih, K2 in H1. Flavonoidi miricetin, luteolin in naringenin so bili prisotni le v nekaterih analiziranih vzorcih medu, vsebnosti teh flavonoidov v medu pa so bile relativno nizke. Iz rezultatov je še razvidno, da akacijev in lipov med nista vsebovala flavonoida miricetina, medtem ko kostanjev med ni vseboval naringenina.

V večini analiziranih vzorcev smo določili tudi flavonoide, ki smo jih domnevno identificirali na podlagi molskih mas in podatkov iz literature, kot fisetin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol, njihove vsebnosti so bile zelo variabilne. Tricetin, ki smo ga tudi samo domnevno identificirali, pa je bil prisoten le v smrekovem, hojevem in gozdnem medu ter v nekaterih vzorcih kostanjevega medu. Najvišje koncentracije so dosegli vzorci hojevega medu. Akacijev, lipov in cvetlični med tega flavonoida niso vsebovali.



Slika 17: Območja vsebnosti in povprečne vrednosti nekaterih fenolnih spojin v različnih vrstah medu

Figure 17: Ranges and average values of some phenolic compounds in different honey types

Od fenolnih kislin smo identificirali *p*-kumarno, kavno, klorogensko in elaginsko kislino, domnevno pa smo identificirali še cimetno in β -fenilmlečno kislino.

S slike 17 je razvidno, da so povprečne vsebnosti *p*-kumarne kisline od 1105 µg/kg v hojevem medu do 2599 µg/kg v cvetličnem medu. Intervali vrednosti v vseh analiziranih vzorcih medu so za to fenolno kislino v območju med 236 in 4931 µg/kg.

Klorogensko in elaginsko kislino vsebujejo le nekateri vzorci posameznih vrst medu, medtem ko ju akacijev med nima.

Kavna kislina je bila prisotna v vseh vzorcih, razen enega vzorca cvetličnega medu (C20), kvantitativno pa smo jo določili le v svetlejših medovih, akacijevem, lipovem in cvetličnem. V akacijevem medu je bilo kavne kisline malo, od 106 do 616 µg/kg, medtem ko so v lipovem medu vrednosti variirale od 1257 do 3075 µg/kg. Zaradi slabe kromatografske ločbe kavne kisline nismo kvantitativno določili v temnejših vrstah medu, kostanjevem, smrekovem, hojevem in gozdnem medu.

Cimetna in β -fenilmlečna kislina sta bili v vseh vrstah medu, najmanj ju je vseboval akacijev med. Največ so ju vsebovali vzorci hojevega, smrekovega in cvetličnega medu, izstopal pa je vzorec C22, ki je vseboval ekstremne vrednosti teh kislin, 8178 µg/kg cimetne in 16813 µg/kg β -fenilmlečne kisline. β -fenilmlečne kisline je bilo v analiziranih vzorcih medu približno dvakrat toliko kot cimetne kisline, koeficient korelacije med temi kislinama je bil zelo visok, znašal je 0,991.

V vseh analiziranih vzorcih medu smo identificirali tudi dve izomeri abscizinske kisline, ABA1 – *trans-trans* abscizinska kislina in ABA2 – *cis-trans* abscizinska kislina. ABA spada med rastlinske hormone, je neflavonoidna komponenta, ki služi za zaščito rastline v času suše in drugih sprememb v okolju. Vsi analizirani vzorci so vsebovali več *cis-trans* abscizinske kisline (ABA2), izjema je le vzorec cvetličnega medu C1 s 1679 µg/kg ABA1 in 1482 µg/kg ABA2. Če primerjamo vsebnost abscizinske kisline po vrstah medu, jo je bilo najmanj v kostanjevem in hojevem medu, največ pa v lipovem in smrekovem medu. V vzorcu smrekovega medu (vzorec S27) smo določili ekstremno visoke vsebnosti ABA1 in ABA2 (8523 in 23664 µg/kg) v primerjavi z ostalimi vzorci različnih vrst medu. Koeficient korelacije med obema izomerama abscizinske kisline je bil zelo visok, znašal je 0,975.

4.4 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI MEDU

Antioksidativno učinkovitost vzorcev različnih vrst slovenskega medu smo določali z dvema metodama, DPPH in FRAP metodo.

DPPH metoda s stabilnim organskim radikalom 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom se uporablja za določanje sposobnosti lovljenja radikalov, rezultate smo izrazili kot koncentracijo učinkovitosti – IC_{50} , ki je definirana kot koncentracija antioksidanta, potrebna za 50 % zmanjšanje absorbance radikala DPPH[•]. Ker se z večanjem AU zmanjšuje vrednost IC_{50} , kar je nerodno pri grafični predstavitevi rezultatov, smo rezultate podali tudi v obliki $1/IC_{50}$. Iz preglednice 16 je razvidno, da sta bila najmanj učinkovita akacijev in lipov med, s povprečnima koncentracijama učinkovitosti 56,8 oz. 25,6 mg/mL. Sledi cvetlični med, katerega povprečna IC_{50} je bila 17,1 mg/mL in kostanjev med s povprečno vrednostjo 11,6 mg/mL. Najnižje povprečne vrednosti IC_{50} (8,2 do 9,0 mg/mL) so imeli hojev, smrekov in gozdni med, kar pomeni, da je bila njihova antioksidativna učinkovitost največja.

Preglednica 16: IC_{50} , $1/IC_{50}$ in FRAP vrednosti v različnih vrstah medu

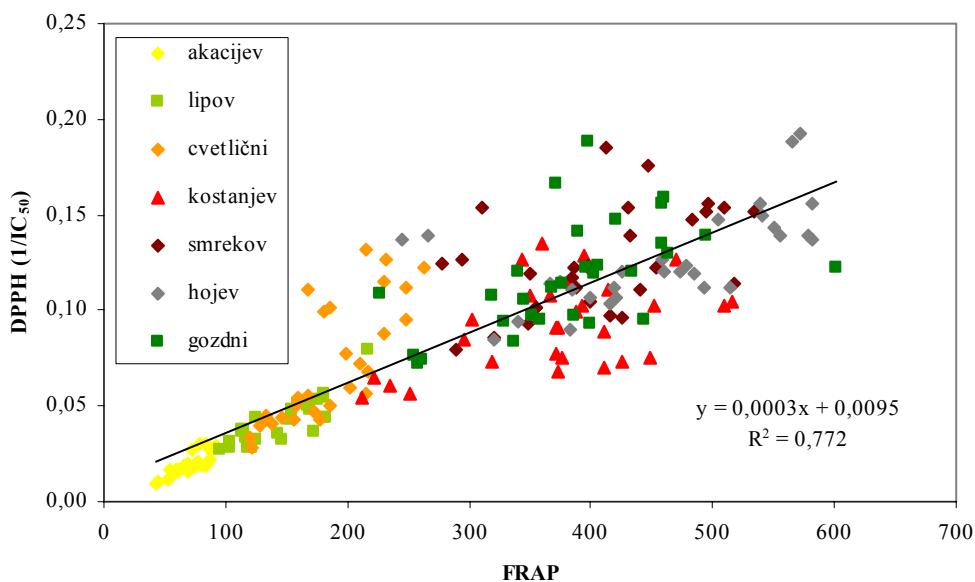
Table 16: IC_{50} , $1/IC_{50}$ and FRAP values in different honey types

| Vrsta medu | n | Statistični parameter | DPPH metoda | | FRAP metoda ($\mu\text{M Fe(II)}$) |
|------------|----|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| | | | IC_{50} (mg/mL) | $1/IC_{50}$ (mg/mL) ⁻¹ | |
| akacijev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | $56,8 \pm 17,9$ | $0,019 \pm 0,005$ | $69,6 \pm 12,7$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $32,7 - 111,2$ | $0,009 - 0,031$ | $43,2 - 91,4$ |
| lipov | 28 | $\bar{x} \pm SD$ | $25,6 \pm 6,4$ | $0,042 \pm 0,012$ | $145,1 \pm 32,1$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $12,6 - 36,1$ | $0,028 - 0,079$ | $94,6 - 217,2$ |
| cvetlični | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | $17,1 \pm 7,4$ | $0,071 \pm 0,032$ | $184,1 \pm 41,4$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $7,6 - 35,5$ | $0,028 - 0,132$ | $119,5 - 262,9$ |
| kostanjev | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | $11,6 \pm 3,0$ | $0,092 \pm 0,023$ | $370,2 \pm 77,0$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $7,4 - 18,3$ | $0,055 - 0,135$ | $212,7 - 515,6$ |
| smrekov | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | $8,3 \pm 1,8$ | $0,126 \pm 0,027$ | $405,1 \pm 70,9$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $5,4 - 12,6$ | $0,079 - 0,185$ | $277,5 - 534,0$ |
| hojev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | $8,2 \pm 1,6$ | $0,127 \pm 0,025$ | $456,4 \pm 94,6$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $5,2 - 11,8$ | $0,085 - 0,192$ | $244,6 - 582,2$ |
| gozdni | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | $9,0 \pm 2,2$ | $0,117 \pm 0,028$ | $383,7 \pm 78,6$ |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | $5,3 - 13,8$ | $0,072 - 0,189$ | $227,5 - 602,2$ |

n: število vzorcev, \bar{x} : povprečna vrednost, SD: standardni odklon, x_{\min} : minimalna vrednost, x_{\max} : maksimalna vrednost

FRAP metoda je enostavna spektrofotometrična metoda, ki se zelo pogosto uporablja za določanje antioksidativne učinkovitosti različnih živil, tudi medu. Kot je razvidno iz preglednice 16, je AU medov precej variirala, povprečne FRAP vrednosti so naraščale v naslednjem vrstnem redu: akacijev < lipov < cvetlični < kostanjev < gozdni < smrekov < hojev med. Akacijev med je imel povprečno FRAP vrednost 69,6 $\mu\text{M Fe(II)}$, medtem ko smo najvišjo FRAP vrednost izmerili v hojevem medu, povprečje je znašalo 456,4 $\mu\text{M Fe(II)}$ za 10 % raztopino medu.

DPPH in FRAP metoda temeljita na različnih principih, zato nas je zanimalo, če je možno primerjati obe metodi. Zveza med uporabljenima metodama za določanje antioksidativne učinkovitosti medu je prikazana na sliki 18, koeficient determinacije je znašal 0,772, koeficient korelacije pa 0,878.



Slika 18: Primerjava DPPH in FRAP metode

Figure 18: Comparison between the DPPH and FRAP method

4.5 VPLIV SKLADIŠČENJA MEDU NA VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN IN ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST

Ker medu običajno ne uživamo popolnoma svežega, ampak šele nekaj časa po pridobivanju, smo na nekaterih vzorcih medu spremljali vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost, izmerjeno s FRAP metodo, tudi po določenem času skladiščenja. Izbrali smo 56 vzorcev medu letnika 2004 (8 vzorcev vsake vrste), jih hranili eno leto v temi pri sobni temperaturi in jih nato ponovno analizirali. Rezultati so podani v preglednici 17. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin v večini analiziranih vzorcev medu med enoletnim skladiščenjem ni bistveno zmanjšala, odstotek zmanjšanja je znašal od 0,3 do 10,7 % (povprečno 3,5 %). V devetih vzorcih pa je bila vsebnost skupnih fenolnih spojin po enem letu skladiščenja celo večja, vendar je bil odstotek povečanja minimalen, od 0,1 do 2,0 % (povprečno 0,5 %).

Antioksidativna učinkovitost medu je bila po enoletnjem skladiščenju v vseh vzorcih medu večja od začetne vrednosti, kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji. Odstotek povečanja je znašal od 3,3 do 12,8 % (povprečno 7,4 %). Povečanje AU je bilo različno za posamezne vrste medu, saj se je AU, določena s FRAP metodo, najmanj povečala v cvetličnem in smrekovem medu, povprečno za 5,7 oz. 6,3 %. V ostalih vrstah medu je bil odstotek povečanja AU precej podoben in je znašal v povprečju od 7,7 % za vzorce gozdnega medu do 8,2 % za vzorce kostanjevega in hojevega medu.

Preglednica 17: Vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost (AU) svežih in eno leto starih vzorcev medu

Table 17: Total phenolic content and antioxidant activity (AU) of fresh and one year old honey samples

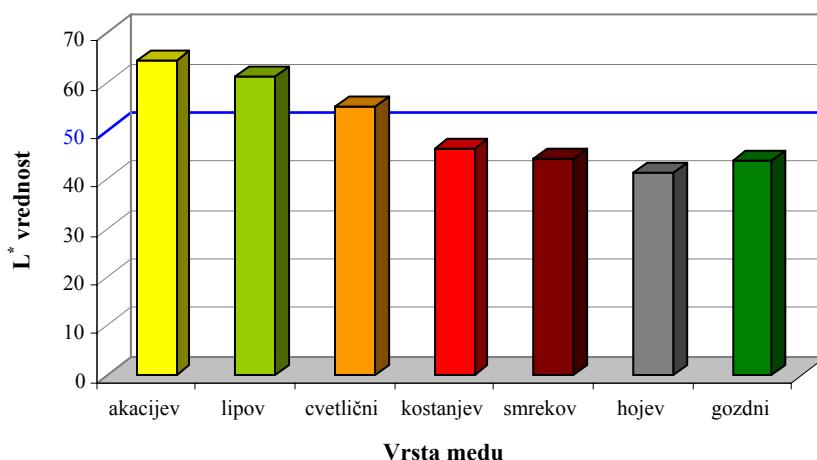
| Vrsta medu | Vzorec | Skupne fenolne spojine (mg _{GA} /kg medu) | | | AU (FRAP metoda) (µM Fe(II)) | | |
|------------|--------|--|-----------------------|----------|------------------------------|-----------------------|----------|
| | | sveži vzorci | eno leto stari vzorci | spr. (%) | sveži vzorci | eno leto stari vzorci | spr. (%) |
| akacijev | A1 | 55,7 | 50,4 | - 9,5 % | 67,8 | 73,3 | + 8,1 % |
| | A2 | 64,6 | 59,3 | - 8,2 % | 83,2 | 88,9 | + 6,9 % |
| | A3 | 49,0 | 47,1 | - 3,9 % | 83,3 | 90,2 | + 8,3 % |
| | A4 | 52,3 | 51,6 | - 1,3 % | 91,4 | 99,9 | + 9,3 % |
| | A8 | 35,7 | 33,8 | - 5,3 % | 65,7 | 71,0 | + 8,1 % |
| | A9 | 57,9 | 56,0 | - 3,3 % | 79,2 | 85,3 | + 7,7 % |
| | A14 | 67,9 | 62,7 | - 7,7 % | 74,1 | 78,9 | + 6,5 % |
| | A15 | 44,6 | 42,7 | - 4,3 % | 71,9 | 77,5 | + 7,8 % |
| | L1 | 82,3 | 79,3 | - 3,7 % | 118,9 | 131,3 | + 10,4 % |
| | L3 | 90,1 | 88,2 | - 2,1 % | 154,0 | 168,0 | + 9,1 % |
| | L9 | 101,2 | 94,9 | - 6,2 % | 113,0 | 121,3 | + 7,4 % |
| | L10 | 63,4 | 60,4 | - 4,7 % | 102,9 | 113,0 | + 9,8 % |
| | L12 | 73,4 | 72,7 | - 1,0 % | 104,1 | 110,7 | + 6,3 % |
| | L13 | 70,1 | 69,3 | - 1,1 % | 116,0 | 124,5 | + 7,3 % |
| | L14 | 84,6 | 83,8 | - 1,0 % | 114,1 | 120,8 | + 5,9 % |
| cvetlični | L15 | 109,0 | 106,0 | - 2,8 % | 155,1 | 166,8 | + 7,5 % |
| | C1 | 166,8 | 167,1 | + 0,2 % | 167,6 | 180,5 | + 7,7 % |
| | C3 | 151,2 | 147,1 | - 2,7 % | 230,7 | 251,0 | + 8,8 % |
| | C4 | 131,2 | 133,8 | + 2,0 % | 181,1 | 187,3 | + 3,4 % |
| | C6 | 194,6 | 194,9 | + 0,2 % | 248,7 | 266,2 | + 7,0 % |
| | C7 | 126,8 | 123,8 | - 2,4 % | 199,1 | 210,2 | + 5,6 % |
| | C8 | 159,0 | 153,8 | - 3,3 % | 247,5 | 258,0 | + 4,2 % |
| | C10 | 127,9 | 124,9 | - 2,4 % | 157,3 | 165,6 | + 5,3 % |
| | C13 | 150,1 | 148,2 | - 1,3 % | 209,5 | 216,5 | + 3,3 % |
| | K2 | 197,9 | 198,2 | + 0,2 % | 388,4 | 422,1 | + 8,7 % |
| | K3 | 187,9 | 183,8 | - 2,2 % | 383,7 | 425,4 | + 10,9 % |
| | K5 | 181,2 | 178,2 | - 1,7 % | 393,7 | 414,0 | + 5,2 % |
| | K7 | 196,8 | 191,6 | - 2,6 % | 350,5 | 378,6 | + 8,0 % |
| kostanjev | K8 | 200,1 | 198,2 | - 1,0 % | 392,6 | 427,2 | + 8,8 % |
| | K9 | 159,0 | 156,0 | - 1,9 % | 295,1 | 321,3 | + 8,9 % |
| | K10 | 201,2 | 202,7 | + 0,8 % | 343,3 | 373,7 | + 8,9 % |
| | K11 | 211,2 | 210,4 | - 0,4 % | 359,4 | 380,1 | + 5,8 % |
| | S1 | 237,9 | 238,2 | + 0,1 % | 495,4 | 533,7 | + 7,7 % |
| | S2 | 226,8 | 222,7 | - 1,8 % | 412,9 | 443,3 | + 7,4 % |
| | S4 | 207,9 | 208,2 | + 0,1 % | 397,5 | 419,9 | + 5,6 % |
| | S6 | 223,4 | 222,7 | - 0,3 % | 431,6 | 455,3 | + 5,5 % |
| | S10 | 219,0 | 217,1 | - 0,9 % | 397,3 | 417,2 | + 5,0 % |
| | S11 | 199,0 | 192,7 | - 3,2 % | 350,7 | 383,0 | + 9,2 % |
| smrekov | S14 | 206,8 | 200,4 | - 3,1 % | 387,2 | 406,0 | + 4,9 % |
| | S15 | 235,7 | 228,2 | - 3,2 % | 454,3 | 476,4 | + 4,9 % |
| | H2 | 237,9 | 230,4 | - 3,2 % | 458,9 | 507,3 | + 10,6 % |
| | H8 | 240,1 | 239,3 | - 0,3 % | 418,9 | 446,8 | + 6,7 % |
| | H10 | 285,7 | 261,6 | - 8,4 % | 539,1 | 571,4 | + 6,0 % |
| | H11 | 206,8 | 200,4 | - 3,1 % | 384,1 | 412,7 | + 7,5 % |
| | H12 | 269,0 | 247,1 | - 8,1 % | 577,6 | 609,4 | + 5,5 % |
| | H13 | 245,7 | 219,3 | - 10,7 % | 474,0 | 505,9 | + 6,7 % |
| | H14 | 262,3 | 248,2 | - 5,4 % | 582,2 | 656,8 | + 12,8 % |
| | H15 | 285,7 | 256,0 | - 10,4 % | 581,1 | 635,7 | + 9,4 % |
| gozdni | G1 | 270,1 | 272,7 | + 1,0 % | 463,2 | 498,1 | + 7,5 % |
| | G5 | 150,1 | 144,9 | - 3,5 % | 227,5 | 243,8 | + 7,2 % |
| | G6 | 179,0 | 179,3 | + 0,2 % | 339,5 | 369,2 | + 8,8 % |
| | G8 | 191,2 | 190,4 | - 0,4 % | 329,4 | 360,3 | + 9,4 % |
| | G11 | 213,4 | 209,3 | - 1,9 % | 458,6 | 492,2 | + 7,3 % |
| | G12 | 219,0 | 217,1 | - 0,9 % | 421,3 | 463,3 | + 10,0 % |
| | G14 | 244,6 | 230,4 | - 5,8 % | 494,1 | 517,6 | + 4,8 % |
| | G15 | 217,9 | 212,7 | - 2,4 % | 388,7 | 412,7 | + 6,2 % |

spr. (%) – odstotek spremembe v vsebnosti skupnih fenolnih spojin in AU po enem letu skladanja pri sobni T

4.6 REZULTATI MERJENJA BARVE MEDU

4.6.1 Instrumentalno merjenje barve z Minolta kromametrom

Barva analiziranih vzorcev slovenskega medu je bila zelo različna in je variirala od skoraj brezbarvne do temno rjave. Z Minolta kromametrom smo izmerili L^* , a^* in b^* parametre barve vzorcev medu, rezultati so prikazani na slikah 19 – 21 ter v prilogah E1 in E2.



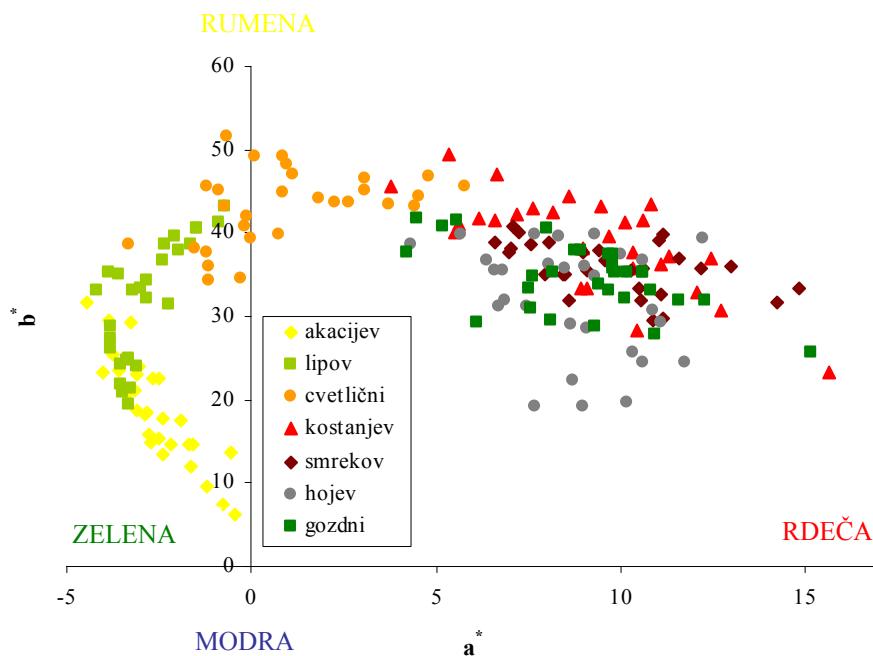
Slika 19: Vrednosti parametra L^* v različnih vrstah medu

Figure 19: Parameter L^* of honey colour in different honey types

Akacijev in lipov med sta imela najvišjo vrednost parametra L^* , ki določa svetlost vzorca, povprečni vrednosti sta znašali 64,3 oz. 61,2. Nadalje se je L^* vrednost zniževala v cvetličnem medu, kjer je povprečna vrednost parametra L^* znašala 55,1, in v kostanjevem medu, ki je imel vrednost 46,2. L^* vrednosti smrekovega in gozdnega medu sta si bili zelo podobni, znašali sta 44,2 oz. 43,7. Najnižjo povprečno vrednost parametra L^* smo določili v vzorcih hojevega medu, 41,5.

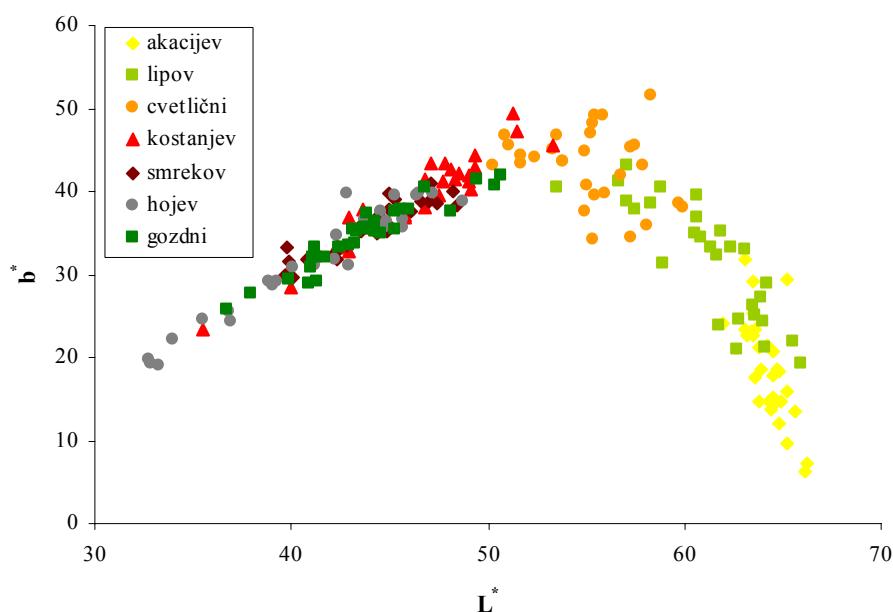
Povprečne vrednosti in območja vrednosti parametrov L^* , kot tudi parametrov a^* in b^* , so podani v prilogi E1. Parameter a^* določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem območju. Parameter b^* pa predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem.

Na sliki 20 je prikazan diagram a^* in b^* parametrov analiziranih vzorcev medu glede na botanično poreklo. Slike je razvidno, da so analizirani vzorci medu vsebovali rumene, rdeče in zelene komponente. Zelene komponente (negativne vrednosti parametra a^*) so bile v vseh vzorcih akacijevega in lipovega medu ter v 12 vzorcih cvetličnega medu. Ti vzorci se v (a^* , b^*) diagramu nahajajo v zgornjem levem kvadrantu (slika 20) in so vsebovali zeleno in rumeno barvo. Ostali vzorci medu, 17 vzorcev cvetličnega medu ter vsi vzorci kostanjevega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu, se nahajajo v zgornjem desnem kvadrantu, kar pomeni, da vsebujejo rdečo barvo (pozitivne vrednosti parametra a^*) in rumeno barvo (pozitivne vrednosti parametra b^*).



Slika 20: Vrednosti a^* in b^* parametrov v analiziranih vzorcih medu
Figure 20: Values of a^* and b^* parameters in analysed honey samples

Slike 20 tudi vidimo, da se akacijev in lipov med, ki sta najsvetlejša med analiziranimi vrstami medu, dobro ločita od ostalih vrst medu. Temnejše vrste medu, kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med, s povprečnimi vrednostmi a^* parametrov v območju od 8,74 do 9,80 in s povprečnimi vrednostmi b^* parametrov v območju od 32,14 do 38,91, pa se na diagramu precej prekrivajo.



Slika 21: Vrednosti b^* in L^* parametrov v analiziranih vzorcih medu
Figure 21: Values of b^* and L^* parameters in analysed honey samples

Na sliki 21 je prikazan diagram L^* in b^* parametrov analiziranih vzorcev medu glede na botanično poreklo. Tudi s te slike je, podobno kot s slike 20, razvidno, da se akacijev in lipov ter tudi cvetlični med dobro ločijo od kostanjevega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu.

Povprečne L^* vrednosti kostanjevega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu so bile med seboj zelo podobne, zato na osnovi instrumentalnega merjenja barve ne moremo ločiti kostanjevega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu.

Zveza med parametrom a* in L^* je bila polinomska in je prikazana v prilogi E2.

4.6.2 Spektrofotometrično določanje barve medu

Intenzivnost barve slovenskega medu smo določali tudi spektrofotometrično in jo podali kot neto absorbanco. Neto absorbance različnih vrst medu so se zviševale v naslednjem vrstnem redu: akacijev < lipov < cvetlični < hojev < smrekov < gozdni < kostanjev med. Povprečna vrednost neto absorbance 50 % (w/v) vodne raztopine vzorcev medu je znašala 74 za bledo rumene vzorce akacijevega medu in 481 za rdeče rjave vzorce kostanjevega medu (priloga E1). Rezultati so bili v tesni zvezi z L^* vrednostmi vzorcev medu, korelacijski koeficient je znašal -0,870, kar pomeni da se je neto absorbanca povečevala z zniževanjem L^* vrednosti. Grafična zveza med neto absorbanco in parametrom L^* barve medu je prikazana v prilogi E3.

4.7 VPLIV LETA PRIDELAVE MEDU NA ANALIZIRANE PARAMETRE

Vzorce medu smo zbirali v treh zaporednih letih, zato smo želeli preučiti tudi morebiten vpliv letnika medu na nekatere analizirane parametre v posameznih vrstah medu. Akacijev, cvetlični in gozdni med smo zbirali v letih 2004 in 2005. Leta 2005 zaradi neustreznih vremenskih razmer čebelarji niso pridelali lipovega in hojevega medu, zato smo ti dve vrsti medu vzorčili tudi leta 2006. Da smo zagotovili ustrezno število tipičnih vzorcev kostanjevega in smrekovega medu, smo kostanjev in smrekov med vzorčili tri leta zaporedoma, v letih 2004, 2005 in 2006.

Iz preglednice 18 je razvidno, da obstajajo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin, antioksidativni učinkovitosti in barvi posameznih vrst medu glede na letnik.

Vzorci akacijevega medu letnika 2004 so, v primerjavi z vzorci letnika 2005, v povprečju vsebovali več skupnih fenolnih spojin, njihova AU je bila večja, kar se kaže v nižji vrednosti IC_{50} ter višji FRAP vrednosti. Povprečna vrednost parametra L^* je bila enaka, razlike so v vrednosti parametra a*, ki je za leto 2004 znašal povprečno -3,01, za leto 2005 pa -2,20, kar pomeni, da so vzorci letnika 2004 vsebovali več zelenih komponent.

Lipov med letnika 2004 je bil v primerjavi z lipovim medom letnika 2006 svetlejše barve, saj je imel v povprečju višjo L^* vrednost, vseboval je manj skupnih fenolnih spojin ter imel manjšo AU.

Vzorci cvetličnega medu letnika 2005 so bili, v primerjavi z vzorci letnika 2004, svetlejši in so vsebovali manj skupnih fenolnih spojin ter imeli manjšo AU.

Preglednica 18: Povprečne vrednosti nekaterih analiziranih parametrov različnih vrst medu glede na letnik
Table 18: Average values of some parameters analysed in different honey types regarding the production year

| Vrsta medu | Letnik | n | Parameter | | | | | |
|------------|--------|----|--------------------------------|--|------------------|-------|-------|-------|
| | | | skupne fenolne spojine (mg/kg) | antioksidativna učinkovitost DPPH - IC ₅₀ (mg/mL) | FRAP (µM Fe(II)) | barva | | |
| | | | | | | L* | a* | b* |
| akacijev | 2004 | 15 | 46,5 | 48,6 | 74,3 | 64,25 | -3,01 | 19,93 |
| | 2005 | 15 | 43,4 | 65,0 | 64,9 | 64,27 | -2,20 | 17,49 |
| lipov | 2004 | 15 | 90,3 | 27,3 | 132,6 | 63,00 | -3,24 | 27,76 |
| | 2006 | 13 | 97,7 | 23,6 | 159,6 | 59,06 | -2,36 | 36,32 |
| cvetlični | 2004 | 14 | 155,5 | 11,5 | 207,1 | 54,41 | 1,82 | 45,50 |
| | 2005 | 15 | 121,7 | 22,4 | 162,8 | 55,81 | 0,21 | 40,95 |
| kostanjev | 2004 | 11 | 197,4 | 9,0 | 377,9 | 48,21 | 8,08 | 42,21 |
| | 2005 | 5 | 160,6 | 15,7 | 244,9 | 47,83 | 6,85 | 40,07 |
| | 2006 | 13 | 198,8 | 12,2 | 411,9 | 43,82 | 10,93 | 35,67 |
| smrekov | 2004 | 14 | 224,5 | 7,2 | 434,1 | 44,42 | 9,66 | 35,86 |
| | 2005 | 10 | 195,7 | 9,5 | 333,7 | 44,17 | 9,17 | 35,88 |
| | 2006 | 5 | 229,8 | 9,0 | 466,9 | 43,73 | 11,44 | 35,67 |
| hojev | 2004 | 15 | 226,2 | 8,2 | 431,5 | 44,22 | 7,88 | 35,95 |
| | 2006 | 15 | 238,8 | 8,1 | 481,3 | 38,85 | 9,59 | 28,33 |
| gozdni | 2004 | 15 | 221,8 | 7,7 | 405,6 | 44,23 | 8,55 | 35,09 |
| | 2005 | 15 | 199,0 | 10,4 | 361,8 | 43,12 | 9,44 | 34,13 |

Rezultati pri kostanjevem in smrekovem medu, ki smo ju vzorčili 3 leta zaporedoma, so težje primerljivi, ker število vzorcev ni enakoverno zastopano po posameznih letnikih, kar je razvidno iz preglednice 18.

Vzorci kostanjevega medu, zbrani v letu 2006, so vsebovali največ skupnih fenolnih spojin in dosegli najvišjo povprečno FRAP vrednost ter so bili tudi najtemnejši, saj je bila njihova povprečna vrednost parametra L* najnižja.

Največ skupnih fenolnih spojin in najvišje FRAP vrednosti je imel v povprečju smrekov med iz leta 2006, najmanj iz leta 2005. Rezultati instrumentalnega merjenja barve smrekovega medu kažejo, da so bile vrednosti L*, a* in b* parametrov precej izenačene v vseh treh letih, izstopa le vrednost parametra a* za leto 2006.

Vzorci hojevega medu letnika 2006 so bili, v primerjavi z vzorci letnika 2004, temnejši in so vsebovali več skupnih fenolnih spojin ter imeli višjo povprečno FRAP vrednost. Povprečni vrednosti IC₅₀ hojevega medu sta bili zelo podobni, 8,2 za leto 2004 in 8,1 za leto 2006.

Gozdni medovi letnika 2004 so, v primerjavi z vzorci te vrste medu iz leta 2005, vsebovali več skupnih fenolnih spojin, imeli so nižjo povprečno vrednost IC₅₀ ter višjo FRAP vrednost. Pričakovali smo, da bodo zato temnejše barve, vendar je bila nasprotno, povprečna vrednost parametra L* višja, kot v vzorcih letnika 2005.

Vsebnost posameznih flavonoidov, fenolnih kislin in abscizinske kisline v medu smo določili v 10 vzorcih medu vsake vrste, izbrali smo po 5 najbolj tipičnih vzorcev dveh različnih letnikov. Primerjava vsebnosti p-kumarne kisline, kamferola, pinocembrina, krizina, galangina in ABA2 (spojin, ki so bile prisotne v vseh analiziranih vzorcih medu), glede na letnik pridelave medu, je podana v preglednici 19.

Preglednica 19: Območja vsebnosti nekaterih fenolnih spojin in abscizinske kisline v različnih vrstah medu glede na letnik

Table 19: Ranges of some phenolic compounds and abscisic acid in different honey types regarding the production year

| Vrsta medu | letnik | n | Fenolne spojine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | ABA2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|------------|--------|---|---|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | | | p-kumarna kislina $x_{\min} - x_{\max}$ | kamferol $x_{\min} - x_{\max}$ | pinocembrin $x_{\min} - x_{\max}$ | krizin $x_{\min} - x_{\max}$ | galangin $x_{\min} - x_{\max}$ | |
| akacijev | 2004 | 5 | 988 – 2479 | 212 – 337 | 51 – 490 | 70 – 808 | 28 – 349 | 448 – 1159 |
| | 2005 | 5 | 423 – 3794 | 232 – 365 | 263 – 2019 | 301 – 1253 | 143 – 1109 | 894 – 1660 |
| lipov | 2004 | 5 | 1828 – 3396 | 227 – 277 | 319 – 764 | 438 – 1233 | 130 – 478 | 1886 – 3115 |
| | 2006 | 5 | 1783 – 2988 | 256 – 359 | 49 – 1217 | 109 – 1317 | 31 – 634 | 1998 – 4211 |
| cvetlični | 2004 | 5 | 1327 – 4534 | 280 – 622 | 158 – 764 | 203 – 1091 | 81 – 457 | 904 – 5795 |
| | 2005 | 5 | 1511 – 4931 | 273 – 400 | 32 – 1032 | 51 – 855 | 18 – 479 | 937 – 2508 |
| kostanjev | 2004 | 5 | 1159 – 1988 | 154 – 251 | 72 – 251 | 172 – 450 | 41 – 143 | 151 – 709 |
| | 2006 | 5 | 871 – 1922 | 128 – 232 | 25 – 274 | 40 – 388 | 10 – 192 | 216 – 495 |
| smrekov | 2005 | 5 | 936 – 2496 | 240 – 317 | 105 – 357 | 137 – 511 | 56 – 191 | 399 – 688 |
| | 2006 | 5 | 630 – 3104 | 350 – 530 | 120 – 1990 | 189 – 1276 | 71 – 654 | 857 – 23664 |
| hojev | 2004 | 5 | 236 – 1502 | 184 – 292 | 59 – 319 | 88 – 465 | 29 – 113 | 343 – 622 |
| | 2006 | 5 | 919 – 1705 | 155 – 347 | 82 – 443 | 111 – 388 | 42 – 191 | 211 – 834 |
| gozdni | 2004 | 5 | 509 – 3066 | 115 – 377 | 38 – 843 | 56 – 940 | 20 – 472 | 690 – 2724 |
| | 2005 | 5 | 583 – 1535 | 208 – 285 | 137 – 398 | 199 – 463 | 88 – 314 | 339 – 1021 |

Vsebnost p-kumarne kisline je bila glede na letnik najbolj variabilna pri akacijevem, smrekovem in hojevem medu, medtem ko pri lipovem, cvetličnem in kostanjevem medu ni bilo velikih razlik med letnikoma.

V primeru pinocembrina, krizina in galangina, flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa, vpliv letnika težko ovrednotimo. Iz preglednice 19 je sicer razvidno, da obstajajo razlike v vsebnosti teh spojin med različnimi letniki, zlasti pri akacijevem medu, kjer je vsebnost v vzorcih letnika 2004 veliko manjša kot v vzorcih letnika 2005 in pri smrekovem medu, kjer je teh flavonoidov več v vzorcih letnika 2006 in manj v vzorcih letnika 2005. Te razlike pa so verjetno posledica večje oz. manjše vsebnosti propolisa v medu.

Vsebnost ABA2 je bila po letnikih precej spremenljiva, največje razlike so bile opazne pri smrekovem, akacijevem, gozdnem in cvetličnem medu.

Med naštetimi spojinami je po letnikih najmanj variirala vsebnost kamferola, največje razlike v vsebnosti kamferola v vzorcih različnih letnikov smo opazili pri smrekovem medu.

4.8 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PROLINA IN BELJAKOVIN V MEDU

Ker so nekateri raziskovalci ugotovili povezanost AU medu z vsebnostjo prolinja (Meda in sod., 2005; Pérez in sod., 2007) in beljakovin v medu (Gheldorf in sod., 2002), smo v analiziranih vzorcih medu določali tudi vsebnost teh dveh parametrov. Rezultati so podani v preglednici 20.

Najmanjšo povprečno vsebnost prolinja smo določili v akacijevem medu in lipovem medu, vrednosti sta znašali 317 oz. 320 mg/kg medu. Sledijo hojev med s 424 mg/kg, smrekov s

446 mg/kg, gozdnji s 479 mg/kg in cvetlični med s 511 mg/kg. Največjo povprečno vsebnost prolina smo določili v kostanjevem medu, 558 mg/kg.

Preglednica 20: Vsebnost prolina in beljakovin v različnih vrstah medu

Table 20: Proline and protein content in different honey types

| Vrsta medu | n | Statistični parameter | Prolin (mg/kg) | Skupne beljakovine (g/100 g) |
|------------|----|-----------------------|----------------|------------------------------|
| akacijev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | 317 ± 88 | 0,170 ± 0,029 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 158 – 496 | 0,128 – 0,241 |
| lipov | 28 | $\bar{x} \pm SD$ | 320 ± 69 | 0,200 ± 0,042 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 225 – 502 | 0,125 – 0,309 |
| cvetlični | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | 511 ± 151 | 0,305 ± 0,058 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 309 – 904 | 0,200 – 0,422 |
| kostanjev | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | 558 ± 108 | 0,353 ± 0,033 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 390 – 776 | 0,309 – 0,438 |
| smrekov | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | 446 ± 135 | 0,303 ± 0,060 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 231 – 767 | 0,181 – 0,422 |
| hojev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | 424 ± 65 | 0,261 ± 0,046 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 333 – 659 | 0,181 – 0,363 |
| gozdnji | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | 479 ± 128 | 0,302 ± 0,067 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 322 – 814 | 0,197 – 0,491 |

n: število vzorcev, \bar{x} : povprečna vrednost, SD: standardni odklon, x_{\min} : minimalna vrednost, x_{\max} : maksimalna vrednost

Najmanjša povprečna vsebnost skupnih beljakovin je znašala 0,170 g/100 g in je bila določena v akacijevem medu. Sledita lipov in hojev med s povprečnima vsebnostima 0,200 oz. 0,261 g/100 g. Povprečne vsebnosti skupnih beljakovin v cvetličnem, gozdnem in smrekovem medu so si bile zelo podobne in so znašale od 0,302 do 0,305 g/100 g. Največ skupnih beljakovin je v povprečju vseboval kostanjev med, 0,353 g/100 g.

4.9 KORELACIJE

4.9.1 Medsebojne korelacje med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in posameznimi flavonoidi, fenolnimi kislinami ter abscizinsko kislino

Med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, določeno s FC metodo, in vsoto posameznih fenolnih spojin, določenih s HPLC/MS ni bilo statistično značilne povezave, saj je koeficient korelacji znašal samo 0,082 (podatki niso prikazani). S statistično analizo smo tudi ugotovili, da med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, določeno s FC metodo, in posameznimi fenolnimi spojinami ni bilo statistično značilnih korelacijs, vrednosti korelacijskih koeficientov so bile nizke.

V preglednici 21 so podani Pearsonovi korelacijski koeficienti za zveze med individualnimi spojinami, analiziranimi s HPLC/MS, katerih vrednosti so bile večje od 0,7, medtem ko so korelacijski koeficienti za vse zveze med spojinami, ki smo jih določili s HPLC/MS, podani v prilogi F1. Značilno je, da so korelacijski koeficienti visoki pri zvezah med spojinami, ki izvirajo iz propolisa, to so pinocembrin, pinobanksin, krizin, galangin.

Preglednica 21: Korelacijski koeficienti med nekaterimi flavonoidi in fenolnimi kislinami
Table 21: Correlation coefficients between some flavonoids and phenolic acids

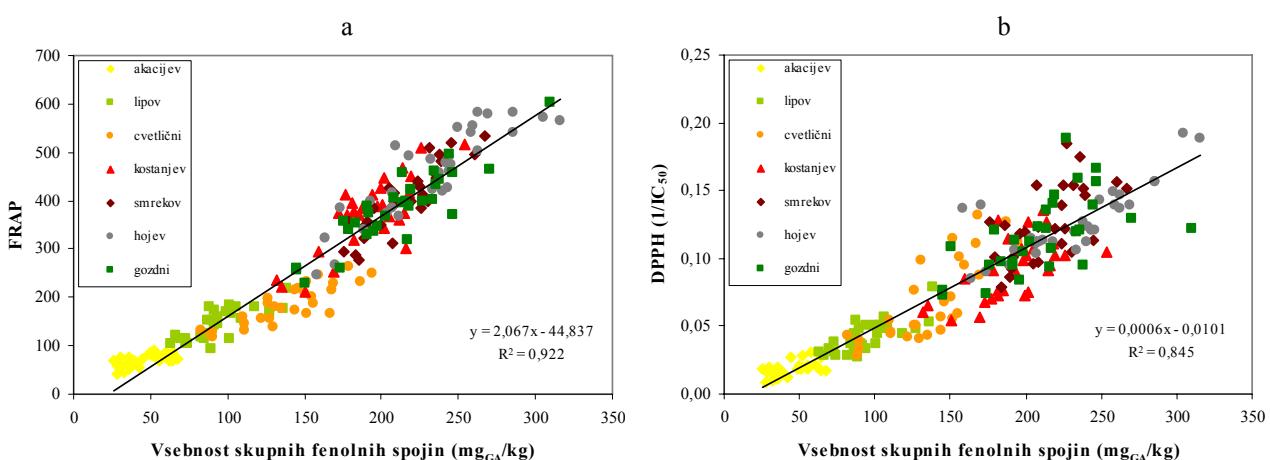
| Zveza | Koeficient korelacije (R) |
|---|---------------------------|
| pinocembrin/krizin | 0,886 |
| pinocembrin/galangin | 0,953 |
| pinocembrin/pinobanksin* | 0,935 |
| pinocembrin/fisetin* | 0,826 |
| krizin/galangin | 0,877 |
| krizin/pinobanksin* | 0,823 |
| krizin/fisetin* | 0,712 |
| galangin/pinobanksin* | 0,955 |
| galangin/fisetin* | 0,878 |
| galangin/pinostrobin* | 0,740 |
| pinobanksin*/fisetin* | 0,834 |
| cimetna kislina*/β-fenilmlečna kislina* | 0,991 |
| ABA1*/ABA2 | 0,974 |

*domnevna identifikacija

Zelo visoko statistično značilnost kažeta tudi zvezi med izomerama abscizinske kisline ($R_{ABA1/ABA2} = 0,974$) ter med cimetno in β -fenilmlečno kislino ($R_{CIM/FM} = 0,991$).

4.9.2 Povezava med vsebnostjo fenolnih spojin v medu, določeno s FC metodo, in njegovo antioksidativno učinkovitostjo

Na sliki 22 sta prikazani zvezi med AU, določeno s FRAP oz. DPPH metodo, in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin vseh analiziranih vzorcev medu.



Slika 22: Zveza med antioksidativno učinkovitostjo, določeno s FRAP metodo (a) oz. DPPH metodo (b) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu

Figure 22: Correlation between antioxidant activity as determined with FRAP method (a) and DPPH method (b) and total phenolic content in analysed honey samples

Visoki vrednosti korelacijskih koeficientov R, 0,960 ($R^2 = 0,922$) za zvezo med AU (FRAP metoda) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ter 0,920 ($R^2 = 0,845$) za zvezo med

AU (DPPH metoda) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, kažeta na to, da so fenolne spojine odgovorne za antioksidativno učinkovitost medu.

V preglednici 22 so podani koeficienti determinacije in korelacije za zveze med AU in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za posamezne vrste medu. Vse zveze so bile statistično značilne.

Preglednica 22: Koeficienti determinacije in korelacije za zvezo med AU in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za posamezne vrste medu

Table 22: Coefficients of determination and correlation for relation between AU and total phenolic content for individual honey types

| Vrsta medu | Zveza | | | |
|------------|--|---------------------------|---|---------------------------|
| | AU (FRAP)/skupne fenolne spojine (FC) | | AU (DPPH – 1/IC ₅₀)/skupne fenolne spojine (FC) | |
| | koeficient determinacije (R ²) | koeficient korelacije (R) | koeficient determinacije (R ²) | koeficient korelacije (R) |
| akacijev | 0,434 | 0,659 | 0,331 | 0,575 |
| lipov | 0,585 | 0,765 | 0,554 | 0,744 |
| cvetlični | 0,735 | 0,858 | 0,656 | 0,810 |
| kostanjev | 0,642 | 0,801 | 0,394 | 0,628 |
| smrekov | 0,800 | 0,894 | 0,364 | 0,603 |
| hojev | 0,781 | 0,884 | 0,601 | 0,775 |
| gozdni | 0,807 | 0,898 | 0,352 | 0,594 |

Koeficienti determinacije so se med vrstami medu precej razlikovali in so za zvezo med AU, določeno s FRAP metodo, in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin znašali od 0,434 do 0,807. Tako vsebnost fenolnih spojin v smrekovem in gozdnem medu pojasnjuje 80 % variabilnosti AU, določene s FRAP metodo.

AU medu smo določili tudi z DPPH metodo, determinacijski koeficienti za zvezo med recipročno vrednostjo IC₅₀ in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin so bili v tem primeru nižji in so se gibali od 0,331 do 0,656.

Na osnovi vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficiente smo prišli do ugotovitve, da je bila korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AU, določeno s FRAP metodo, najmočnejša v primeru maninj medov, hojevega, smrekovega in gozdnega medu, vrednosti korelacijskih koeficientov so se gibale od 0,884 do 0,899. Edino pri akacijevem medu je bil R manjši kot 0,70, kar je zgornja mejna vrednost zmernih korelacij. Za zvezo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AU, določeno z DPPH metodo, je bil R prav tako najnižji pri akacijevem medu, vrednost je znašala le 0,575, najvišji pa pri cvetličnem medu, 0,810.

4.9.3 Povezava med vsebnostjo posameznih fenolnih spojin v medu in njegovo antioksidativno učinkovitostjo

V preglednici 23 so podani korelacijski koeficienti med AU, določeno z dvema metodama, in kvercetinom, kamferolom, pinocembrinom, krizinom, apigeninom, luteolinom in *p*-kumarno kislino. Razvidno je, da zveze niso bile močne, saj so bile vrednosti korelacijskih

koeficientov nizke. Enako velja tudi za ostale spojine, določene s HPLC/MS (podatki niso prikazani).

Preglednica 23: Korelacijski koeficienti (R) med antioksidativno učinkovitostjo, določeno z DPPH oz. FRAP metodo, ter posameznimi flavonoidi in fenolnimi kislinami

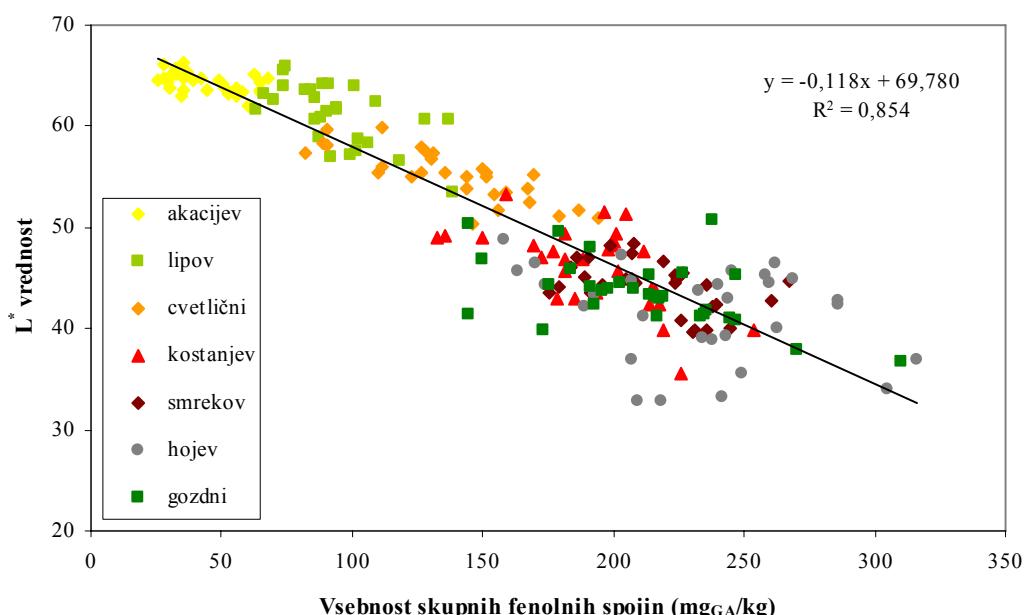
Table 23: Correlation coefficients (R) between antioxidant activity as determined with DPPH and FRAP method and individual flavonoids and phenolic acids

| Spojina | Antioksidativna učinkovitost | |
|-------------------|------------------------------|-----------|
| | DPPH (1/IC ₅₀) | FRAP |
| kvercetin | 0,346 ** | 0,290 * |
| kamferol | -0,056 | -0,168 |
| pinocembrin | -0,328 ** | -0,342 ** |
| krizin | -0,351 ** | -0,430 ** |
| apigenin | 0,109 | 0,120 |
| luteolin | 0,175 | 0,187 |
| p-kumarna kislina | -0,353 ** | -0,373 ** |

* oz. **: zveza je statistično značilna pri 0,05 oz. 0,01 stopnji tveganja

4.9.4 Povezava med barvo medu in vsebnostjo fenolnih spojin v medu, določeno s FC metodo ter njegovo antioksidativno učinkovitostjo

S slike 23 je razvidno, da sta parameter L^* , ki opisuje svetlost barve vzorca, in vsebnost skupnih fenolnih spojin v linearini povezavi, in sicer v obratnem sorazmerju, korelacijski koeficient je bil $R = -0,924$. Svetlejši vzorci medu z višjimi vrednostmi parametra L^* , to sta akacijev in lipov med, vsebujejo manj skupnih fenolnih spojin kot temnejši medovi (kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med), katerih vrednosti parametra L^* so nižje.



Slika 23: Zveza med barvo medu (L^* vrednost) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin

Figure 23: Correlation between parameter L^* of honey colour and total phenolic content

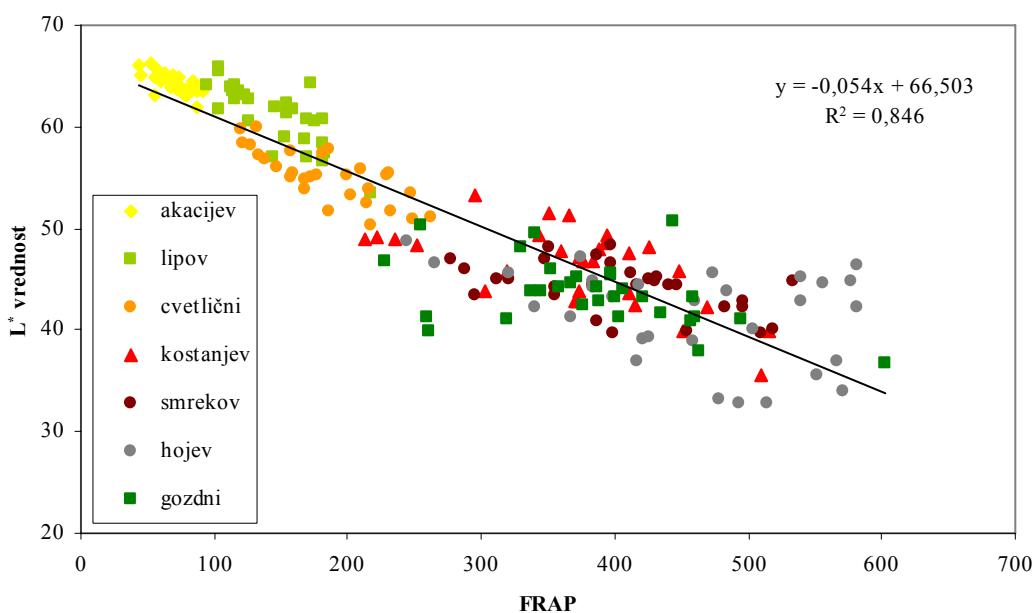
V preglednici 24 so podani korelacijski koeficienti, ki kažejo povezanost med parametri barve medu in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v medu ter njegovo antioksidativno učinkovitostjo. Vse zveze so bile statistično značilne pri 0,01 stopnji tveganja. Med barvnimi karakteristikami edino parameter b^* , ki predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem, ni kazal močne povezave z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ter AU medu. Vse ostale povezave so bile močne, korelacijski koeficienti so se gibali od 0,819 do -0,924.

Preglednica 24: Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri barve medu in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ter AU medu

Table 24: Pearson correlation coefficients between parameters of honey colour, total phenolic content and AU of honey

| Parameter | Barva | | | |
|-----------------------------|----------------------|--------|-------|-----------------|
| | L^* | a^* | b^* | neto absorbanca |
| skupne fenolne spojine (FC) | -0,924 | 0,888 | 0,417 | 0,886 |
| AU | DPPH (1/ IC_{50}) | -0,845 | 0,820 | 0,296 |
| | FRAP | -0,920 | 0,905 | 0,294 |
| | | | | 0,850 |

Na sliki 24 je predstavljena zveza med L^* vrednostjo barve medu in njegovo antioksidativno učinkovitostjo, določeno s FRAP metodo. Visok koeficient korelacije z vrednostjo $-0,920$ ($R^2 = 0,846$) kaže na dobro povezanost barve medu in njegove AU. Grafična predstavitev zveze med vrednostjo L^* in AU, določeno z DPPH metodo, pa je prikazana v prilogi F2. Koeficient korelacije je bil v tem primeru nižji, njegova vrednost je znašala $-0,845$ ($R^2 = 0,715$).



Slika 24: Zveza med barvo medu (L^* vrednost) in antioksidativno učinkovitostjo (FRAP)

Figure 24: Correlation between parameter L^* of honey colour and antioxidant activity (FRAP)

4.9.5 Povezava med vsebnostjo fenolnih spojin v medu, njegovo antioksidativno učinkovitostjo in barvo ter nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri medu

V preglednici 25 so podani Pearsonovi korelacijski koeficienti za zveze med vsebnostjo skupnih in nekaterih individualnih fenolnih spojin, abscizinske kisline, AU ter barve medu in nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri medu. Iz preglednice je razvidno, da so vrednosti korelacijskih koeficientov, višje od 0,7 značilne samo za linearne zveze med električno prevodnostjo (χ) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, med χ in AU medu ter χ in parametri barve medu, z izjemo parametra b^* . Korelacijski koeficient z vrednostjo višjo od 0,7, ki kaže na močno zvezo, je bil določen tudi za povezavo med barvo medu (neto absorbancijo) in vsebnostjo beljakovin v medu.

Preglednica 25: Pearsonovi korelacijski koeficienti med vsebnostjo skupnih in nekaterih individualnih fenolnih spojin, abscizinske kisline, AU ter barve medu in nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri medu

Table 25: Pearson correlation coefficients between total phenolic content, some individual phenolic compounds, ABA, AU, honey colour and some physico-chemical parameters of honey

| Parameter | | χ | pH | Skupne kisline | Prolin | Beljakovine |
|-----------------------------|----------------------------|----------|----------|----------------|----------|-------------|
| skupne fenolne spojine (FC) | | 0,817** | 0,575** | 0,366** | 0,376** | 0,581** |
| posamezne fenolne spojine | pinocembrin | -0,424** | -0,338** | -0,108 | -0,183 | -0,176 |
| | krizin | -0,414** | -0,284* | -0,216 | -0,215 | -0,182 |
| | kamferol | -0,374** | -0,368** | 0,275* | -0,035 | 0,118 |
| | kvercetin | 0,120 | 0,018 | 0,285* | -0,038 | 0,065 |
| | apigenin | 0,076 | -0,098 | 0,372** | 0,385** | 0,267* |
| | galangin | -0,422** | -0,348** | -0,137 | -0,229 | -0,239* |
| | <i>p</i> -kumarna kislina | -0,318** | -0,238* | -0,053 | -0,096 | -0,007 |
| | cimetna kislina | 0,186 | 0,109 | 0,314** | 0,315** | 0,286* |
| ABA2 | | -0,160 | -0,078 | 0,015 | -0,023 | 0,157 |
| AU | DPPH (1/IC ₅₀) | 0,742** | 0,480** | 0,371** | 0,243** | 0,561** |
| | FRAP | 0,843** | 0,624** | 0,284** | 0,280** | 0,475** |
| barva | L* | -0,812** | -0,560** | -0,365** | -0,415** | -0,600** |
| | a* | 0,812** | 0,536** | 0,342** | 0,391** | 0,613** |
| | b* | 0,379** | 0,328** | 0,232** | 0,420** | 0,578** |
| | neto absorbanca | 0,835** | 0,608** | 0,266** | 0,525** | 0,754** |

χ : električna prevodnost

* oz. **: zveza je statistično značilna pri 0,05 oz. 0,01 stopnji tveganja

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V doktorski disertaciji smo preučevali polifenolno sestavo različnih vrst slovenskih medov in njihovo antioksidativno učinkovitost. Zanimalo nas je ali lahko analiza fenolnih spojin, med njimi flavonoidov, poleg ostalih fizikalno-kemijskih parametrov in pelodne analize, služi kot tehnika za določanje botaničnega porekla medu. Želeli smo ugotoviti, če v posameznih vrstah slovenskega medu obstajajo specifične spojine, ki bi bile v pomoč pri določanju botaničnega porekla.

Antioksidativno učinkovitost medu smo določili z dvema metodama, DPPH in FRAP metodo. Ker je iz literature razvidno, da je antioksidativni potencial medu odvisen tudi od barve medu, smo analiziranim vzorcem medu določili barvo z instrumentalnimi metodami. S statistično analizo smo želeli ugotoviti ali so zveze med obravnavanimi parametri statistično značilne.

Iz dobljenih rezultatov lahko podamo določene ugotovitve in potrdimo oz. ovržemo postavljene hipoteze. Razpravo o dobljenih rezultatih, njihovem ujemaju z obstoječimi podatki iz literature in statističnih ugotovitvah smo strnili v naslednje sklope: osnovni fizikalno-kemijski parametri, vsebnost skupnih fenolnih spojin, vsebnost flavonoidov in fenolnih kislin, antioksidativna učinkovitost medu, barva medu, vpliv letnika na analizirane parametre, korelacije med vsemi obravnavanimi parametri in zaključne ugotovitve.

5.1.1 Osnovni fizikalno-kemijski parametri

Rezultati analiz nekaterih osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov so podani v preglednici 7. Vsebnost vode je bila v vseh analiziranih vzorcih zelo izenačena. Električna prevodnost je bila najnižja v akacijevem medu ter najvišja v kostanjevem medu in v medovih iz mane. Vrednost pH je bila najnižja v akacijevem in cvetličnem medu, ki izvirata iz nektarja. Najvišjo povprečno vrednost pH je imel kostanjev med. Najmanj skupnih kislin so vsebovali akacijev, lipov in kostanjev med, največ pa smrekov med. Rezultati določanja električne prevodnosti, vrednosti pH, vsebnosti skupnih kislin kot tudi vsebnosti prolina za akacijev, lipov, kostanjev med in medove iz mane so v skladu z vrednostmi, ki jih za evropske vrstne medove navajata Persano Oddo in Piro (2004).

5.1.2 Vsebnost skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena s Folin-Ciocalteujevo metodo, je v posameznih vrstah medu močno variirala. Najmanjšo povprečno vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili v svetlejših vrstah medu, akacijevem, lipovem in cvetličnem medu, povprečne vsebnosti so znašale 44,9 mg_{GA}/kg, 93,8 mg_{GA}/kg in 138,0 mg_{GA}/kg. V kostanjevem medu je bilo skupnih fenolnih spojin v povprečju 191,7 mg_{GA}/kg, medtem ko so največ skupnih fenolnih spojin vsebovali medovi iz mane, gozdni, smrekov in hojev med, od 210,4 mg_{GA}/kg do 232,5 mg_{GA}/kg (slika 14). Dobljeni rezultati kažejo na to, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin močno odvisna od botaničnega porekla medu.

Tudi nekateri tuji raziskovalci navajajo podobne vrednosti za posamezne vrste medu. Beretta in sod. (2005) so v italijanskem medu določili naslednje vsebnosti skupnih fenolnih spojin: v akacijevem medu 55,2 mg_{GA}/kg, v cvetličnem medu 170,4 mg_{GA}/kg, v kostanjevem medu 211,2 mg_{GA}/kg in v maninem medu 255,6 mg_{GA}/kg. Trend naraščanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin po posameznih vrstah medu je enak kot v naši raziskavi.

Gheldorf in Engeseth (2002) sta v akacijevem medu določila najmanjšo vsebnost skupnih fenolnih spojin v primerjavi z ostalimi vrstami medu, 46,0 mg_{GA}/kg. Njihov rezultat je zelo podoben vrednosti, ki smo jo za akacijev med določili v naši raziskavi (44,9 mg_{GA}/kg).

Naši rezultati so tudi v skladu z navedbami italijanskih raziskovalcev (Blasa in sod., 2006), ki so določali vsebnost skupnih fenolnih spojin v dveh vrstah medu. Italijanski akacijev med je vseboval od 30 do 110 mg skupnih fenolnih spojin na kg medu, cvetlični pa od 125 do 175 mg/kg. Cvetlični med je imel v povprečju približno dvakrat večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin v primerjavi z akacijevim medom, medtem ko je bila v naši raziskavi vsebnost skupnih fenolnih spojin v cvetličnem medu približno trikrat večja kot v akacijevem medu.

Zalibera in sod. (2008) so ugotovili, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu značilno odvisna od botaničnega porekla medu, najmanjšo vsebnost so določili v akacijevem medu, sledi mu cvetlični med, največ skupnih fenolnih spojin pa so vsebovali vzorci gozdnega medu. Tudi ti rezultati podpirajo rezultate naše raziskave.

Primerjava rezultatov z ostalimi študijami (Al-Mamary in sod., 2002; Meda in sod., 2005; Küçük in sod., 2007; Vela in sod. 2007; Pérez in sod., 2007) je manj primerna, ker so analizirane tudi nekatere druge vrste medu, ki niso značilne za Slovenijo in ker avtorji uporabljajo različne modifikacije FC metode za določitev vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

Ker je med živilo z dolgim rokom uporabnosti, nas je zanimalo, če se fenolne spojine v medu ohranijo tudi po določenem časovnem obdobju. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v večini analiziranih vzorcev medu se med enoletnim skladiščenjem v temi na sobni temperaturi ni bistveno zmanjšala, odstotek zmanjšanja je znašal povprečno 3,5 % (preglednica 17). V devetih vzorcih pa se je vsebnost skupnih fenolnih spojin po enem letu skladiščenja celo minimalno povečala. Raziskav o vplivu skladiščenja na vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu je zelo malo, zato naše rezultate težko primerjamo s podatki iz literature. Večina raziskav o vplivu skladiščenja medu namreč preučuje parametre, ki so pokazatelji svežosti oz. pregetosti medu, to sta vsebnost hidroksimetilfurfurala in aktivnost encimov, diastaze in invertaze. Iz raziskave ameriških avtorjev (Wang in sod., 2004) pa je razvidno, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih ajdovega medu in medu iz detelje, skladiščenih 6 mesecev, ni bistveno zmanjšala.

5.1.3 Vsebnost flavonoidov in fenolnih kislin

Predstavljena študija daje prvi podrobni vpogled v polifenolno sestavo različnih vrst slovenskega medu. Spektrofotometrična FC metoda namreč podaja samo okvirne vrednosti

o skupni vsebnosti fenolnih spojin, medtem ko lahko s HPLC metodo določamo tudi vsebnosti posameznih fenolnih spojin.

V večini objavljenih študij določanja vsebnosti posameznih fenolnih spojin v medu so raziskovalci za ekstrakcijo teh spojin iz medu uporabili ionski izmenjevalec Amberlite XAD-2. Slabost postopka ekstrakcije s pomočjo Amberlita XAD-2 je dolg čas priprave vzorcev, ker so vključeni različni postopki čiščenja, in velika poraba organskih topil, predvsem metanola, potrebna pa je tudi velika količina vzorca. Zato se v zadnjem času vse bolj uporablja metoda SPE, kjer so stacionarne faze napolnjene v plastične ali steklene kolone za enkratno uporabo (Inoue in sod., 2005; Pulcini in sod., 2006; Michalkiewicz in sod., 2008). Michalkiewicz in sod. (2008) so v svoji raziskavi ugotavljali tudi izkoristek ekstrakcije s štirimi različnimi sorbenti, ionskim izmenjevalcem Amberlitom XAD-2, BondElut C18 (500 mg), Oasis HLB (200 mg) in Strata-X (30 mg) in ugotovili, da je izmenjevalec Amberlite XAD-2 za ekstrakcijo fenolnih spojin iz medu najmanj primeren, ker so bili izkoristki najslabši, galna kislina se nanj sploh ni vezala, ostale fenolne kisline pa le deloma. Podobno v obsežni študiji navaja tudi D'Arcy (2005).

SPE je kritični del analize, ker odstrani moteče komponente, npr. ogljikove hidrate, ki jih med vsebuje največ. V naši raziskavi smo ekstrakcijo izvedli s SPE kolonami Strata-X, ker po podatkih iz literature zagotavljajo dobre izkoristke. S HPLC metodo z detektorjem z diodno matriko (DAD) nismo uspeli ločiti nekaterih spojin, ki imajo podobne retencijske čase, zato smo uporabili HPLC v povezavi z masnim detektorjem, ki podaja poleg retencijskih časov tudi podatke o molskih masah oz. m/z vrednostih analiziranih spojin. Za masni detektor je, v primerjavi z DAD detektorjem, značilna večja občutljivost, zato je za analizo potrebno manj vzorca.

V vzorcih različnih vrst slovenskega medu smo s pomočjo standardnih spojin določili *p*-kumarno, kavno, elaginsko in klorogensko kislino ter flavonoide miricetin, luteolin, kvercetin, naringenin, apigenin, kamferol, pinocembrin, krizin in galangin. Domnevno smo na podlagi molskih mas in razpoložljivih podatkov iz literature identificirali in kvantificirali še cimetino in β -fenilmlečno kislino ter flavonoide pinobanksin, tricetin, fisetin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktol (preglednice 9 – 15).

Poleg fenolnih spojin smo z uporabljenimi pogoji ločbe določili še prisotnost *cis-trans* abscizinske kisline (ABA2) ter, na podlagi molske mase in razpoložljivih podatkov iz literature, domnevno tudi *trans-trans* abscizinske kisline (ABA1).

Analizirani vzorci sedmih vrst slovenskega medu, poleg identificiranih in kvantitativno ovrednotenih spojin, ki smo jih že našteli, vsebujejo še nekatere druge spojine, kar je razvidno iz kromatogramov, dobljenih s HPLC z DAD detektorjem (slika 16 in priloga B11). Ker nismo imeli standardnih spojin, jih nismo mogli identificirati in kvantitativno določiti. Iz HPLC/MS kromatogramov (slika 15 in priloge B7 – B13) je tudi razvidno, da imajo različne vrste slovenskega medu podoben, a kvantitativno različen fenolni profil.

Iz rezultatov vsebnosti posameznih flavonoidov, fenolnih kislin kot tudi abscizinske kisline v medu (preglednice 9 – 15) lahko zaključimo, da obstajajo velike razlike v vsebnosti teh spojin med posameznimi vrstami medu kot tudi znotraj iste vrste. Tudi raziskava fenolnega profila evropskih vrstnih medov (Tomás-Barberán in sod., 2001) je pokazala veliko variabilnost v vsebnostih posameznih spojin v vzorcih istih vrst medu.

Vsi analizirani vzorci različnih vrst slovenskega medu so vsebovali flavonoide, ki izvirajo iz propolisa in to so bili pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin. Njihova vsebnost je bila zelo variabilna, ker je odvisna od vsebnosti propolisa v medu. Pri nekaterih vrstah medu imamo tako vzorce z zelo visoko vsebnostjo pinocembrina, pinobanksina, krizina in galangina (vzorci A18, L26, C20 S27, G12). Pri kostanjevem in hojevem medu pa vzorcev, ki bi izstopali z visokimi vsebnostmi teh flavonoidov, ni bilo. Med vzorci z minimalno vsebnostjo pinocembrina, pinobanksina, krizina in galangina so bili npr. vzorci A14, L16, C22, K30 in K40, G9 in G15 (preglednice 9 – 15). Glede na vsebnost teh flavonoidov v posameznih vrstah medu lahko povzamemo, da so največ teh flavonoidov vsebovali svetlejši medovi, akacijev, lipov in cvetlični med, najmanjše vsebnosti pa smo določili v kostanjevem in hojevem medu.

Flavonoida kamferol in apigenin sta bila prisotna v vseh analiziranih vzorcih, njune vsebnosti so bile večinoma v območju med 200 in 400 µg/kg za kamferol ter med 50 in 400 µg/kg za apigenin. Najvišje koncentracije apigenina smo določili v cvetličnem medu, najmanj pa so ga vsebovali vzorci akacijevega medu.

Največ kvercetina je vseboval hojev med, sledi smrekov med. Vsebnosti kvercetina v akacijevem, lipovem, cvetličnem in gozdnem medu so si bile dokaj podobne.

Flavonoidi miricetin, luteolin in naringenin so bili prisotni le v nekaterih analiziranih vzorcih medu, vsebnosti teh flavonoidov v medu pa so, v primerjavi z vsebnostmi ostalih flavonoidov, relativno nizke. Iz rezultatov je še razvidno, da akacijev in lipov med ne vsebujejo flavonoida miricetina, kostanjev med pa ne vsebuje naringenina.

V večini analiziranih vzorcev smo določili tudi flavonoide, ki smo jih domnevno identificirali na podlagi mase njihovih molekulskih ionov in podatkov iz literature kot fisetin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol, njihove vsebnosti so zelo variirale. Visoke vsebnosti fisetina smo določili v vzorcih medu, za katere je bila značilna tudi visoka vsebnost krizina, pinocembrina, pinobanksina in galangina, to je flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa.

Domnevno smo identificirali tudi flavonoid tricetin, ki je bil prisoten v vseh analiziranih vzorcih smrekovega, hojevega in gozdnega medu ter v šestih vzorcih kostanjevega medu. Najvišje koncentracije so dosegli vzorci hojevega medu, od 2006 do 3802 µg/kg (preglednica 14). Akacijev, lipov in cvetlični med tega flavonoida niso vsebovali. Iz tega sklepamo, da je izvor te spojine mana.

Značilni fenolni kislini, identificirani v različnih vrstah slovenskega medu, sta bili kavna in *p*-kumarna kislina. Kavno kislino smo identificirali v vseh analiziranih vzorcih medu, razen v enem vzorcu cvetličnega medu (C20), kvantitativno pa smo jo določili le v svetlejših medovih, akacijevem, lipovem in cvetličnem. V akacijevem medu je bilo kavne kisline malo, od 106 do 616 µg/kg (preglednica 9), v cvetličnem medu je vsebnost dosegla 1277 µg/kg (vzorec C1) (preglednica 11), medtem ko so v lipovem medu vrednosti variirale od 1257 do 3075 µg/kg (preglednica 10). Kavne kisline nismo kvantitativno določili v temnejših vrstah medu, kostanjevem, smrekovem, hojevem in gozdnem medu. Kot navajajo nekateri drugi raziskovalci (Ferreres in sod., 1994b; Kenjerić, 2004), je pri temnejših vrstah medu (npr. kostanjev in resin med), ki v primerjavi s svetlejšimi vsebujejo več fenolnih kislin in manj flavonoidov (Amiot in sod., 1989), izolacija teh spojin iz medu otežena. To lahko vidimo tudi v naši raziskavi, če primerjamo HPLC/DAD kromatograma akacijevega in smrekovega medu (slika 16 in priloga B11), kjer je razvidno, da je ločba

spojin v prvih 20 minutah analize pri smrekovem medu, ki spada med temnejše medove, slabša.

Vsi vzorci medu so vsebovali *p*-kumarno kislino. Intervalli vrednosti za to fenolno kislino v vseh analiziranih vzorcih medu so bili v območju med 236 in 4931 µg/kg (preglednice 9 – 15). Na splošno je bila vsebnost *p*-kumarne kisline največja v vzorcih lipovega in cvetličnega medu, najmanj pa so jo vsebovali vzorci hojevega medu.

Klorogenska in elaginska kislina se v količinah nad mejo detekcije pojavljata le v nekaterih analiziranih vzorcih. Vzorci akacijevega medu teh dveh fenolnih kislin niso vsebovali.

Domnevno identificirani cimetno in β -fenilmlečno kislino smo določili v vseh vrstah medu. Vsebnost β -fenilmlečne kisline je bila v analiziranih vzorcih medu približno dvakrat večja kot vsebnost cimetne kisline. Najmanjše vsebnosti smo določili v vzorcih akacijevega medu, največ teh kislin pa so vsebovali vzorci hojevega, smrekovega in cvetličnega medu.

Ker vzorci slovenskega medu poleg identificiranih in kvantitativno ovrednotenih fenolnih spojin vsebujejo tudi nekatere druge, ki jih zaradi pomanjkanja standardov nismo mogli identificirati, v naši študiji nismo podali skupne vsebnosti fenolnih spojin, določenih s HPLC/MS, ker rezultati ne bi bili reprezentativni.

S HPLC analizo se poleg fenolnih spojin pogosto hkrati določa tudi vsebnost abscizinske kisline, ki je rastlinski hormon in kot rastni inhibitor služi za zaščito rastline v času suše in drugih sprememb v okolju. V vseh vrstah slovenskega medu smo v vseh analiziranih vzorcih identificirali ABA2 in domnevno tudi ABA1. Vsebnost ABA2 je bila v povprečju skoraj 3-krat večja kot vsebnost ABA1. Kot je razvidno iz preglednic 9 – 15, sta največ abscizinske kisline vsebovala lipov in cvetlični med, najmanj pa kostanjev in hojev med. Med vsemi analiziranimi vzorci medu pa glede na vsebnost ABA izstopa vzorec smrekovega medu (S28), v katerem smo določili ekstremno visoke vsebnosti ABA1 in ABA2 (8523 in 23664 µg/kg) v primerjavi z ostalimi vzorci različnih vrst medu. Vsebnost je bila za več kot 4-krat večja od druge najvišje vsebnosti abscizinske kisline, določene v vzorcu cvetličnega medu C13 (1868 µg/kg ABA1 in 5795 µg/kg ABA2). Visoki vsebnosti abscizinske kisline v tem vzorcu smrekovega medu bi bili lahko posledica izpostavljenosti dreves, na katerih so čebele nabirale mano, neugodnim vplivom okolja.

V preglednicah 26 in 27 je prikazana primerjava vsebnosti nekaterih fenolnih kislin, flavonoidov in abscizinske kisline v akacijevem in kostanjevem medu v naši raziskavi in nekaterih drugih raziskavah evropskih medov. Primerjava rezultatov iz različnih študij je otežena, ker raziskovalci uporabljajo različne tehnike ekstrakcije teh snovi iz medu kot tudi različne tehnike identifikacije in kvantitativne določitve. Tomás-Barberán in sod. (2001), Kenjerić (2004) ter Kenjerić in sod. (2007) so ekstrakcijo izvedli s pomočjo ionskega izmenjevalca Amberlita XAD-2 ter fenolne spojine identificirali in kvantitativno določili s HPLC z DAD detektorjem, medtem ko so Pulcini in sod. (2006) fenolne spojine ekstrahirali s SPE s pomočjo ekstrakcijskih kolon SDB-L za enkratno uporabo in za nadaljnjo analizo uporabili HPLC/MS/MS. Pojavljajo pa se seveda tudi razlike v številu identificiranih spojin, nabor analiziranih fenolnih spojin se namreč v različnih raziskavah lahko precej razlikuje.

Preglednica 26: Fenolni profil akacijevega medu različnega geografskega porekla
Table 26: Phenolic profile of acacia honeys of different geographical origin

| Spojina (µg/kg) | Slovenski med vir 1 (n = 10) | Hrvaški med vir 2 (n = 40) | Evropski medovi vir 3 (n = 7) | Italijanski med vir 4 (n = 1) |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| klorogenska kislina | m.d. | | | |
| kavna kislina | 106 – 616 | | 192 – 708 | |
| p-kumarna kislina | 423 – 3794 | | 176 – 674 | 1400 |
| elaginska kislina | m.d. | | m.d. – 252 | m.d. |
| miricetin | m.d. | m.d. | | m.d. |
| luteolin | 37 – 84 | 7 – 69 | m.d. – 323 | |
| kvercetin | 133 – 293 | 29 – 875 | m.d. – 5107 | 2950 |
| naringenin | m.d. – 113 | | | 820 |
| apigenin | 43 – 145 | 26 – 286 | m.d. | 190 |
| kamferol | 212 – 365 | 61 – 606 | m.d. – 347 | 380 |
| pinocembrin | 51 – 2019 | | 2297 – 18691 | 6000 |
| pinobanksin | 86 – 3392 | | 2383 – 23102 | |
| krizin | 70 – 1253 | 219 – 2995 | 390 – 4356 | 1560 |
| galangin | 28 – 1109 | 108 – 966 | | |
| ABA1 | 166 – 369 | | 15 – 478 | |
| ABA2 | 448 – 1959 | | 860 – 2007 | |

vir 1: naša raziskava; vir 2: Kenjerić in sod. (2007); vir 3: Tomás-Barberán in sod. (2001); vir 4: Pulcini in sod. (2006)
n: število vzorcev; m.d.: vsebnost pod mejo detekcije

Kenjerić (2004) ter Kenjerić in sod. (2007) so v hrvaškem akacijevem in kostanjevem medu identificirali in kvantificirali 6 flavonoidov (luteolin, kvercetin, apigenin, kamferol, krizin in galangin), v kostanjevem medu pa dodatno še flavonoid miricetin. V primeru akacijevega medu so proučevali tudi vpliv različnih letnikov in ugotovili, da je vsebnost flavonoidov večja v vzorcih medu, pridelanih v letu z višjimi temperaturami in manjšo količino padavin. Če primerjamo njihove rezultate z rezultati naše raziskave, ugotovimo, da so vsebnosti flavonoidov v primeru akacijevega medu med seboj primerljive. Tudi za hrvaški akacijev med je značilna odsotnost flavonoida miricetina, ki ga ni vseboval nobeden izmed 40-ih analiziranih vzorcev medu. Pri kostanjevem medu (preglednica 27) pa so glede vsebnosti posameznih flavonoidov opazne razlike. Vsebnosti kvercetina in apigenina so primerljive, ostali flavonoidi, to so luteolin, kamferol, krizin, galangin in zlasti miricetin, pa so bili v hrvaškem kostanjevem medu prisotni v večjih količinah, kot smo jih v kostanjevem medu določili v naši raziskavi.

Če primerjamo rezultate, ki jih za akacijev med navajajo Tomás-Barberán in sod. (2001), z rezultati naše raziskave, ugotovimo da ima slovenski akacijev med podobne vsebnosti kavne kisline ter kamferola, medtem ko je bilo luteolina, kvercetina, pinocembrina, pinobanksina in krizina v vzorcih slovenskega akacijevega medu manj, p-kumarne kisline pa več. V kostanjevem medu pa so Tomás-Barberán in sod. (2001) določili podobne vsebnosti krizina in večje vsebnosti pinocembrina ter pinobanksina v primerjavi z rezultati te študije, medtem ko kvercetina, kamferola in apigenina niso določili.

Preglednica 27: Fenolni profil kostanjevega medu različnega geografskega porekla
Table 27: Phenolic profile of chestnut honeys of different geographical origin

| Spojina (µg/kg) | Slovenski med vir 1 (n = 10) | Hrvaški med vir 2 (n = 9) | Evropski medovi vir 3 (n = 9) | Italijanski med vir 4 (n = 1) |
|--------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| kavna kislina | + | | m.d. – 1523 | |
| p-kumarna kislina | 871 – 1988 | | 8 – 1057 | 1160 |
| elaginska kislina | m.d. – 313 | | | 4920 |
| miricetin | m.d. – 22 | 240 – 1130 | | m.d. |
| luteolin | m.d. – 42 | m.d. – 120 | | |
| kvercetin | m.d. – 352 | 180 – 430 | m.d. | 1560 |
| naringenin | m.d. | | | m.d. |
| apigenin | 15 – 552 | 70 – 580 | m.d. | 60 |
| kamferol | 128 – 238 | 90 – 530 | m.d. | 130 |
| pinocembrin | 25 – 274 | | m.d. – 2701 | 2520 |
| pinobanksin | 23 – 1213 | | 986 – 9619 | |
| krizin | 40 – 450 | 210 – 720 | m.d. – 578 | 910 |
| galangin | 10 – 192 | 190 – 830 | | |
| ABA1 | 78 – 264 | | m.d. | |
| ABA2 | 151 – 709 | | m.d. | |

vir 1: naša raziskava; vir 2: Kenjerić, (2004); vir 3: Tomás-Barberán in sod. (2001); vir 4: Pulcini in sod. (2006)
n: število vzorcev; m.d.: vsebnost pod mejo detekcije

Pulcini in sod. (2006) so analizirali različne vrste italijanskega medu, akacijev, kostanjev, evkaliptusov, resin in sončnični med. Identificirali in kvantitativno določili so osem flavonoidov (apigenin, krizin, hesperetin, kamferol, miricetin, naringenin, pinocembrin in kvercetin) ter sedem fenolnih kislin (*p*-kumarno, galno, elaginsko, ferulno, homogentizinsko, mandljevo in vanilinsko). Vsebnosti *p*-kumarne in elaginske kisline ter flavonoidov apigenina, krizina, kamferola, miricetina, naringenina, pinocembrina in kvercetina za akacijev in kostanjev med so podane v preglednicah 26 oz. 27. Vsebnosti *p*-kumarne kisline ter flavonoidov apigenina in kamferola so podobne za slovenski in italijanski akacijev kot tudi kostanjev med. Vsebnosti pinocembrina in krizina, kot jih za akacijev in kostanjev med navajajo Pulcini in sod. (2006), pa so bile višje, kot smo jih določili v naši raziskavi.

Dimitrova in sod. (2007) so v 49 vzorcih evropskega medu različnega botaničnega izvora določili naslednje kisline: cimetno, *o*-kumarno, *m*-kumarno, *p*-kumarno, kavno, ferulno, benzojsko, salicilno, 3-hidroksibenzojsko, 4-hidroksibenzojsko, protokatehinsko, galno, siringinsko, vanilinsko, fenilocetno, β -fenilmlečno in *p*-hidroksifenilmlečno kislino. Zastopanost in vsebnost teh kislin v medu sta močno variirali glede na botanično poreklo medu. Rezultati vsebnosti fenolnih kislin za njihov akacijev, lipov in kostanjev med kažejo, da so vzorci kostanjevega medu na splošno vsebovali več fenolnih kislin v primerjavi s svetlejšima vrstama medu, akacijevim in lipovim medom. Za vse te vrste medu so tudi značilne dosti večje vsebnosti β -fenilmlečne kisline v primerjavi z našimi. Intervalli vsebnosti so znašali od 3,32 do 24,41 mg/kg za akacijev med, od 15,06 do 37,28 mg/kg za lipov med ter od 0,64 do 86,71 mg/kg za kostanjev med, medtem ko so vrednosti v slovenskem medu znatno nižje, najmanj β -fenilmlečne kisline vsebuje slovenski akacijev med, le od 86 do 546 µg/kg (preglednica 9). Vsebnosti cimetne in *p*-kumarne kisline, kot so jih določili Dimitrova in sod. (2007), so primerljive z rezultati naše študije. Vsebnosti

kavne kisline od 150 do 720 µg/kg, kot jih za šest vzorcev akacijevega medu navajajo Dimitrova in sod. (2007), so podobne našim, saj smo v slovenskem akacijevem medu določili od 106 do 616 µg/kg kavne kisline (preglednica 9).

Tomás-Barberán in sod. (2001) so obe izomeri abscizinske kisline določili v repičinem, resinem in akacijevem medu, v lipovem medu je bila prisotna samo ABA2, medtem ko v kostanjevem, rožmarinovem, evkaliptusovem, sončničnem in sivkinem medu abscizinske kisline niso določili. Vsebnosti ABA1 in ABA2 v akacijevem medu so primerljive z vrednostmi, ki so bile določene v naši raziskavi (preglednica 26). V slovenskih lipovih medovih je bila vsebnost ABA2 v območju od 1886 do 4211 µg/kg, medtem ko Tomás-Barberán in sod. (2001) za 4 vzorce lipovega medu navajajo vsebnosti od 449 do 5395 µg/kg medu.

Ferreres in sod. (1996) so raziskovali vsebnost abscizinske kisline v portugalskem resinem medu. Ugotovili so, da sta bili v vseh analiziranih vzorcih (22) prisotni obe obliki, ABA1 in ABA2, skupne vsebnosti so znašale od 25 do 167 mg/kg, izvor pa je nektar. Vsebnost ABA2 pa je bila skoraj 2-krat večja kot vsebnost ABA1. Ker do leta 1996 te spojine niso identificirali v kateri od drugih vrst medu, so omenjeni avtorji abscizinsko kislino označili kot koristen marker za ugotavljanje botaničnega porekla resinega medu.

Ker se posamezne vrste medu razlikujejo v sestavi in vsebnosti fenolnih spojin, so številni avtorji raziskovali, ali je mogoče določiti botanično poreklo medu s pomočjo t.i. markerjev – fenolnih spojin, značilnih za posamezno vrsto medu. Marker botaničnega porekla je lahko spojina, ki je prisotna v vseh analiziranih vzorcih medu iste vrste. Morebitna odsotnost take spojine bi tako pomenila drugačen izvor medu glede na botanično poreklo. Med markerje prištevamo tudi spojine, ki se pojavljajo samo v določeni vrsti medu – npr. flavonoid hesperetin kot marker za med iz citrusov (Ferreres in sod., 1993; Soler in sod., 1995; Andrade in sod., 1997). Marker botaničnega porekla medu pa je lahko tudi spojina, za katero je značilno, da je v določeni vrsti medu ni, torej bi prisotnost te spojine v medu pomenila, da gre za mešan med. Za potrditev določene spojine kot markerja za botanično poreklo medu pa so potrebne analize čim večjega števila vzorcev medu iste vrste.

Tomás-Barberán in sod. (2001) so s pomočjo HPLC in DAD detektorja analizirali fenolni profil evropskih vrstnih medov z namenom poiskati morebitne markerje za določitev botaničnega porekla medu. Končne ugotovitve omenjene študije so, da je fenolni profil lahko v pomoč pri določitvi botaničnega porekla nekaterih vrst medu, npr. kostanjevega, lipovega, evkaliptusovega, resinega in repičinoga medu. Nekateri medovi, kot sta akacijev in sivkin, pa značilnih markerjev nimajo, zato pri njih določitev botaničnega porekla, z vsebnostjo posameznih flavonoidov, ni mogoča.

Dimitrova in sod. (2007) so iz rezultatov prisotnosti in vsebnosti fenolnih kislin v različnih vrstah medov ugotovili, da lahko kot markerje za morebitno določitev botaničnega porekla medu uporabimo nekatere fenolne kisline. 4-hidroksibenzojska, *p*-hidroksifenilmlečna, ferulna in fenilocetna kislina bi bile lahko primerne kot markerji za določitev botaničnega porekla kostanjevega medu. Fenilocetna, β -fenilmlečna in benzojska kislina so lahko morebitni markerji za resin med. Derivati benzojske kisline so specifični za evkaliptusov med, medtem ko so derivati cimetne kisline lahko v pomoč pri identifikaciji akacijevega

medu. Za lipov med je značilna prisotnost 3-hidroksibenzojske kisline in odsotnost *o*-kumarne in *m*-kumarne kisline. Kot markerji za določitev botaničnega porekla sončničnega medu pa bi bile lahko primerne *p*-kumarna, ferulna in kavna kislina, ki so bile prisotne v vseh analiziranih vzorcih, medtem ko β -fenilmlečne in *o*-kumarne v vzorcih sončničnega medu ni bilo, ugotavlja Dimitrova in sod. (2007).

Kar se tiče prisotnosti morebitnih markerjev za ugotavljanje botaničnega porekla slovenskega medu, smo na podlagi dobljenih rezultatov ugotovili, da v slovenskem medu le-teh ni oz. bi bilo potrebno nadaljevati zastavljeno delo in identificirati in kvantitativno določiti tudi nekatere druge spojine, ki niso bile zajete v naši raziskavi, ker nismo imeli standardnih spojin.

V vseh analiziranih vzorcih medu so bili prisotni flavonoidi, ki izvirajo iz propolisa, to so pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin. Njihova vsebnost v medu je lahko zelo različna, ker je odvisna od prisotnosti propolisa v medu. Ti flavonoidi zato niso primerni kot markerji za določanje botaničnega porekla medu. Večji pomen pri določanju botaničnega porekla medu imajo lahko flavonoidi, ki izvirajo iz peloda in/ali nektarja, to so kamferol, kvercetin, apigenin in luteolin. Flavonoid kamferol se pojavlja v vseh vrstah slovenskega medu, identificirali smo ga v vseh analiziranih vzorcih v različnih količinah, zato kot marker ni primeren. Nekateri tuji raziskovalci (Gil in sod., 1995) so kamferol označili kot potencialni marker za rožmarinov med. Prisotnost tega flavonoida v medu ni kriterij za identifikacijo rožmarinovega medu, ker se ta flavonoid pojavlja tudi v nektarju drugih medonosnih rastlin. Vendar pa lahko njegova odsotnost v rožmarinovem medu oz. vsebnost nižja od 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kažeta na drugačen izvor medu.

Zanimiva je spojina z molsko maso 302,23 g/mol in m/z vrednostjo 301,01. Predvidevamo, da bi lahko šlo za flavonoid tricetin. Te spojine analizirani vzorci akacijevega, lipovega in cvetličnega medu niso vsebovali. Nasprotno je bila prisotna v vseh vzorcih smrekovega, hojevega in gozdnega medu ter v šestih vzorcih kostanjevega medu. Glede na prisotnost te spojine v različnih vrstah slovenskega medu sklepamo, da je njen izvor mana.

Martos in sod. (2000a) so v svoji raziskavi določili tricetin kot marker za botanično poreklo evkaliptusovega medu. Tricetin so identificirali na podlagi UV, NMR in MS spektrov in naj bi izviral iz nektarja. Te spojine isti avtorji niso identificirali v drugih vrstah medu, kot so akacijev, lipov, kostanjev, repičin, rožmarinov in drugi medovi. V nizkih koncentracijah so ga določili le v nekaterih vzorcih portugalskega resinega medu, vendar so s pelodno analizo ugotovili, da je bil ta med kontaminiran z evkaliptusom. D'Arcy in sod. (2005) so tricetin določili v nekaterih drugih vrstah avstralskega medu.

Za morebitno določitev botaničnega porekla slovenskega medu na podlagi vsebnosti posameznih fenolnih kislin in flavonoidov, bi bilo zato namesto ene specifične spojine – markerja, verjetno bolj primerno upoštevati razlike v celotnem fenolnem profilu. Do enakih zaključkov so v svoji raziskavi fenolnega profila italijanskega medu prišli tudi Pulcini in sod. (2006). Ker smo v naši študiji analizirali le 10 vzorcev vsake vrste medu in so dobljeni rezultati zelo variabilni, bi bile potrebne nadaljnje analize večjega števila vzorcev posameznih vrst slovenskega medu. Potrebno bi bilo zagotoviti čim več standardnih spojin, v primeru nedostopnosti ustreznih standardov pa za identifikacijo neznanih spojin v vzorcih medu uporabiti tudi tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS).

Tomás-Barberán in sod. (2001) navajajo, da je lahko dodatno orodje za določanje botaničnega porekla medu tudi prisotnost in vsebnost abscizinske kislina v medu, vendar je bila le-ta prisotna v vseh analiziranih vzorcih različnih vrst slovenskega medu v obeh oblikah, *trans-trans* (ABA1) in *cis-trans* (ABA2). Abscizinska kislina spada med rastlinske hormone in kot rastni inhibitor služi za zaščito rastline v času suše in drugih sprememb v okolju in zato kot marker verjetno sploh ni primerna.

5.1.4 Antioksidativna učinkovitost medu

AU vzorcev slovenskega medu smo določili z dvema metodama, DPPH in FRAP, ki se zelo pogosto uporablja za določanje AU različnih živil, tudi medu. Z DPPH metodo določamo AU, izraženo kot sposobnost lovljenja radikalov in spektrofotometrično spremljamo izginjanje barve (stopnjo bledenja) stabilnega radikala DPPH[•], ki se v reakciji z antioksidativnimi učinkovinami vzorcev reducira in nastali produkt ima manjšo absorbanco. AU medu smo izrazili z IC₅₀ – koncentracijo učinkovitosti, ki je potrebna za 50 % inhibicijo radikala DPPH[•]. Z večanjem AU se vrednost IC₅₀ zmanjšuje.

FRAP metoda deluje na osnovi sposobnosti fenolnih spojin, da reducirajo Fe³⁺ do Fe²⁺. Rezultati so podani kot FRAP vrednosti (μM Fe(II)) 10 % raztopine medu. Ob primerjavi rezultatov AU medu, pridobljenih z različnima metodama smo ugotovili, da pridemo do enakih zaključkov. AU posameznih vrst slovenskega medu je, ne glede na uporabljeno metodo, naraščala v naslednjem vrstnem redu: akacijev < lipov < cvetlični < kostanjev < gozdni < smrekov < hojev med (preglednica 16). Akacijev med, katerega AU je bila najmanjša, je imel najvišjo povprečno vrednost IC₅₀ ter najnižjo povprečno FRAP vrednost, medtem ko smo v hojevem medu, ki je imel največjo AU, določili najnižjo povprečno vrednost IC₅₀ ter najvišjo povprečno FRAP vrednost.

Koefficient korelacije za zvezo med uporabljenima metodama za določanje antioksidativne učinkovitosti medu je znašal 0,878 (slika 18), kar kaže na tesno povezanost obeh metod. Podobne koreacijske koeficiente, ki kažejo močno zvezo med DPPH in FRAP metodo pri analizi medu in ostalih živil navajajo tudi drugi raziskovalci (Beretta in sod., 2005; Surveswaran in sod., 2007; Vasco in sod., 2008).

Primerjava rezultatov AU slovenskega medu, ki je bila tudi predmet naše študije, z rezultati tujih raziskav je težko izvedljiva, saj za določanje antioksidativne aktivnosti medu ni neke standardizirane metode. Raziskovalci najpogosteje uporabljajo DPPH, FRAP, ABTS in ORAC metodo, ki temeljijo na različnih principih in eksperimentalnih pogojih. Problem, ki se pojavlja pa je, da so pogosto vključene različne modifikacije iste metode, zato so rezultati različnih študij med seboj težko primerljivi.

Uporabljeni metodi za določanje AU slovenskega medu smo povzeli po italijanskih avtorjih (Beretta in sod., 2005), ki so v svoji raziskavi ugotovili, da se različne vrste medu med seboj značilno razlikujejo glede na njegovo AU, koreacijski koeficient za zvezo med DPPH in FRAP metodo je znašal 0,889. FRAP vrednost vzorca akacijevega medu (79,5 μM Fe(II)), kot so jo določili Beretta in sod. (2005), je primerljiva z rezultati naše študije, kjer so bile FRAP vrednosti akacijevega medu v območju med 43,2 do 91,4 μM Fe(II). Za cvetlični, kostanjev in manin med so italijanski raziskovalci določili nekoliko višje FRAP vrednosti, kar je lahko posledica analize samo enega vzorca medu vsake vrste, zato njihovi rezultati niso reprezentativni.

Blasa in sod. (2006) so s FRAP metodo določali AU akacijevega in cvetličnega medu, cvetlični med je imel v primerjavi z akacijevim medom večjo AU, kar je značilno tudi za slovenski med.

Küçük in sod. (2007) so preučevali AU turškega kostanjevega, cvetličnega in rododendronovega medu. Najvišjo sposobnost redukcije feri ionov, izraženo kot FRAP vrednost, so določili v kostanjevem medu, AU cvetličnega medu pa je bila nižja. Tudi slovenski kostanjev med je imel večjo antioksidativno učinkovitost kot cvetlični med.

Gheldorf in sod. (2002) so določali antioksidativno aktivnost ameriškega medu različnega botaničnega porekla z ORAC metodo. Med vsemi analiziranimi vrstami medu je bila, enako kot v naši raziskavi, najmanjša AU določena v akacijevem medu.

V naši študiji smo določili tudi AU smrekovega in hojevega medu, ki izvirata iz mane in sta značilna za Slovenijo in za katera v tuji literaturi nismo našli podatkov o AU. Rezultati za AU teh dveh vrst medu so primerljivi z AU medov, ki jih tuji raziskovalci opredeljujejo kot medove iz mane.

Ker medu običajno ne uživamo popolnoma svežega, ampak šele nekaj časa po pridobivanju, smo raziskovali tudi vpliv skladiščenja na antioksidativno učinkovitost medu. Rezultati so pokazali, da je bila AU po enoletnem skladiščenju v temi na sobni temperaturi v vseh 56-ih vzorcih medu večja od začetne vrednosti, odstotek zvišanja je znašal od 3,3 do 12,8 %, povprečno 7,4 % (preglednica 17). To je bilo v nasprotju z našimi predvidevanji, saj smo pričakovali, da se bo AU medu s časom zmanjševala. Raziskav o vplivu skladiščenja na AU medu je zelo malo, v njih pa raziskovalci poročajo, da se AU medu s časom zmanjšuje (Wang in sod., 2004; Nagai in sod., 2006). Razlog za povečanje AU je lahko tvorba produktov Maillardove reakcije, ki delujejo antioksidativno (Turkmen in sod., 2006). Maillardova reakcija je zelo kompleksna in vodi do različnih razgradnih produktov, ki bi lahko prispevali k povečanju AU medu, vendar jih je težko ovrednotiti, zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Večjo AU, določeno s FRAP metodo, po določenem času skladiščenja, so določili v borovnicah (Connor in sod., 2002). Podobno so, Hukkanen in sod. (2006), večjo AU (DPPH metoda) določili v plodovih jerebik po enoletnem oz. dvoletnem skladiščenju.

5.1.5 Barva

Barvo smo analiziranim vzorcem medu izmerili instrumentalno s pomočjo kromametra Minolta v CIE L^* a^* b^* sistemu, ki je splošno znan sistem za merjenje barve živil. Parameter L^* določa svetlost živila, parameter a^* intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem, parameter b^* pa intenziteto rumene barve v pozitivnem in modre v negativnem območju. Povprečne vrednosti parametra L^* v vzorcih različnih vrst medu so se gibale od 64,3 pri akacijevem medu do 41,5 pri hojevem medu. González-Miret in sod. (2005) so vzorce medu razvrstili v 2 skupini glede na njihovo L^* vrednost: svetlejše vrste medu ($L^* > 50$) in temnejše vrste medu ($L^* \leq 50$). Če upoštevamo tako klasifikacijo, lahko slovenski akacijev, lipov in cvetlični med, ki so imeli povprečno vrednost L^* parametra nad 50, prištevamo v skupino svetlejših medov, ostale vrste medu, to so

kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med, s povprečnimi vrednostmi L^* parametra pod 50, pa v skupino temnejših medov (slika 19). Od svetlejših vrst medu so imeli vsi analizirani vzorci medu L^* vrednost višjo od 50. Pri temnejših vrstah, kostanjevem, smrekovem, hojevem in gozdnem medu, pa ima 5 vzorcev medu $L^* > 50$. Sem spadajo 3 vzorci kostanjevega medu letnika 2004, katerih L^* vrednosti so znašale 51,49 (vzorec K7), 53,35 (vzorec K9) in 51,28 (vzorec K12) ter 2 vzorca gozdnega medu, od katerih je imel vzorec G7 L^* vrednost 50,70, vzorec G19 pa 50,33.

Iz izmerjenih a^* in b^* parametrov barve naših medov sklepamo, da so analizirani vzorci medu vsebovali rumene, rdeče in zelene komponente. Rumena barva je posledica večje količine karotenoidov v nektarju, medtem ko dajejo rdečo barvo v nektarju prisotni flavonoidi in antocianini. Med, v katerem prevladuje zelena barva, nastane iz nektarja, ki vsebuje veliko klorofila (Piotraszewska-Pajak in Ciszak, 2001). Zelene komponente (negativne vrednosti parametra a^*) so bile prisotne v vseh vzorcih akacijevega in lipovega medu ter v 12 vzorcih cvetličnega medu. Povprečne vrednosti parametra a^* so znašale -2,61 za akacijev med, -2,83 za lipov med in 0,98 za cvetlični med. V temnejših vrstah medu so bile povprečne vrednosti parametra a^* zelo podobne in so znašale 8,74 za hojev med, 9,00 za gozjni med, 9,15 za kostanjev med in 9,80 za smrekov med (priloga E1). Za smrekov, kostanjev in gozjni med je značilen rdečkast odtenek barve, zato so bile najvišje vrednosti parametra a^* v teh vrstah medu pričakovane.

Največjo intenzivnost rumene barve je imel cvetlični med, saj smo tej vrsti medu določili največjo povprečno vrednost parametra b^* , in sicer 43,15. Nektar cvetočih rastlin vsebuje karotenoidne pigmente, kar ima za posledico intenzivno rumeno obarvanje te vrste medu. Po padajočih povprečnih vrednostih parametra b^* so sledili kostanjev (38,91), smrekov (35,83), gozjni (34,61), hojev (32,14), lipov (31,74) in akacijev (18,71) med (priloga E1).

Primerjava s tujo literaturo (Piotraszewska-Pajak in Ciszak, 2001; González-Miret in sod., 2005) je pokazala, da se vrednosti parametra a^* , kot tudi b^* , za iste vrste medu znatno razlikujejo. Ta pojav lahko razložimo s tem, da rastline izvirajo iz različnih geografskih področij. Na rast in posledično tvorbo pigmentov, kateri prispevajo k rdeči in rumeni barvi (antocianini, karotenoidi), lahko vplivajo tudi spremenljive podnebne razmere. Razlike so lahko tudi posledica različne izvedbe instrumentalnega merjenja barve medu.

Nekateri raziskovalci (Mateo Castro in sod., 1992; Terrab in sod., 2004) navajajo, da se razlike v sestavi medu in njegovem botaničnem poreklu odražajo v njegovi barvi, zato se lahko instrumentalno merjenje barve medu uporablja za identifikacijo botaničnega porekla. Naši rezultati so pokazali, da na osnovi instrumentalnega merjenja barve lahko razlikujemo med akacijevim, lipovim, cvetličnim medom in skupino temnejših vrst medu, kamor glede na določene vrednosti L^* parametra, spadajo kostanjev, smrekov, hojev in gozjni med.

Barvo medu smo določili tudi spektrofotometrično in jo izrazili kot neto absorbanci. Nižje vrednosti neto absorbance so imele svetlejše vrste medu, višje pa so dosegli temnejši medovi. Najvišjo povprečno vrednost neto absorbance smo izmerili v kostanjevem medu (481), sledili so gozjni (424), smrekov (389), hojev (388), cvetlični (283), lipov (157) in akacijev med (74) (priloga E1). Razlike med vrednostmi neto absorbanc za različne vrste medu so pokazatelji različnih vsebnosti pigmentov, prisotnih v medu (klorofilov, karotenoidov, antocianinov). Opravili smo tudi korelacijsko analizo med neto absorbanco

in parametrom L^* , ki je pokazala tesno zvezo ($R = -0,870$) med metodama določanja barve posameznih vrst medu. Spremenljivki sta bili med seboj v obratnosorazmerni povezavi (višja je bila vrednost parametra L^* medu, nižjo vrednost neto absorbance je imel vzorec, kar pomeni da je bil med svetlejši).

Beretta in sod. (2005), po katerih smo povzeli metodo za določanje neto absorbance, so v svoji študiji navedli naslednje vrednosti neto absorbanc: 25 za akacijev med, 415 za cvetlični med, 610 za kostanjev med in 466 za manin med. Razlike v vrednostih lahko pripisemo različnosti vzorcev in vplivom geoklimatskih dejavnikov, ki vplivajo na sam razvoj rastline in posledično na tvorbo pigmentov. Upoštevati pa je treba tudi dejstvo, da so italijanski raziskovalci analizirali le po en vzorec medu vsake vrste, naši rezultati pa so povprečne vrednosti večjega števila vzorcev medu določene vrste. Tako da vrednosti, ki so jih navedli Bereta in sod. (2005) za akacijev, cvetlični, kostanjev in manin med, padejo v območja vrednosti neto absorbance istih vrst slovenskega medu.

5.1.6 Vpliv letnika medu na analizirane parametre

Vzorce medu smo zbirali v treh zaporednih letih, zato smo želeli raziskati tudi morebiten vpliv leta pridelave medu na nekatere analizirane parametre. Iz preglednic 18 in 19 je razvidno, da obstajajo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin, antioksidativni učinkovitosti in barvi, kot tudi v vsebnosti nekaterih fenolnih spojin in *cis-trans* abscizinske kisline posameznih vrst medu glede na letnik.

Razlike v barvi nekaterih vrst medu različnih letnikov so lahko posledica spremenljivih sezonskih razmer, npr. količine padavin in temperaturnih nihanj ter vsebnosti pigmentov v samih rastlinah. Barva akacievega in smrekovega medu je bila med vzorci medu različnih letnikov zelo podobna, saj ni bilo opaznih razlik v povprečni vrednosti parametra L^* , ki določa svetlost vzorca, za posamezno vrsto medu. Ostali medovi so se v barvi med seboj razlikovali, majhne razlike so bile opazne pri vrednosti parametra L^* pri cvetličnem in gozdnem medu različnih letnikov. V primeru lipovega, kostanjevega in hojevega medu pa so bile razlike v barvi, glede na leto pridelave medu, bolj očitne, saj so bile L^* vrednosti različnih letnikov za posamezno vrsto medu precej različne. Lipov med letnika 2004 je bil v primerjavi z lipovim medom letnika 2006 svetlejše barve, saj je imel v povprečju višjo L^* vrednost. Lipov med spada med mešane nektarno-manine medove. Glavni razlog za razlike v svetlosti lipovega medu različnih letnikov je verjetno v tem, da so bili medovi letnika 2004 večinoma nektarnega izvora, medtem ko so bili vzorci zbrani v letu 2006 tudi maninega izvora, kar smo opazili pri senzorični analizi.

Večinoma velja, da so vzorci iste vrste medu različnih letnikov, ki so bili svetlejši, vsebovali tudi manj skupnih fenolnih spojin in imeli manjšo antioksidativno učinkovitost. Izjemi sta bili akacijev in gozdni med. Vsebnost skupnih fenolnih spojin in AU akacievega medu v letih 2004 in 2005 sta bili, kljub enaki povprečni vrednosti L^* parametra, različni. Gozdni medovi letnika 2004 so, v primerjavi z vzorci te vrste medu iz leta 2005, vsebovali več skupnih fenolnih spojin, imeli večjo AU ter višjo vrednost L^* kot vzorci letnika 2005.

Pri ločeni obravnavi rezultatov vsebnosti nekaterih fenolnih spojin in abscizinske kisline glede na leto pridelave medu smo ugotovili, da obstajajo določene razlike. Kljub temu predvidevamo, da na razlike, bolj kot različen letnik medu, vpliva različnost vzorcev. V primeru flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa, kot so pinocembrin, krizin in galangin, pa predvsem vsebnost propolisa v medu.

5.1.7 Korelacijske analize

S pomočjo korelacijske analize smo med parametri, analiziranimi v naši raziskavi, žeeli potrditi oz. zavreči obstoj različnih medsebojnih povezav.

Med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, določeno s Folin-Ciocalteujevo metodo, in vsoto posameznih fenolnih spojin, določenih s HPLC/MS, ni bilo statistično značilne povezave, saj je koeficient korelacije znašal samo 0,082. To smo pričakovali, saj s HPLC/MS analizo zaradi pomanjkanja standardov nismo uspeli identificirati in kvantitativno določiti številnih fenolnih spojin, ki jih med tudi vsebuje.

Prav tako niso obstajale statistično značilne korelacije med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, določeno s FC metodo, in posameznimi fenolnimi spojinami.

Ugotavljalci smo tudi povezave med individualnimi spojinami, analiziranimi s HPLC/MS. Korelacijski koeficienti so bili visoki pri zvezah med flavonoidi, ki izvirajo iz propolisa, to so pinocembrin, pinobanksin, krizin, galangin, njihove vrednosti so bile večje od 0,7. Zelo močni sta bili tudi zvezi med izomerama abscizinske kisline ($R_{ABA1/ABA2} = 0,974$) ter med cimetno in β -fenilmlečno kislino ($R_{CIM/FM} = 0,991$).

Za statistično značilno in močno se je pokazala tudi zveza med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo medu. Visoki vrednosti korelacijskih koeficientov za zvezo med AU (FRAP metoda) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ($R = 0,960$) ter za zvezo med AU (DPPH metoda) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ($R = 0,920$) (slika 22), dokazujeta, da so fenolne spojine odgovorne za antioksidativno učinkovitost medu. Do enake ugotovitve so prišli tudi številni drugi avtorji, ki so raziskovali omenjene povezave v medu in drugih živilih.

FC metoda, ki se uporablja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin, v osnovi temelji na reakciji prenosa elektronov, podobno kot FRAP metoda (Huang in sod., 2005). To vsaj deloma razloži visoke korelacijske koeficiente med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AU v medu (Aljadi in Kamaruddin, 2004; Beretta in sod., 2005; Blasa in sod., 2005) in nekaterih ostalih analiziranih živilih (Bahorun in sod., 2004; Hukkanen in sod., 2006; Stratil in sod., 2006; Othman in sod., 2007; Surveswaran in sod., 2007). V večini primerov je bila zveza med AU, določeno s FRAP metodo, in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin linearja, nasprotno pa so Blasa in sod. (2006) ugotovili, da je omenjena povezava eksponentna, saj je v njihovi raziskavi AU začela strmo naraščati, ko je vsebnost skupnih fenolnih spojin presegla 110 mg/kg medu. Tak rezultat bi lahko bil posledica majhnega števila analiziranih vzorcev medu (4 vzorci akacijevega in 4 vzorci cvetličnega medu).

Iskali smo tudi korelacijske analize med AU, določeno z dvema metodama, in posameznimi fenolnimi spojinami, določenimi s HPLC/MS (preglednica 23). Zveze niso bile močne, saj so bile vrednosti korelacijskih koeficientov nizke. Naše ugotovitve potrjujejo Baltrušaitytė in sod. (2007), ki navajajo, da so bile korelacijske analize med AU, določeno z DPPH metodo, in

kamferolom, krizinom, apigeninom ter *p*-kumarno kislino šibke, vrednosti korelacijskih koeficientov so znašale od 0,07 do 0,28.

Povezave med barvo medu (parametra L^* in a^* ter neto absorbanca), vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, določeno s FC metodo in AU, določeno z DPPH oz. FRAP metodo so bile, kot smo pričakovali, statistično značilne, korelacijski koeficienti so se gibali od 0,819 do -0,924. Naši rezultati so v skladu z navedbami drugih avtorjev (Frankel in sod., 1998; Beretta in sod., 2005; Pérez in sod., 2007), ki prav tako ugotavljajo, da je barva v tesni povezanosti z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AU medu.

Beretta in sod. (2005) so želeli postaviti zanesljive in enostavne smernice za standardizacijo antioksidativnih lastnosti medu različnega geografskega in botaničnega porekla s kombinacijo različnih metod. Rezultati njihove študije kažejo, da je samo z uporabo različnih testov za določanje AU, primerjalno analizo in uporabo kemometrijskih metod, kot je npr. PCA (Principal Component Analysis – Metoda glavnih komponent), mogoče doseči natančno osnovo za karakterizacijo antioksidativne učinkovitosti medu, kar je pomembno za razumevanje njegove terapevtske učinkovitosti. Določali so intenzivnost barve medu, vsebnost skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo ter AU s tremi metodami, DPPH, FRAP in ORAC. Ugotovili so, da se različne vrste medu med seboj značilno razlikujejo v vrednostih posameznih parametrov, korelacije med analiziranimi parametri pa so bile visoko statistično značilne.

Vela in sod. (2007) so preučevali AU medu in korelacije le-te z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in nekaterimi drugimi fizikalno-kemijskimi parametri. Analizirali so 36 vzorcev španskega medu, od tega 19 vzorcev nektarnega izvora in 17 vzorcev medu iz mane. Določili so AU z DPPH metodo, vsebnost skupnih fenolnih spojin, pepela in kislin, vrednost pH, električno prevodnost in barvo medu kot neto absorbanco. Za medove iz mane so značilne višje vrednosti teh parametrov. Dokazali so tudi, da obstajajo značilne korelacije med AU medu in omenjenimi parametri, Pearsonovi korelacijski koeficienti so znašali od 0,658 do 0,888. Ker je korelacijski koeficient med AU medu in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin znašal $0,706 (R^2 < 0,5)$ španski raziskovalci ugotavljajo, da so fenolne spojine, prisotne v medu, za njegovo AU odgovorne le deloma, očitno vplivajo tudi drugi dejavniki. Isti avtorji so ločeno obravnavali tudi korelacije med temi parametri posebej za nektarne in manine medove. Ugotovili so, da je pri nektarnih medovih AU v povezavi z barvo in kislostjo medu, pri maninah medovih pa je značilna le povezava med AU in električno prevodnostjo. Neznačilno povezavo med AU in barvo medu pri maninah medovih so razložili s širokim razponom barve maninih medov. V primeru slovenskega medu glede na izvor medu ločimo nektarne, manine in nektarno-manine medove. Med nektarne medove spadata akacijev in cvetlični med, med manine smrekov, hojev in gozdni med, nektarno-manine vrste medu pa predstavlja lipov in kostanjev med. Pri ločeni obravnavi teh treh skupin medu, glede na njegov izvor, smo zaključili, da so bile vrednosti korelacijskih koeficientov (preglednica 28) za zveze med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, AU, barvo in električno prevodnostjo najvišje v skupini nektarnih in nektarno-maninih medov, vrednosti korelacijskih koeficientov so bile za posamezne zveze zelo podobne. Za manin med so bili korelacijski koeficienti nižji, velike razlike so bile opazne za zvezo med dvema metodama za določanje AU medu, za zveze med L^* vrednostjo barve

medu in ostalimi parametri ter za zveze med električno prevodnostjo medu in ostalimi parametri.

Preglednica 28: Pearsonovi korelacijski koeficienti med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, AU, barvo in električno prevodnostjo glede na izvor medu

Table 28: Pearson correlation coefficients between total phenolic content, AU, colour and electrical conductivity of honey regarding the origin of honey

| Zveza | Izvor medu | | | |
|--|-----------------|-----------------|-------------------------|-------------------|
| | nekter (A+C) | mana (S+H+G) | nekter in mana (L+K) | vse vrste medu |
| skupne fenolne spojine / AU (FRAP) | 0,964 | 0,892 | 0,955 | 0,960 |
| skupne fenolne spojine / AU (DPPH-1/IC ₅₀) | 0,899 | 0,652 | 0,898 | 0,920 |
| skupne fenolne spojine / L [*] | -0,957 | -0,453 | -0,930 | -0,924 |
| skupne fenolne spojine / χ | 0,917 | 0,495 | 0,857 | 0,817 |
| AU (FRAP) / AU (DPPH-1/IC ₅₀) | 0,904 | 0,541 | 0,871 | 0,878 |
| AU (FRAP) / L [*] | -0,954 | -0,478 | -0,931 | -0,920 |
| AU (FRAP) / χ | 0,903 | 0,538 | 0,865 | 0,843 |
| AU (DPPH-1/IC ₅₀) / L [*] | -0,865 | -0,176 | -0,815 | -0,845 |
| AU (DPPH-1/IC ₅₀) / χ | 0,822 | 0,463 | 0,825 | 0,742 |
| L [*] / χ | -0,897 | -0,320 | -0,866 | -0,812 |

χ : električna prevodnost, A: akacijev med, C: cvetlični med, S: smrekov med, H: hojev med, G: gozdni med, L: lipov med, K: kostanjev med

Kljub ugotovitvam nekaterih drugih raziskovalcev, ki so ugotovili povezanost vsebnosti skupnih fenolnih spojin v medu in AU medu z vsebnostjo prolina (Meda in sod., 2005; Pérez in sod., 2007) in beljakovin v medu (Gheldorf in sod., 2002), te korelacijske v primeru slovenskih medov niso bile močne. V primeru korelacji s prolinom lahko govorimo le o šibki povezanosti, saj so bile vrednosti korelacijskih koeficientov v območju od 0,243 do 0,376 (pregl. 25). Meda in sod. (2005) so ugotovili, da je bila korelacija med AU, določeno z DPPH metodo, in vsebnostjo prolina ($R = 0,75$) celo bolj značilna kot korelacija med AU in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin ($R = 0,5$), kar pa ni značilno za slovenski med. Pérez in sod. (2007) za zvezo med vsebnostjo prolina in AU medu, določeno z DPPH metodo, navajajo korelacijski koeficient 0,571. Korelacijske med vsebnostjo beljakovin ter AU slovenskega medu pa kažejo zmerno povezanost, korelacijskih koeficientov sta znašala 0,475 za zvezo med vsebnostjo beljakovin in AU, določeno s FRAP metodo, oz. 0,561 za zvezo med vsebnostjo beljakovin in AU, določeno z DPPH metodo (preglednica 25).

Ameriški raziskovalci (Gheldorf in sod., 2002) so za zvezo med vsebnostjo beljakovin v medu in njegovo AU, določeno z ORAC metodo, določili korelacijski koeficient z vrednostjo 0,821, medtem ko Pérez in sod. (2007) za zvezo med vsebnostjo beljakovin in AU, določeno z DPPH metodo, navajajo vrednost korelacijskega koeficienta le 0,300.

Zanimala nas je tudi povezava med vsebnostjo fenolnih spojin v medu, njegovo AU in barvo (parametra L^{*} in a^{*} ter neto absorbanca) ter nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri medu, kot so električna prevodnost, vrednost pH in vsebnost skupnih kislin. Vse zveze med omenjenimi parametri so bile statistično značilne pri $0,01 < R \leq 0,05$ stopnji tveganja, razlikujejo pa se v jakosti povezave (preglednica 25). Električna prevodnost kaže močno povezanost ($R > \pm 0,7$), vrednost pH zmerno povezanost ($\pm 0,4 < R \leq \pm 0,7$), vsebnost skupnih kislin pa le šibko povezanost ($\pm 0,2 < R \leq \pm 0,4$) z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, AU ter parametri barve medu.

5.1.8 Zaključne ugotovitve

Z našo raziskavo na slovenskih medovih smo potrdili dosedanje ugotovitve tujih raziskovalcev, da se medovi različnega botaničnega izvora razlikujejo po vsebnosti skupnih fenolnih spojin, antioksidativni učinkovitosti in barvi ter imajo podoben toda kvantitativno različen fenolni profil.

Z rezultati študije smo potrdili naslednje postavljene hipoteze:

- med različnimi vrstami slovenskega medu obstajajo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin, določeni z modificirano FC metodo, kot tudi razlike v antioksidativni učinkovitosti posameznih vrst medu,
- temnejši medovi (kostanjev, smrekov, hojev in gozdn) so vsebovali več skupnih fenolnih spojin in imeli višjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi s svetlejšimi vrstami medu (akacijev, lipov in cvetlični),
- z uporabo dveh različnih metod, DPPH in FRAP, smo dobili podobne rezultate za antioksidativno učinkovitost analiziranih vrst medu,
- vsebnost skupnih fenolnih spojin se je med enoletnim skladiščenjem le malo zmanjšala v večini analiziranih vzorcev,
- zveze med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v medu, njegovo antioksidativno učinkovitostjo in barvo so bile statistično značilne in močne.

Zavrnjene hipoteze pa so bile naslednje:

- z dobljenimi rezultati fenolnega profila različnih vrst slovenskega medu nismo uspeli dokazati obstoja tipičnih spojin – markerjev, ki bi bili v pomoč pri določitvi botaničnega porekla nekaterih vrst medu,
- pričakovali smo, da se bo antioksidativna učinkovitost medu s časom zmanjševala, vendar je bila AU, določena s FRAP metodo, po enoletnem skladiščenju v vseh vzorcih medu v povprečju za 7,4 % večja od začetne vrednosti.

Predlogi za nadaljnje delo:

Naša raziskava daje prvi podrobni vpogled v polifenolno sestavo slovenskega medu, vendar bi bilo začeto delo potrebno nadaljevati. Nadaljnje delo na področju analitike določanja fenolnih spojin v medu bi moralo vključevati:

- optimizacijo SPE metode za ekstrakcijo fenolnih kislin iz medu ter njihovo identifikacijo in kvantitativno določitev s HPLC/MS,
- analizo čim večjega števila vzorcev različnih vrst medu za potrditev dobljenih rezultatov,
- potrditev fenolnih spojin, ki so bile v naši raziskavi samo domnevno identificirane, z ustreznimi standardnimi spojinami,
- identifikacijo in kvantitativno določitev nekaterih drugih fenolnih spojin, ki jih med tudi vsebuje, vendar niso bile zajete v naši raziskavi, ker nismo imeli standardnih spojin.

Ker smo ugotovili, da je bila antioksidativna učinkovitost medu po enoletnem skladiščenju večja od začetne vrednosti, bi bilo potrebno poiskati razloge za njen povečanje. Raziskati bi bilo morebiten prispevek produktov Maillardove reakcije. Na povečanje antioksidativne učinkovitosti medu pa bi lahko vplivali tudi encimi, ki jih med vsebuje, zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin in vsebnosti posameznih fenolnih spojin v medu ter antioksidativne učinkovitosti in barve medu lahko podamo naslednje skele:

- Vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena s FC metodo, je odvisna od botaničnega porekla medu. Najmanjša je bila v akacijevem in lipovem medu, največja pa v medovih, ki izvirajo iz mane, smrekovem, hojevem in gozdnem medu.
- Uporabljena SPE metoda je primerna za ekstrakcijo flavonoidov iz medu.
- Vpeljana HPLC/MS metoda določanja fenolnih spojin v medu je dobro ponovljiva in je primerna za identifikacijo in določitev vsebnosti flavonoidov ter abscizinske kislino v različnih vrstah medu. Manj primerna je za določanje fenolnih kislin, za katere bi bilo potrebno uporabiti drugačne pogoje ekstrakcije in ločbe in morda tudi druge pogoje ionizacije. V nadaljnjih raziskavah fenolnega profila slovenskega medu bi bilo zato bolj primerno fenolne kisline analizirati ločeno od flavonoidov.
- Analizirani vzorci različnih vrst slovenskega medu imajo podoben, toda kvantitativno različen fenolni profil.
- V vzorcih različnih vrst slovenskega medu smo s pomočjo standardnih spojin določili *p*-kumarno, kavno, elaginsko in klorogensko kislino ter flavonoide miricetin, luteolin, kvercetin, naringenin, apigenin, kamferol, pinocembrin, krizin in galangin.
- Domnevno smo na podlagi molskih mas oz. m/z vrednosti – mas molekulskih negativno nabitih ionov identificirali tudi cimetno in β -fenilmlečno kislino ter flavonoide tricetin, fisetin, pinobanksin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol.
- Določili smo tudi dve nefenolni spojini, ki sta bili prisotni v vseh analiziranih vzorcih medu: *cis-trans* abscizinsko kislino (ABA2) ter domnevno tudi *trans-trans* abscizinsko kislino (ABA1).
- Vsi analizirani vzorci medu so vsebovali flavonoide, ki izvirajo iz propolisa, pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin. Njihova vsebnost v medu je bila zelo variabilna, ker je odvisna od vsebnosti propolisa v medu.
- Flavonoida kamferol in apigenin sta bila prisotna v vseh analiziranih vzorcih, kvercetin v večini analiziranih vzorcev, medtem ko so bili miricetin, luteolin in naringenin prisotni le v nekaterih analiziranih vzorcih medu.
- Akacijev, lipov in cvetlični med niso vsebovali domnevno identificiranega flavonoida tricetina, miricetina nismo določili v akacijevem in lipovem medu, kostanjev med ni vseboval flavonoida naringenina.

- Vsi vzorci so vsebovali *p*-kumarno, cimetno in β -fenilmlečno kislino, kavne kisline ni vseboval le en vzorec cvetličnega medu, medtem ko so klorogensko in elaginsko kislino vsebovali samo nekateri vzorci različnih vrst medu, z izjemo akacijevega medu, ki teh dveh fenolnih kislin ni vseboval.
- Različne vrste slovenskega medu nimajo specifičnih markerjev za morebitno določanje botaničnega porekla medu. Glede prisotnosti le-teh v slovenskem medu bi bilo potrebno nadaljnje delo z dodatnimi standardnimi spojinami.
- Za določanje botaničnega porekla medu na osnovi vsebnosti fenolnih spojin je, bolj kot prisotnost in vsebnost ene same spojine, pomembna sestava celotnega fenolnega profila medu.
- Dobljene rezultate o vsebnosti fenolnih spojin v različnih vrstah medu bi bilo potrebno potrditi z analizo večjega števila vzorcev medu.
- Domnevno identificirane fenolne spojine, pinobanksin, tricetin, fisetin, eriodiktiol in izoramnetin ter cimetno in β -fenilmlečno kislino, bi bilo potrebno potrditi z ustreznimi standardnimi spojinami.
- Antioksidativna učinkovitost medu, določena z DPPH in FRAP metodo je, ne glede na uporabljeno metodo, v različnih vrstah medu naraščala v naslednjem vrstnem redu: akacijev < lipov < cvetlični < kostanjev < gozdni < smrekov < hojev med.
- Med enoletnim skladiščenjem se je vsebnost skupnih fenolnih spojin v večini analiziranih vzorcev medu minimalno zmanjšala, AU pa se je povečala v vseh vzorcih.
- Barva različnih vrst slovenskega medu je bila zelo različna in je variirala od skoraj brezbarvne do temno rjave.
- Slovenski akacijev, lipov in cvetlični med prištevamo v skupino svetlejših medov z vrednostjo parametra L^* nad 50, kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med z vrednostjo parametra L^* pod 50, pa v skupino temnejših medov.
- Korelacije med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v medu, njegovo antioksidativno učinkovitostjo in barvo so bile statistično značilne, z visokimi vrednostmi korelacijskih koeficientov. Svetlejši medovi so vsebovali manj skupnih fenolnih spojin in imeli manjšo antioksidativno učinkovitost v primerjavi s temnejšimi.

6 POVZETEK

Med je zelo kompleksno živilo, saj vsebuje po dosedaj znanih podatkih več kot 200 različnih fitokemijskih spojin – biološko aktivnih snovi, katerih zgradba je odvisna od botaničnega in tudi geografskega porekla medu. Je naraven proizvod čebeljega izvora, nastane iz cvetličnega nektarja ali izločkov iz živih delov rastlin oz. izločkov žuželk na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, prinesejo v panj, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju. Glavne sestavine medu so ogljikovi hidrati, predvsem glukoza in fruktoza, ter voda. Komponente, ki so v medu prisotne v manjših količinah, so mineralne snovi, fenolne kisline in flavonoidi, nekateri encimi, askorbinska kislina, α -tokoferol, karotenoidi, organske kisline, produkti Maillardove reakcije, aminokisline in beljakovine.

Namen raziskave je bil v večjem številu vzorcev različnih vrst slovenskega medu določiti antioksidativni potencial medu ter kvalitativno in kvantitativno določiti fenolne in ostale spojine, ki bi lahko bile odgovorne za njegov antioksidativni učinek ter tako izpopolniti naše znanje o medu, kot viru antioksidantov.

Določali smo vsebnost skupnih kot tudi nekaterih individualnih fenolnih spojin, ker smo žeeli ugotoviti, če so lahko katere od fenolnih spojin tako značilne za posamezno vrsto medu, da bi jih lahko uporabili za ugotavljanje botaničnega porekla medu poleg fizikalno-kemijskih in mikroskopskih metod ter senzorične analize. Ker se je pokazalo, da je antioksidativni potencial medu odvisen tudi od barve medu, smo analiziranim vzorcem medu določili barvo z instrumentalnimi metodami. S statistično analizo pa smo žeeli ugotoviti, če so zveze med obravnavanimi parametri statistično značilne.

V raziskavo smo vključili 205 vzorcev sedmih, najpogosteje zastopanih vrst slovenskega medu: akacijevega, lipovega, cvetličnega, kostanjevega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu, ki so bili pridelani v letih 2004 – 2006 ter pridobljeni neposredno od čebelarjev. V analiziranih vzorcih medu smo določili nekatere osnovne fizikalno-kemijske parametre medu, kot so vsebnost vode, električna prevodnost, vrednost pH in vsebnost skupnih kislin ter tudi vsebnost prolina in skupnih beljakovin. Za potrditev vrste medu, deklarirane s strani čebelarjev, smo vse vzorce medu senzorično ocenili. S Folin-Ciocalteujevo metodo smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin, medtem ko smo vsebnost posameznih fenolnih spojin določili s HPLC v povezavi z masno spektrometrijo. Antioksidativno učinkovitost medu smo določili s pomočjo dveh spektrofotometričnih metod, DPPH in FRAP. Barvo medu smo analiziranim vzorcem izmerili s kromometrom Minolta CR 200B, v L* a* b* sistemu ter s pomočjo spektrofotometra.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena s FC metodo, je odvisna od botaničnega porekla medu. Najmanjšo povprečno vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili v svetlejših vrstah medu, akacijevem, 44,9 mg_{GA}/kg, lipovem, 93,8 mg_{GA}/kg, in cvetličnem medu, 138,0 mg_{GA}/kg. Sledi kostanjev med, ki je v povprečju vseboval 191,7 mg skupnih fenolnih spojin na kg medu. Največ skupnih fenolnih spojin so vsebovali medovi iz mane, gozdn, smrekov in hojev med, povprečno od 210,4 do 232,5 mg_{GA}/kg.

Vsebnost posameznih fenolnih spojin v medu smo določili s HPLC, kot detektor smo uporabili masni spektrometer. Pred izvedbo HPLC/MS analiz smo iz vzorcev medu

odstranili ogljikove hidrate in ostale moteče komponente s pomočjo SPE s kolonami Strata-X. V slovenskih medovih smo določili *p*-kumarno, kavno, elaginsko in klorogensko kislino ter flavonoide miricetin, luteolin, kvercetin, naringenin, apigenin, kamferol, pinocembrin, krizin in galangin. Domnevno pa smo na podlagi molskih mas oz. m/z vrednosti in razpoložljivih podatkov iz literature identificirali še cimetno in β -fenilmlečno kislino ter flavonoide tricetin, fisetin, pinobanksin, izoramnetin, pinostrobin in eriodiktiol. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da imajo analizirani vzorci različnih vrst slovenskega medu podoben, toda kvantitativno različen fenolni profil. Vsi analizirani vzorci medu so vsebovali flavonoide, ki izvirajo iz propolisa, pinocembrin, pinobanksin, krizin in galangin. Njihova vsebnost v medu je bila zelo variabilna, ker je odvisna od prisotnosti in vsebnosti propolisa v medu. Flavonoida kamferol in apigenin sta bila prisotna v vseh analiziranih vzorcih, kvercetin v večini analiziranih vzorcev, medtem ko so bili miricetin, luteolin in naringenin prisotni le v nekaterih analiziranih vzorcih medu, njihove vsebnosti so bile zelo majhne. Flavonoida miricetina nismo določili v akacijevem in lipovem medu, vzorci kostanjevega medu niso vsebovali flavonoida naringenina. Akacijev, lipov in cvetlični med niso vsebovali domnevno identificiranega flavonoida tricetina, ki pa je bil prisoten v vseh vzorcih medu, katerih izvor je mana – smrekovem, hojevem in gozdnem medu ter tudi v nekaterih vzorcih kostanjevega medu. Vsi vzorci so vsebovali *p*-kumarno, cimetno in β -fenilmlečno kislino, kavne kisline ni vseboval samo en vzorec medu (C20). Klorogensko in elaginsko kislino smo določili le v nekaterih vzorcih medu, medtem ko akacijev med teh dveh fenolnih kislin ni vseboval. S preliminarno analizo fenolnega profila slovenskega medu nismo uspeli najti značilnih spojin – markerjev, ki bi nakazovali botanično poreklo medu, zato bi bilo potrebno nadaljevati zastavljeni delo z analizo večjega števila vzorcev medu ter dodatnimi standardnimi spojinami, s katerimi bi lahko potrdili spojine, ki so bile v tej raziskavi samo domnevno identificirane ter določili tudi druge, ki jih med še vsebuje.

Poleg določenih fenolnih spojin smo v vseh analiziranih vzorcih medu identificirali in kvantitativno ovrednotili tudi *cis-trans* abscizinsko kislino ter domnevno tudi *trans-trans* abscizinsko kislino. Abscizinska kislina spada med rastlinske hormone in kot rastni inhibitor služi za zaščito rastline v času suše in drugih sprememb v okolju in zato kot marker sploh ni primerna.

Antioksidativno učinkovitost slovenskega medu smo določili z dvema metodama, DPPH in FRAP, ki se zelo pogosto uporablja za določanje AU različnih živil, tudi medu. Z DPPH metodo določamo AU kot sposobnost lovljenja radikalov. AU analiziranih vzorcev medu smo izrazili z IC₅₀ – koncentracijo učinkovitosti, ki je potrebna za 50 % inhibicijo absorbance radikala DPPH[•]. FRAP metoda deluje na osnovi sposobnosti fenolnih spojin, da reducirajo Fe³⁺ do Fe²⁺. Rezultate smo podali kot FRAP vrednosti (μM Fe(II)) 10 % raztopine medu. AU posameznih vrst slovenskega medu je naraščala v naslednjem vrstnem redu: akacijev < lipov < cvetlični < kostanjev < gozdni < smrekov < hojev med. Akacijev med, katerega AU je najmanjsa, je imel najvišjo povprečno vrednost IC₅₀ ter najnižjo povprečno FRAP vrednost, medtem ko smo v hojevem medu, ki je imel največjo AU, določili najnižjo povprečno vrednost IC₅₀ ter najvišjo povprečno FRAP vrednost.

Barva analiziranih vzorcev slovenskega medu je bila zelo različna in je variirala od skoraj brezbarvne do temno rjave. Izmerili smo jo instrumentalno s pomočjo kromometra Minolta

v CIE L^* a^* b^* sistemu. Parameter L^* določa svetlost vzorca, najvišje vrednosti parametra L^* so dosegli vzorci akacijevega in lipovega medu, medtem ko je bil hojev med, ki je imel najnižjo povprečno L^* vrednost, najtemnejši. Slovenski akacijev, lipov in cvetlični med, s povprečno vrednostjo L^* parametra nad 50, prištevamo v skupino svetlejših medov, ostale vrste medu, to so kostanjev, smrekov, hojev in gozdni med, ki so imeli povprečne vrednosti L^* parametra pod 50, pa v skupino temnejših medov. Iz izmerjenih a^* in b^* parametrov barve medu je razvidno, da so analizirani vzorci medu vsebovali rumene, rdeče in zelene komponente. Zelene komponente (negativne vrednosti parametra a^*) so bile prisotne v vseh vzorcih akacijevega in lipovega medu ter v nekaterih vzorcih cvetličnega medu. Največjo intenzivnost rumene barve je imel cvetlični med, saj smo tej vrsti medu določili največjo povprečno vrednost parametra b^* . Rezultati merjenja barve v L^* a^* b^* sistemu so pokazali, da na osnovi instrumentalnega merjenja barve lahko razlikujemo med akacijevim, lipovim, cvetličnim medom in skupino temnejših vrst medu, kostanjevega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu. Barvo medu smo določili tudi spektrofotometrično in jo izrazili kot neto absorbanco. Nižje vrednosti neto absorbance so imele svetlejše vrste medu, višje pa so dosegli temnejši medovi.

Z našo raziskavo smo potrdili predpostavljene hipoteze, da obstajajo razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin ter posameznih fenolnih kislin in flavonoidov kot tudi razlike v antioksidativni učinkovitosti različnih vrst medu. Temnejši medovi (kostanjev, smrekov, hojev in gozdni) so vsebovali več skupnih fenolnih spojin, določenih s FC metodo, in imeli višjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi s svetlejšimi vrstami medu (akacijev, lipov in cvetlični). Zveze med obravnavanimi parametri so bile večinoma statistično značilne in močne.

Postavili smo tudi hipotezo, da bodo imeli nekateri medovi tipične markerje – flavonoide, ki so značilni samo za posamezno vrsto medu, kar bi pomagalo pri določitvi botaničnega porekla nekaterih vrst medu. Ker smo analizirali le 10 vzorcev vsake vrste medu, skupaj 70 vzorcev, in so dobljeni rezultati zelo variabilni, lahko povzamemo, da bi bilo potrebno nadaljevati zastavljeni delo ter identificirati in kvantitativno določiti tudi nekatere druge spojine, ki niso bile zajete v naši raziskavi, ker nismo imeli standardnih spojin. Za morebitno določitev botaničnega porekla slovenskega medu na podlagi vsebnosti posameznih fenolnih kislin in flavonoidov, bi bilo namesto ene specifične spojine – markerja, verjetno bolj primerno upoštevati razlike v celotnem fenolnem profilu ali pa celo upoštevati še čisto druge vrste spojin.

Predpostavili smo tudi, da se bosta vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu, kot tudi antioksidativna učinkovitost medu, s časom zmanjševali. Vendar se vsebnost skupnih fenolnih spojin po enoletnjem skladiščenju v temi pri sobni temperaturi, v večini analiziranih vzorcev medu, ni bistveno zmanjšala, odstotek zmanjšanja je znašal povprečno 3,5 %. V devetih vzorcih pa se je vsebnost skupnih fenolnih spojin po enem letu skladiščenja celo minimalno povečala. Antioksidativna učinkovitost, določena s FRAP metodo, je bila po enoletnjem skladiščenju v vseh vzorcih medu večja od začetne vrednosti, odstotek zvečanja je znašal v povprečju 7,4 %. Razlog za povečanje AU bi lahko bila tvorba produktov Maillardove reakcije, ki delujejo antioksidativno.

Originalni prispevek doktorske disertacije:

- vpeljava SPE in HPLC/MS metode za določitev fenolnih spojin – fenolnih kislin in flavonoidov ter abscizinske kisline v medu,
- vpogled v fenolni profil slovenskega medu, ki je osnova za nadaljnje analize vsebnosti fenolnih spojin različnih vrst slovenskega medu,
- ovrednotenje antioksidativne učinkovitosti slovenskega medu,
- instrumentalno ovrednotenje barve slovenskega medu,
- dokazali smo obstoj statistično značilnih korelacij med nekaterimi obravnavanimi parametri.

6.1 SUMMARY

Honey is a remarkably complex food that, according to existing scientific data, contains more than 200 phytochemicals – biologically active compounds, which presence and content in honey depend on its botanical and also geographical origin. Honey is the natural substance that bees produce from the nectar of plants or from secretions of living parts of plants or excretions of plant-sucking insects on the living parts of plants, which the bees collect, bring into the hive, transform by combining with specific substances of their own, deposit, dehydrate, and leave in honeycombs to ripen and mature. The main components of honey are carbohydrates, predominantly glucose and fructose, and water. Some minor components present in honey are minerals, phenolic acids and flavonoids, certain enzymes, ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoids, organic acids, Maillard reaction products, amino acids, and proteins.

The purpose of this research was to determine antioxidative potential of Slovenian honeys and characterise phenolic and other components that might be responsible for their antioxidant effect and learn more about honey as a source of antioxidants. The content of total, as well as some individual phenolic compounds, was determined in order to find whether determination of their content, beside physico-chemical, pollen and sensory analysis, could serve as a complementary tool for determination of botanical origin of honey. Because it was shown that antioxidant activity of honey depends on honey colour, instrumental methods were used for its evaluation. Statistical analysis was used to search for relationships between parameters analysed.

205 samples of the seven most frequent types of Slovenian honey, namely acacia, lime, multifloral, chestnut, spruce, fir and forest honey were included in our research. The samples were obtained directly from beekeepers in the years 2004 – 2006. Some basic physico-chemical parameters like water content, electrical conductivity, pH value and total acids content as well as contents of proline and proteins were analysed. The botanical origin of honey as specified by beekeepers was further confirmed by means of sensory analysis. Folin-Ciocalteu method (FC) was used for determination of total phenolic content, while individual phenolic compounds were determined with HPLC/MS. Spectrophotometric FRAP and DPPH methods were used for antioxidant activity determination. The colour of honey samples was measured instrumentally by means of chromameter Minolta CR 200B in $L^* a^* b^*$ system as well as with a spectrophotometer.

Total phenolic content determined by the FC method varied greatly among the honey types. The lowest average values were determined in lighter honey types, acacia, lime and multifloral honey with average contents of 44.9 mg_{GA}/kg, 93.8 mg_{GA}/kg and 138.0 mg_{GA}/kg, respectively. Chestnut honey contained on average 191.7 mg/kg of total phenolic compounds. The highest values were obtained for honeydew types of honey, namely forest, spruce and fir honey, average results in these honeys ranged from 210.4 to 232.5 mg_{GA}/kg.

Contents of individual phenolic compounds in honey were determined by means of HPLC with mass spectrometer as detector. Carbohydrates and other disturbing substances were removed from honey by SPE procedure with Strata-X cartridges before HPLC/MS analyses. The phenolic acids and flavonoids determined in the analysed honey samples were *p*-coumaric acid, caffeic acid, ellagic acid, chlorogenic acid, myricetin, luteolin, quercetin, naringenin, apigenin, kaempferol, pinocembrin, chrysanthemic acid, cinnamic acid, β -phenyllactic acid, pinobanksin, tricetin, isorhamnetin, pinostrobin, fisetin and eriodictyol were only tentatively identified on the basis of their molecular weights and available literature data. The results obtained indicate that most honeys had similar but quantitatively different phenolic profile. All honey samples contained variable amounts of propolis derived flavonoids, namely pinocembrin, pinobanksin, chrysanthemic acid and galangin. Their quantity in honey depends on the presence and content of propolis. Kaempferol and apigenin were present in all honey samples analysed, quercetin in most samples, while flavonoids myricetin, luteolin and naringenin were present only in several honey samples, and their contents were very low. Flavonoid myricetin was not detected in acacia and lime honey, while chestnut honey samples did not contain naringenin. Tentatively identified flavonoid tricetin was not detected in acacia, lime and multifloral honey but it was present in all honeydew types of honey, spruce, fir and forest as in some samples of chestnut honey. All honey samples analysed contained *p*-coumaric, cinnamic and β -phenyllactic acid. Caffeic acid was detected in all samples except in one multifloral honey sample (C20). Only some samples contained chlorogenic and ellagic acid, while these two phenolic acids were not present in acacia honey.

Our preliminary research of the phenolic profile of Slovenian honeys showed that obtained results do not prove that Slovenian honeys contain any specific compounds – markers for the eventual determination of botanical origin of honey. Analyses of more honey samples with an additional standard compounds should be performed in order to confirm tentatively identified compounds and to determine some others also present in honey.

In all honey samples analysed were determined also two non-phenolic compounds, *cis-trans* abscisic acid and tentatively also *trans-trans* abscisic acid. Abscisic acid is a plant hormone which is related to the protection of plants in droughts and to environmental stress.

Antioxidant activity (AU) of Slovenian honey was determined by two methods, DPPH and FRAP, that are often used for AU determination of different foods, including honey. DPPH method is used for determination of radical scavenging activity, usually expressed as IC₅₀ – efficient concentration that causes 50 % inhibition of DPPH[•] absorbance. FRAP method is based on the ability of phenolic compounds to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺. Results were expressed as FRAP values (μ M Fe(II)) of 10 % honey solution. AU for different honey types as determined by DPPH and FRAP methods were increasing in the order: acacia < lime <

multifloral < chestnut < forest < spruce < fir honey. Acacia honey which AU was the lowest had the highest average value of efficient concentration (IC_{50}) and the lowest average FRAP value, while fir honey, which AU was the highest, had the lowest average IC_{50} value and the highest average FRAP value.

The colour of the analysed samples of Slovenian honey was noticeably different and varied from almost colourless to dark brown. It was measured instrumentally by means of chromameter Minolta in CIE $L^* a^* b^*$ system. Parameter L^* that indicates lightness was the highest in acacia and lime honey samples, while fir honey with the lowest average L^* value was the darkest. Slovenian acacia, lime and multifloral honeys with parameter $L^* > 50$ can be placed in the group of light honeys, while the other honey types, namely chestnut, spruce, fir and forest with $L^* < 50$ belong to dark honeys. From the measured a^* and b^* parameters of honey colour it was observed that the honey samples analysed had red, yellow and green colour components. Green components (negative a^* values) were present in all samples of acacia and lime honey as well as in some multifloral honey samples. The highest intensity of yellow colour was observed in multifloral honey, samples of this honey type had the highest b^* values. The results of honey colour measurement in the CIE $L^* a^* b^*$ system showed that colour parameters (L^*, a^* and b^*) enabled distinguishing among acacia, lime and multifloral honeys, and the group of darker honeys, namely chestnut, spruce, fir and forest. In addition, the colour of honey was measured spectrophotometrically and expressed as a net absorbance. Lower values of net absorbance were obtained for lighter honey types, while darker honeys had higher net absorbances.

With the results of our research some hypothesis were confirmed. The differences existed in total phenolic content and content of individual phenolic compounds as well as in antioxidant activity of different honey types. Darker honeys, namely chestnut, spruce, fir and forest contained more total phenolics, determined by the FC method, and had higher antioxidant activity as compared with lighter types of honey (acacia, lime and multifloral honey). The relationships among the parameters analysed were in most cases statistically significant and strong.

It was supposed that some honeys would contain markers – phenolic compounds specific for the certain type of honey, which would be helpful in determination of botanical origin of some honey types. Because only 10 samples of each honey type were analysed, 70 samples in all, and the results obtained showed great variability further work should be necessary. Some other phenolic compounds not identified and quantified in our research because of the lack of authentic standards should be determined in the future. For the characterization of botanical origin of Slovenian honeys the differences of the whole composition in phenolic profile might be more suitable than one single specific compound – marker, and also some quite different compounds should be taken into consideration.

It was assumed that total phenolic content and antioxidant activity would decrease during storage. Total phenolic content decreased in most samples, on average for 3.5 %, after one year of storage in the dark at room temperature, while nine honey samples showed minimal increase in total phenolic content after the storage. Antioxidant activity determined by FRAP method increased over one year of storage in all honey samples, on average for

7.4 %. The reason for the increase of antioxidant activity might be Maillard reaction products that can act antioxidative.

The original contribution of this doctoral dissertation:

- introduction of SPE and HPLC/MS method for determination of phenolic compounds – phenolic acids and flavonoids as well as abscisic acid in honey,
- insight into the phenolic profile of Slovenian honey, which will be the basis for further analyses of phenolic compounds in different types of Slovenian honey,
- evaluation of antioxidant activity of Slovenian honey,
- instrumental evaluation of colour of Slovenian honey,
- confirmation of statistically significant correlations among some parameters analysed.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000. Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Aherne A.S., O'Brien N.M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. Review article. *Nutrition*, 18, 1: 75-81
- Ahn M-R., Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Nakayama T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101, 4: 1383-1392
- Aljadi A.M., Kamaruddin M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 4: 513-518
- Aljadi A.M., Yusoff K.M. 2003. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33: 229-236
- Al-Mamary M., Al-Meeri A., Al-Habori M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition research*, 22, 9: 1041-1047
- Amiot M.J., Aubert S., Gonnet M., Tacchini M. 1989. Phenolic composition of honeys: preliminary study on identification and group quantification. *Apidologie*, 20, 1: 115-125
- Andrade P., Ferreres F., Gil M.I., Tomás-Barberán F.A. 1997. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60, 1: 79-84
- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 4: 549-562
- AOAC Official Method 962.19. Acidity (free, lactone, and total) of honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International: Chapter 44: 31-31
- Arráez-Román D., Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. 2006. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 5: 1648-1656
- Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Aruoma O.I. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 12: 1553-1561

- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 1: 191-203
- Baltrušaitytė V., Venskutonis P. R., Čeksterytė V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101, 2: 502-514
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 1: 70-76
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 2: 185-191
- Bertoncej J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105, 2: 822-828
- Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M.P., Albertini M.C. Piatti E. 2006. Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 2: 217-222
- Bogdanov S., Martin P., Lüllman C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, Suppl. S, 3-59
- Bogdanov S., Ruoff K., Persano Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, Suppl. 1: S4-S17
- Brand-Williams W., Culivier M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 1: 25-30
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 11: 317-333
- Buratti S., Benedetti S., Cosio M.S. 2007. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, 71, 3: 1387-1392
- Burda S., Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6: 2774-2779
- Chaillou L.L., Nazareno M.A. 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 22: 8397-8402
- Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 3: 178-182

- Chen L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangerl, A.R., Engeseth, N.J. 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 10: 4997-5000
- Connor A.M., Luby J.J., Hancock J.F., Berkheimer S., Hanson E.J. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4: 893-898
- Cushnie T.T.P., Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 5: 343-356
- Čeksterytė V., Kazlauskas S., Račys J. 2006. Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread. *Biologija*, 2: 28-33
- D'Arcy B.R. 2005. Antioxidants in Australian floral honeys – Identification of health-enhancing nutrient components. Kingston, Rural Industries Research and Development Corporation: 84 str.
<http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/05-040.pdf> (January 2006)
- de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.Th. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. A review. *Journal of Chromatography A*, 1112, 1-2: 31-63
- Dimitrova B., Gevrenova R., Anklam E. 2007. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18, 1: 24-32
- Ferrer F., Andrade P., Tomás-Barberán F.A. 1996. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 8: 2053-2056
- Ferrer F., García-Viguera C., Tomás-Lorente F., Tomás-Barberán F.A. 1993. Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 1: 121-123
- Ferrer F., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I., Tomás-Lorente F. 1991. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56, 1: 49-56
- Ferrer F., Tomás-Barberán F.A., Soler C., García-Viguera C., Ortiz A., Tomás-Lorente F. 1994a. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*, 25, 1: 21-30
- Ferrer F., Andrade P., Tomás-Barberán F.A. 1994b. Flavonoid from Portuguese heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 199: 32-37

- Fiorani M., Accorsi A., Blasa M., Diamantini, G., Piatti E. 2006. Flavonoids from Italian multifloral honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 21: 8328-8334
- Forti A.F., Campana G., Simonella A., Multari M., Scorticini G. 2005. Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529, 1-2: 257-263
- Frankel S., Robinson G.E., Berenbaum M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 1: 27-3
- Fukumoto L.R., Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 8: 3597-3604
- Gheldorf N., Engeseth N.J. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 10: 3050-3055
- Gheldorf N., Wang X-H., Engeseth N.J. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 21: 5870-5877
- Gil M.I., Ferreres F., Ortiz A., Subra E., Tomás-Barberán F.A. 1995. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 11: 2833-2838
- Golob T., Bertoncej J., Škrabanja V. 2002. Sensory characteristics of Slovenian honey. *Acta Agriculturae Slovenica*, 79-2: 381-389
- Golob T., Plestenjak A. 2000. Analiza kakovosti živil. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Oddelek za živilstvo: 96-98
- Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. 2006a. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 4: 1220-1234
- Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. 2006b. Problems of quantitative and qualitative estimation of polyphenols in honey by capillary electrophoresis with UV-vis detection. *Agro Food Industry Hi Tech*, 17, 4: 68-71
- González-Miret M.L., Terrab A., Hernanz D., Fernández-Recamales M.A., Heredia F.J. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7: 2574-2580

- Halliwell B. 2000. Antioxidant activity and other biological effect of flavonoids. V: Wake up to flavonoids. Proceedings of a symposium sponsored by the Brooke Bond Tea Company and held at the Royal Society of Medicine, London, 8 jul. 1999. Rice-Evans C. (ed.). London, Royal Society of Medicine: 13-23
- Harborne J. 2000. Chemistry of the flavonoid pigments. V: Wake up to flavonoids. Proceedings of a symposium sponsored by the Brooke Bond Tea Company and held at the Royal Society of Medicine, London, 8 jul. 1999. Rice-Evans C. (ed.). London, Royal Society of Medicine: 3-12
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 10: 572-584
- Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57, 1: 43-46
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 1841-1856
- Hukkanen A.T., Pölönen S.S., Kärenlampi S.O., Kokko H.I. 2006. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1: 112-119
- HunterLab color scale: CIE L^{*}a^{*}b^{*} color scale. 1996. Reston, HunterLab (July 1996) http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf (September 2007): 4 str.
- Inoue K., Murayama S., Seshimo F., Takeba K., Yoshimura Y., Nakazawa H. 2005. Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 5: 872-878
- Kenjerić D. 2004. Određivanje botaničkog podrijetla nekih vrsta monoflornog meda na temelju flavonoidnog profila dobivenog RP-HPLC metodom. Disertacija. Zagreb, Prehrambeno-biotehnički fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 98 str.
- Kenjerić D., Mandić M.L., Primorac L., Bubalo D., Perl A. 2007. Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia. *Food Chemistry*, 102, 3: 683-690
- Košmelj K., Kastelec D. 2003. Uporabna biostatistika. Načrtovanje in analiza poskusov, delovno gradivo 2003/2004 za podiplomski študij. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 187 str.
- Kropf U., Jamnik M., Bertoncej J., Golob T. 2008. Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for Slovenian honey. *Food Technology and Biotechnology*, 46,3: 335-340

- Küçük M., Kolaylı S., Karaoglu Ş., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 2: 526-534
- Labrinea E.P., Georgiou C.A. 2005. Rapid, fully automated flow injection antioxidant capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 11: 4341-4346
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., Bacandritsos N., Sabatini A.G. 2004. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering*, 64, 1: 9-21
- Madsen H.L., Andersen C.M., Jørgensen L.V., Skibsted L.H. 2000. Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies. *European Food Research and Technology*, 211, 4: 240-246
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89, 3: 411-420
- Martos I., Cossentini M., Ferreres F., Tomás-Barberán F.A. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 8: 2824-2829
- Martos I., Ferreres F., Tomás-Barberán F.A. 2000a. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of *Eucalyptus* honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5: 1498-1502
- Martos I., Ferreres F., Yao L., D'Arcy B., Caffin N., Tomás-Barberán F.A. 2000b. Flavonoids in monospecific *Eucalyptus* honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 10: 4744-4748
- Mattila P., Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 13: 3660-3667
- Mateo R., Bosch-Reig F. 1998. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2: 393-400
- Mateo Castro R., Jimenez Escamilla M., Bosch-Reig F. 1992. Evaluation of the color of some unifloral honey types as a characterization parameter. *Journal of AOAC International*, 75, 3: 537-542
- McKibben J, Engeseth N.J. 2002. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3: 592-595

- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 3: 571-577
- Merken H.M., Beecher G.R. 2000a. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3: 577-599
- Merken H.M., Beecher G.R. 2000b. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897, 1-2: 177-184
- Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K. 2008. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, 1187, 1-2: 18-24
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 2: 231-237
- Miquel Becker E., Nissen L.R., Skibsted L.H. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219: 561-571
- Molnár-Perl I., Füzfai Zs. 2005. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. Review article. *Journal of Chromatography A*, 1073, 1-2: 201-227
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songlanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211- 219
- Mundo M.A., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W. 2004. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 1: 1-8
- Naczk M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 1-2: 95-111
- Nagai T., Inoue R., Kanamori N., Suzuki N., Nagashima T. 2006. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry*, 97, 2: 256-262
- Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75, 2: 237-240
- Nozal M.J., Bernal J.L., Martín M.T., Jiménez J.J., Bernal J., Higes M. 2006. Trace analysis of tiamulin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray

- ionization mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-2: 102-108
- Othman A., Ismail A., Ghani N.A., Adenan I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100, 4: 1523-1530
- Pereyra Gonzales A., Burin L., Buera M.P. 1999. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, 32, 3: 185-191
- Pérez R.A., Iglesias M.T., Encarnación Pueyo E., González M, de Lorenzo C. 2007. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2: 360-365
- Persano Oddo L., Piro R. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35, Suppl. 1: S38-S81
- Peterson J., Dwyer J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18, 1: 1995-2018
- Pietta P.G., Gardana C., Pietta A.M. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 73, Suppl. 1: S7-S20
- Piotraszewska-Pajak A., Ciszak S. 2001. The influence of botanical origin on sugar composition, acidity and colour of nectar honeys. V: Commodity science in global quality perspective: Products-Technology, Quality and Environment. Vol.1. 13th IGWT Symposium, 2nd-8th september 2001. Denac M., Musil V., Pregrad B. (ur.). Maribor, Ekonomsko-poslovna fakulteta: 705-710
- Pulcini P., Allegrini F., Festuccia N. 2006. Fast SPE extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *Apiacta*, 41: 21-27
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 9/10: 1231-1237
- Repolles C., Herrero-Martínez J.M., Ràfols C. 2006. Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 1131, 1-2: 51-57
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 7: 933-956
- Robards K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000, 1-2: 657-691

- Robbins R.J. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 10: 2866-2887
- Robbins R.J., Bean S.R. 2004. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1038, 1-2: 97-105
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2: 235-254
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51-86
- Sánchez-Rabaneda F., Jáuregui O., Casals I., Andrés-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventós R.M. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 1: 35-42
- Savarese M., De Marco E. Sacchi R. 2007. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105, 2: 761-770
- Schramm D.D, Karim M., Schrader H.R., Holt R.R., Cardetti M., Keen C.L. 2003. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6: 1732-1735
- Serra Bonvehí J., Soliva Torrentó M., Centelles Lorente E. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4: 1848 - 1853
- Sivam G. 2002. Analysis of flavonoids. V: Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. Hurst W. J. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 363-384
- Soler C., Gil M., García-Viguera C., Tomás-Barberán F.A. 1995. Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. *Apidologie*, 26, 1: 53-60
- Stratil P., Klejdus B., Kubáň V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3: 607-616
- Surveswaran S., Cai Y-Z., Corke H., Sun M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102, 3: 938-953

- Taormina P.J., Niemira B.A., Beuchat L.R. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 3: 217-225
- Terrab A., Diez M.J., Heredia F.J. 2002. Chromatic characterisation of Moroccan honeys by diffuse reflectance and tristimulus colorimetry – non-uniform and uniform color spaces. *Food Science and Technology International*, 8, 4: 189-195
- Terrab A., Escudero M.L., González-Miret M.L., Heredia F.J. 2004. Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: a multivariate study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 4: 380-386
- The National Honey Board. 2003. Honey – Health and therapeutic qualities. Longmont, The National Honey Board: 27 str.
<http://www.biologiq.nl/UserFiles/Compendium%20Honey%202002.pdf> (August 2007)
- Thompson S.T., Noot D.K. 2005. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 551, 1-2: 168-176
- Tomás-Barberán F.A., Ferreres F., Blázquez M.A., García-Viguera C., Tomás-Lorente F. 1993a. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 634, 1: 41-46
- Tomás-Barberán F.A., Ferreres F., García-Viguera C., Tomás-Lorente F. 1993b. Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196, 1: 38-44
- Tomás-Barberán F.A., Martos I., Ferreres F., Radovic B., Anklam E. 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 5: 485-496
- Tripoli E., La Guardia M., Giannanca S., Di Majo D., Giannanca M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104, 2: 466-479
- Tura D., Robards K. 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. A review. *Journal of Chromatography A*, 975, 1: 71-93
- Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu Y.S. 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95, 4: 653-657
- Vasco C., Ruales J., Kamal-Eldin A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 4: 816-823

- Vela L., de Lorenzo C., Pérez R.A. 2007. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 6: 1069-1075
- Verzelloni E., Tagliazucchi D., Conte A. 2007. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 105, 2: 564-571
- Vit P., Soler C., Tomás-Barberán F.A. 1997. Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela. *European Food Research and Technology*, 204, 1: 43-47
- Wang X.H., Gheldof N., Engeseth N.J. 2004. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*, 69, 2: 96-101
- Weston R.J., Mitchell K.R., Allen K.L. 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, 64, 3: 295-301
- Wieling J. 2002. LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*, 55, Suppl. 1: S107–S113
- Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 3: 940-949
- Xing J., Xie C., Lou H. 2007. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 2: 368-378
- Yao L., Datta N., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F., Martos I., Singanusong R. 2003. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81, 2: 159-168
- Yao L., Jiang Y., Singanusong R., D'Arcy B., Datta N., Caffin N., Raymont K. 2004a. Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 37, 2: 166-174
- Yao L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K. 2004b. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86, 2: 169-177
- Zalibera M., Staško A., Šlebodová A., Jančovičová V., Čermáková T., Brezová V. 2008. Antioxidant and radical-scavenging activities of slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study. *Food Chemistry*, 110, 2: 512-521

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tereziji Golob za pomoč in potrpežljivost pri nastajanju te doktorske disertacije, za njene koristne napotke in popravke. Hvala tudi somentorici prof. dr. Veroniki Abram, ki si je kljub natrpanemu urniku vzela čas za podroben pregled doktorske disertacije in bila vedno dosegljiva za moja vprašanja. Njeni popravki, komentarji in predlogi so bili nepogrešljivi. Za kritičen pregled naloge se zahvaljujem tudi predsedniku komisije doc. dr. Janku Božiču ter članici komisije, prof. dr. Nadi Vahčić iz Zagreba.

Hvala mojim puncam na Katedri za vrednotenje živil. Še enkrat Zinki, ki mi je leta 1999 dala priložnost postati del čudovite skupine in je vseskozi verjela vame. Hvala Anici ter nekdanjim sodelavkam, Vidi, Urški G. in Eleni. In hvala tudi Urški K., Mojci in Marinki za povezanost v strokovnih in malo manj strokovnih temah. Upam, da bomo skupaj še naprej.

Hvala vsem na Katedri za tehnologijo mesa, ki so me sprejeli medse in mi omogočili delo pri njih, predvsem pa Tomažu za njegovo strokovno pomoč in koristne napotke pri izvedbi SPE in HPLC/MS analiz.

Hvala diplomantkam Mateji Gaber Žveplan in Nataši Šenk za prispevek k nastanku te disertacije.

Zahvaljujem se tudi Ivici Hočevar in Barbari Slemenik za pomoč pri iskanju člankov, urejanju literature in oblikovanju dokončnega izgleda te naloge.

Hvala Poloni in Tini za marsikateri strokovni in prijateljski nasvet ter tudi vsem ostalim zaposlenim na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete.

Hvala tudi staršem in sestram za nesebično podporo ter pomoč in spodbudo pri delu in študiju.

Iskrena hvala Bojanu in najinima nadebudnežema, Benjaminu in Juretu, ki so znali potrpeti in se kdaj znajti in zabavati tudi brez mene. Upam, da bomo lahko nadoknadili ure, ki naj bi bile namenjene našemu druženju, a jih je zahtevala ta disertacija.

Nazadnje pa se zahvaljujem še vsem ostalim, ki pri tej disertaciji niso bili neposredno udeleženi, so pa ta čas vsaj malo mislili name.

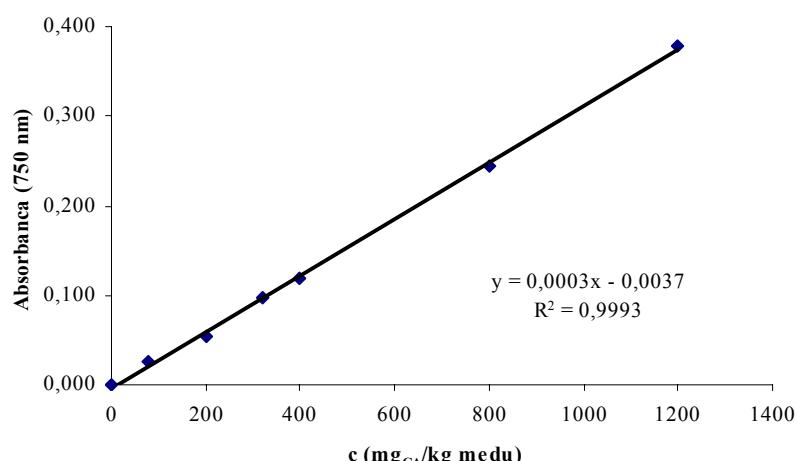
PRILOGE

Priloga A1: Podatki za umeritveno krivuljo določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Annex A1: Calibration curve data for total phenolic content determination

| c (mg _{GA} /100 mL) | c (mg _{GA} /kg medu) | A ₁ | A ₂ | \bar{A} |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|-----------|
| 0 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 0,8 | 80 | 0,025 | 0,024 | 0,025 |
| 2,0 | 200 | 0,054 | 0,055 | 0,055 |
| 3,2 | 320 | 0,096 | 0,097 | 0,097 |
| 4,0 | 400 | 0,118 | 0,119 | 0,119 |
| 8,0 | 800 | 0,245 | 0,244 | 0,245 |
| 12,0 | 1200 | 0,375 | 0,380 | 0,378 |

\bar{A} - povprečna vrednost absorbanc A₁ in A₂



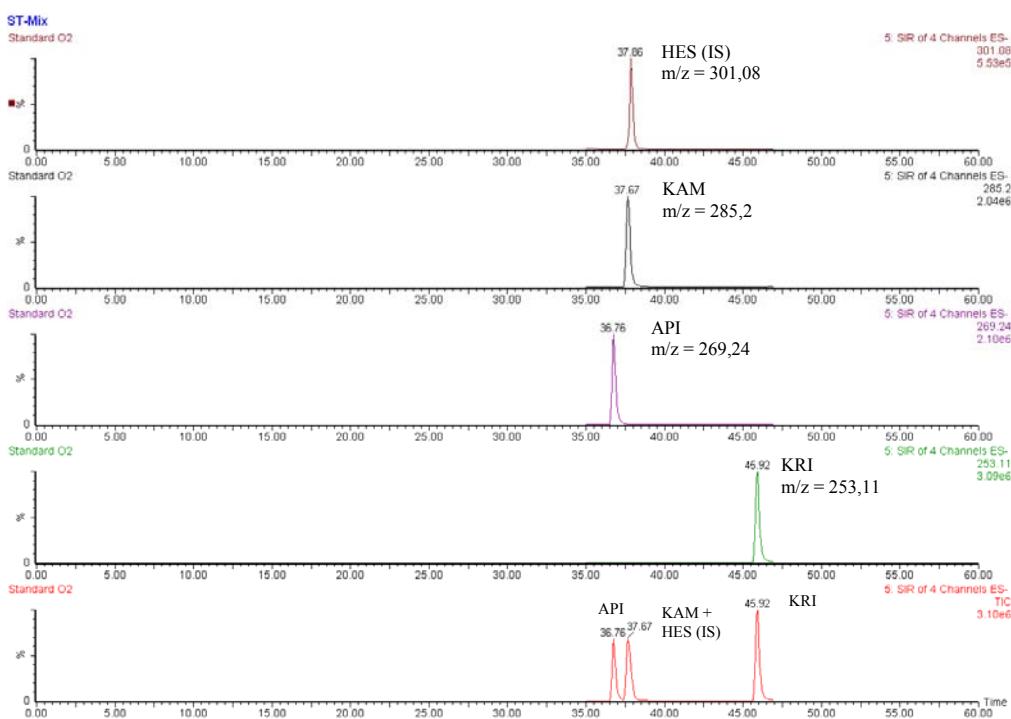
Priloga A2: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Annex A2: Calibration curve for total phenolic content determination

Priloga A3: Standardni dodatek galne kisline

Annex A3: Standard addition of gallic acid

| Vzorec | Dodatek galne kisline (mg/kg medu) | Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg _{GA} /kg medu) | Izkoristek (%) |
|--------|------------------------------------|--|----------------|
| A3 | 0 | 49,0 | |
| | 400 | 450,1 | 100,3 |
| | 800 | 859,0 | 101,3 |
| | 1200 | 1267,9 | 101,6 |
| S25 | 0 | 191,2 | |
| | 400 | 586,8 | 98,9 |
| | 800 | 1013,4 | 102,8 |
| | 1200 | 1425,7 | 102,9 |
| G1 | 0 | 270,1 | |
| | 400 | 669,0 | 99,7 |
| | 800 | 1086,8 | 102,1 |
| | 1200 | 1476,8 | 100,6 |



Priloga B1: Primer HPLC/MS kromatograma hesperetina, kamferola, apigenina in krizina. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4

Annex B1: Sample of HPLC/MS chromatogram of hesperetin, kaempferol, apigenin and chrysin. See Table 4 for peak identification

Priloga B2: Podatki umeritvenih krivulj za spojine določene s HPLC/MS

Annex B2: Calibration curves data for compounds analysed with HPLC/MS

| Spojina | Enačba premice | R ² |
|-------------------------------|----------------|----------------|
| galna kislina | y = 0,1092x | 0,9980 |
| klorogenska kislina | y = 0,2710x | 0,9926 |
| kavna kislina | y = 0,6998x | 0,9981 |
| p-kumarna kislina | y = 0,1287x | 0,9986 |
| elaginska kislina | y = 0,4173x | 0,9974 |
| miricetin | y = 0,8289x | 0,9968 |
| cis-trans abscizinska kislina | y = 0,8038x | 0,9975 |
| luteolin | y = 1,2209x | 0,9967 |
| kvercetin | y = 0,6720x | 0,9991 |
| naringenin | y = 0,9525x | 0,9972 |
| apigenin | y = 1,5359x | 0,9997 |
| kamferol | y = 1,2632x | 0,9981 |
| pinocembrin | y = 1,8882x | 0,9997 |
| krzin | y = 1,5302x | 0,9994 |
| galangin | y = 2,2529x | 0,9988 |

R²: koeficient determinacije

Priloga B3: Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih spojin znotraj paralelke naključnega vzorca medu (vzorec S29)

Annex B3: Repeatability of phenolics determination in one parallel of random honey sample (sample S29)

| Spojina ($\mu\text{g/kg}$) | Paralelka | | | | | | Statistična parametra | |
|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|-----------------------|--------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | \bar{x} | KV (%) |
| p-kumarna kislina | 2577 | 2677 | 2508 | 2816 | 2804 | 2632 | 2669 | 4,6 |
| elaginska kislina | 425 | 445 | 403 | 414 | 433 | 421 | 424 | 3,5 |
| luteolin | 40 | 41 | 35 | 36 | 37 | 35 | 37 | 6,5 |
| kvercetin | 463 | 459 | 407 | 480 | 429 | 464 | 450 | 6,0 |
| naringenin | 119 | 115 | 113 | 110 | 102 | 102 | 110 | 6,4 |
| apigenin | 248 | 239 | 239 | 253 | 251 | 243 | 245 | 2,5 |
| kamferol | 416 | 415 | 400 | 436 | 427 | 410 | 417 | 3,0 |
| pinocembrin | 475 | 416 | 425 | 424 | 439 | 418 | 433 | 5,1 |
| pinobanksin | 625 | 613 | 598 | 644 | 637 | 611 | 621 | 2,8 |
| krizin | 467 | 391 | 412 | 421 | 430 | 426 | 425 | 5,9 |
| galangin | 277 | 277 | 248 | 241 | 252 | 263 | 260 | 5,9 |
| ABA2 | 2080 | 1968 | 1878 | 1924 | 1932 | 1962 | 1957 | 3,5 |

\bar{x} : povprečna vrednost, KV (%): koeficient variabilnosti

Priloga B4: Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih spojin med paralelkami naključnega vzorca za akacijev med (vzorec A21)

Annex B4: Repeatability of phenolics determination in parallel samples of acacia honey (sample A21)

| Spojina ($\mu\text{g/kg}$) | Paralelka | | | | | | Statistična parametra | |
|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|-----------------------|--------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | \bar{x} | KV (%) |
| kavna kislina | 181 | 176 | 167 | 172 | 170 | 162 | 171 | 4,1 |
| p-kumarna kislina | 433 | 446 | 428 | 459 | 385 | 386 | 423 | 7,3 |
| kvercetin | 126 | 127 | 131 | 136 | 137 | 140 | 133 | 4,3 |
| apigenin | 63 | 60 | 62 | 60 | 70 | 54 | 62 | 8,3 |
| kamferol | 308 | 287 | 315 | 297 | 300 | 280 | 298 | 4,4 |
| pinocembrin | 767 | 769 | 771 | 785 | 763 | 773 | 771 | 1,0 |
| pinobanksin | 1115 | 1166 | 1111 | 1132 | 1144 | 1147 | 1136 | 1,9 |
| krizin | 905 | 855 | 890 | 875 | 897 | 796 | 870 | 4,6 |
| galangin | 388 | 369 | 390 | 380 | 415 | 353 | 383 | 5,5 |
| ABA2 | 1723 | 1699 | 1632 | 1719 | 1553 | 1632 | 1660 | 4,0 |

\bar{x} : povprečna vrednost, KV (%): koeficient variabilnosti

Priloga B5: Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih snovi med paralelkami naključnega vzorca za cvetlični med (vzorec C29)

Annex B5: Repeatability of phenolics determination in parallel samples of multifloral honey (sample C29)

| Spojina ($\mu\text{g/kg}$) | Paralelka | | | | | | Statistična parametra | |
|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|-----------------------|--------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | \bar{x} | KV (%) |
| kavna kislina | 1044 | 913 | 881 | 944 | 906 | 927 | 936 | 6,1 |
| p-kumarna kislina | 1882 | 1942 | 2078 | 1923 | 1884 | 1859 | 1928 | 4,2 |
| elaginska kislina | 946 | 921 | 928 | 910 | 925 | 937 | 928 | 1,4 |
| miricetin | 38 | 39 | 39 | 39 | 40 | 39 | 39 | 1,8 |
| luteolin | 42 | 58 | 54 | 38 | 40 | 44 | 46 | 17,7 |
| kvercetin | 356 | 371 | 362 | 355 | 350 | 374 | 361 | 2,6 |
| apigenin | 168 | 176 | 158 | 170 | 171 | 174 | 170 | 3,6 |
| kamferol | 377 | 410 | 405 | 394 | 402 | 409 | 400 | 3,1 |
| pinocembrin | 918 | 940 | 956 | 984 | 981 | 926 | 951 | 2,9 |
| pinobanksin | 1327 | 1367 | 1336 | 1377 | 1372 | 1347 | 1354 | 1,5 |
| krizin | 825 | 823 | 822 | 801 | 805 | 831 | 818 | 1,5 |
| galangin | 391 | 402 | 390 | 395 | 393 | 382 | 392 | 1,7 |
| ABA2 | 914 | 926 | 918 | 967 | 968 | 975 | 945 | 3,0 |

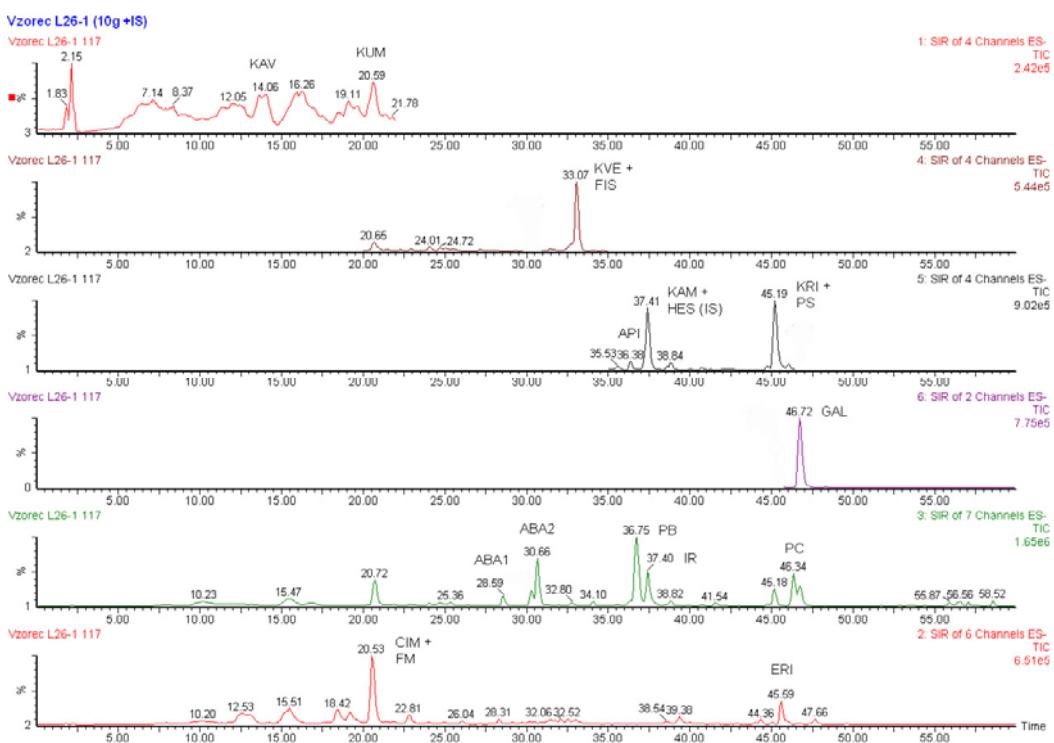
\bar{x} : povprečna vrednost, KV (%): koeficient variabilnosti

Priloga B6: Ponovljivost določanja vsebnosti fenolnih spojin med paralelkami naključnega vzorca za gozdni med (vzorec G24)

Annex B6: Repeatability of phenolics determination in parallel samples of forest honey (sample G24)

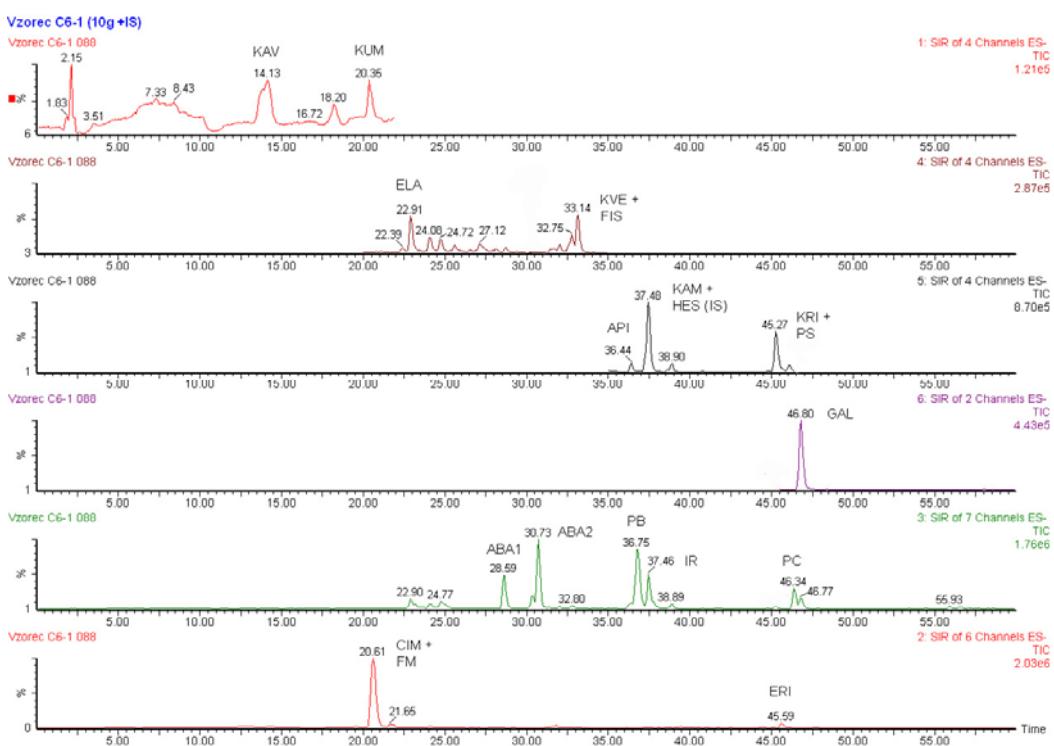
| Spojina ($\mu\text{g/kg}$) | Paralelka | | | | | | Statistična parametra | |
|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|-----------------------|--------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | \bar{x} | KV (%) |
| p-kumarna kislina | 1430 | 1509 | 1583 | 1395 | 1519 | 1524 | 1493 | 4,6 |
| miricetin | 14 | 15 | 16 | 15 | 14 | 14 | 15 | 6,7 |
| luteolin | 26 | 28 | 30 | 35 | 32 | 33 | 31 | 12,9 |
| kvercetin | 217 | 217 | 248 | 208 | 221 | 212 | 221 | 6,3 |
| apigenin | 268 | 271 | 273 | 279 | 283 | 274 | 275 | 1,8 |
| kamferol | 293 | 265 | 282 | 287 | 294 | 287 | 285 | 3,9 |
| pinocembrin | 399 | 397 | 399 | 396 | 404 | 395 | 398 | 0,8 |
| pinobanksin | 895 | 913 | 880 | 902 | 907 | 903 | 900 | 1,3 |
| krizin | 460 | 465 | 458 | 463 | 467 | 463 | 463 | 0,7 |
| galangin | 307 | 321 | 310 | 313 | 317 | 313 | 314 | 1,6 |
| ABA2 | 886 | 885 | 869 | 860 | 877 | 870 | 875 | 1,1 |

\bar{x} : povprečna vrednost, KV (%): koeficient variabilnosti



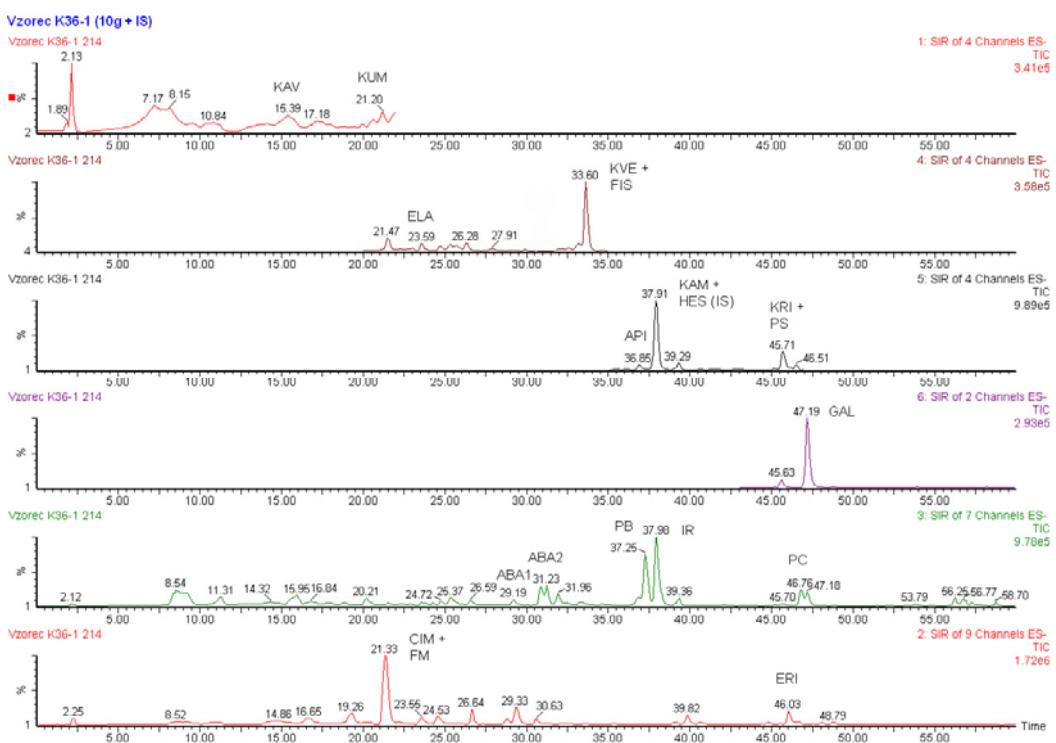
Priloga B7: HPLC/ESI(−)/MS kromatogram lipovega medu (vzorec L26)

Annex B7: HPLC/ESI(−)/MS chromatogram of lime honey (sample L26)



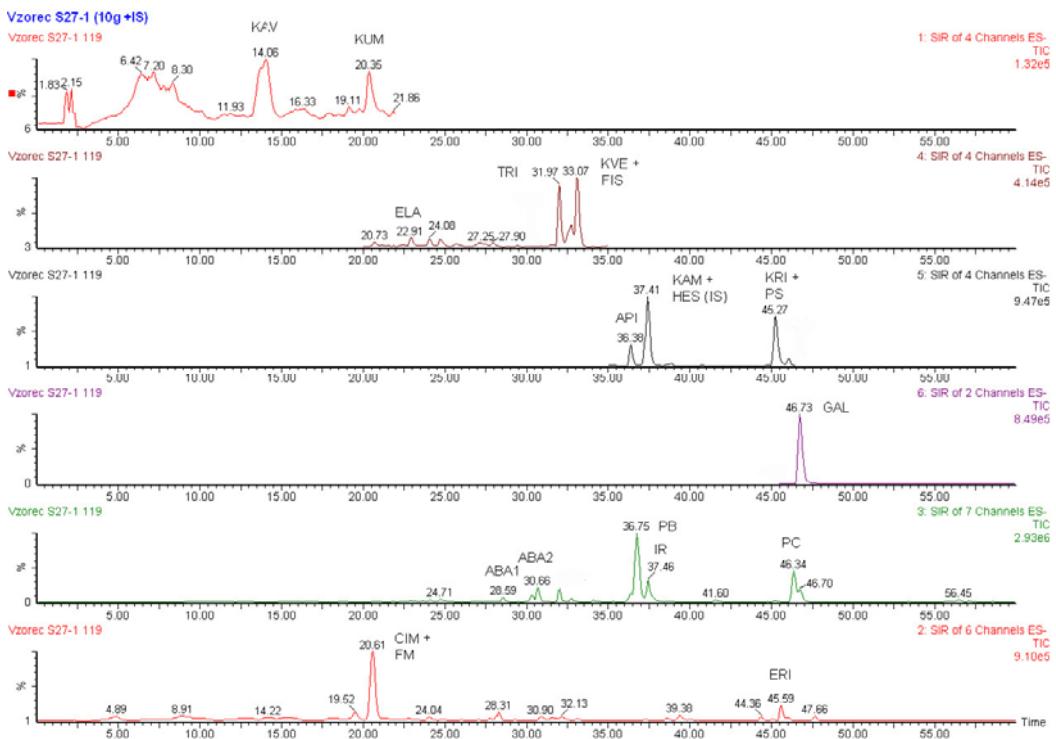
Priloga B8: HPLC/ESI(−)/MS kromatogram cvetličnega medu (vzorec C6)

Annex B8: HPLC/ESI(−)/MS chromatogram of multifloral honey (sample C6)



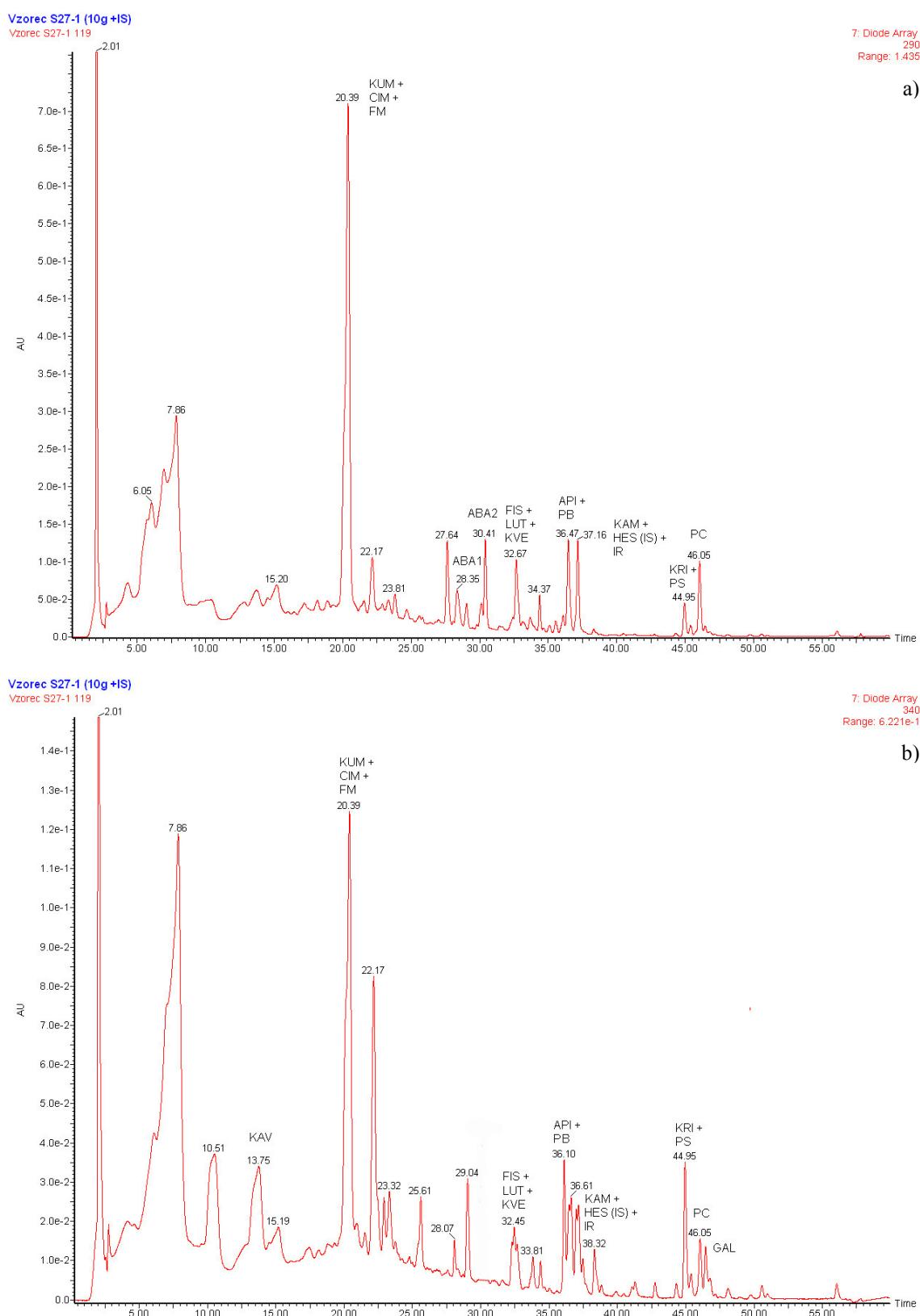
Priloga B9: HPLC/ESI(−)/MS kromatogram kostanjevega medu (vzorec K36)

Annex B9: HPLC/ESI(−)/MS chromatogram of chestnut honey (sample K36)



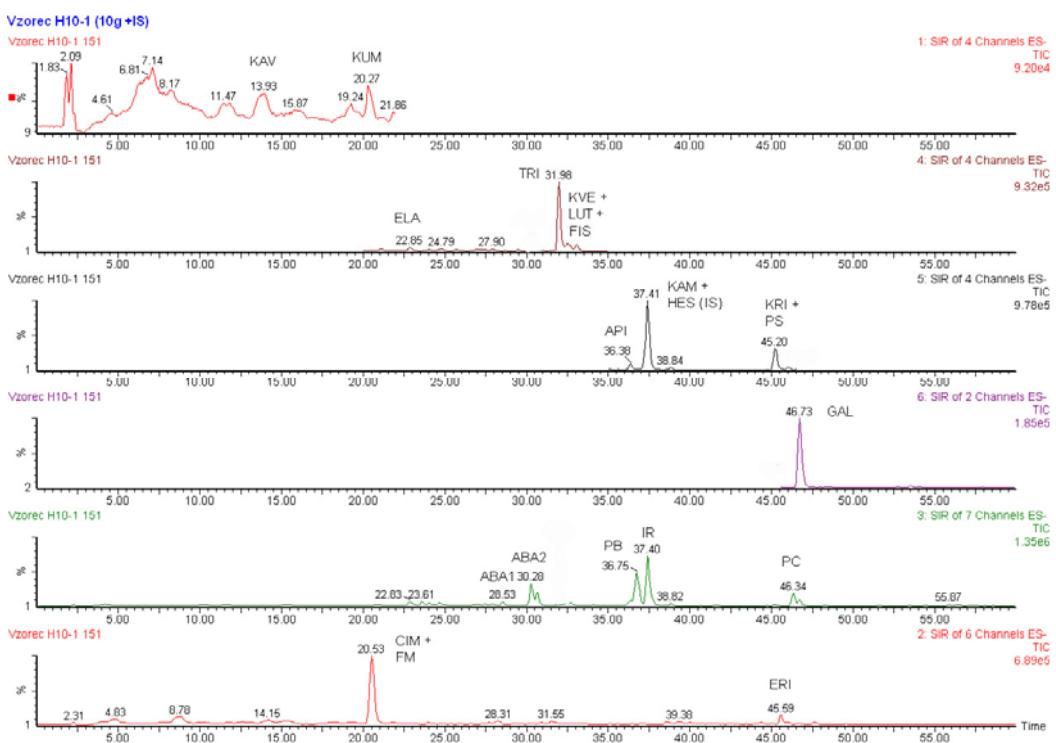
Priloga B10: HPLC/ESI(−)/MS kromatogram smrekovega medu (vzorec S27)

Annex B10: HPLC/ESI(−)/MS chromatogram of spruce honey (sample S27)



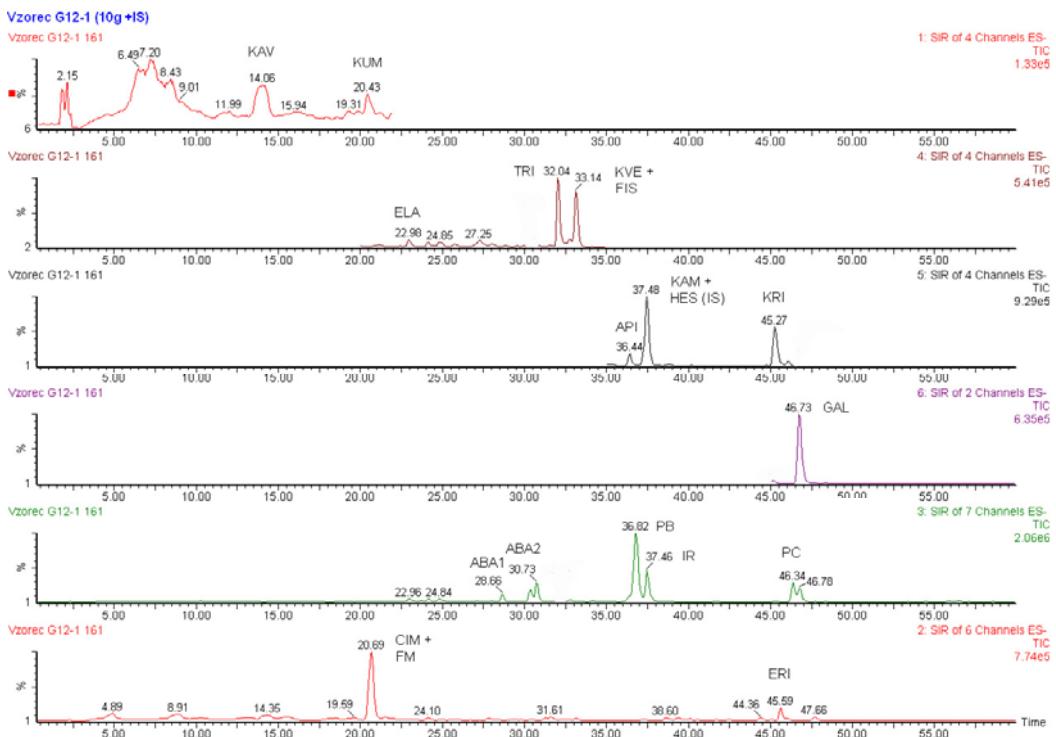
Priloga B11: HPLC/DAD kromatogram smrekovega medu (S27) pri 290 nm (a) in 340 nm (b)

Annex B11: HPLC/DAD chromatogram of spruce honey (S27) recorded at 290 nm (a) and 340 nm (b)



Priloga B12: HPLC/ESI(−)/MS kromatogram hojevega medu (vzorec H10)

Annex B12: HPLC/ESI(−)/MS chromatogram of fir honey (sample H10)



Priloga B13: HPLC/ESI(−)/MS kromatogram gozdnega medu (vzorec G12)

Annex B13: HPLC/ESI(−)/MS chromatogram of forest honey (sample G12)

Priloga C1: Rezultati merjenja AU vzorca kostanjevega medu K23 z DPPH metodo

Annex C1: Results of AU determination for chestnut honey sample K23 with DPPH method

| c (mg/mL) | A ₁ | A ₂ | A _{SL} | Preostali DPPH ₁ (%) | Preostali DPPH ₂ (%) |
|--------------|----------------|----------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 0 | 0,791 | 0,791 | 0 | 100,0 | 100,0 |
| 1 | 0,767 | 0,767 | 0,003 | 96,6 | 96,6 |
| 2 | 0,743 | 0,749 | 0,006 | 93,2 | 93,9 |
| 4 | 0,695 | 0,696 | 0,011 | 86,5 | 86,6 |
| 6 | 0,655 | 0,660 | 0,017 | 80,7 | 81,3 |
| 8 | 0,610 | 0,608 | 0,021 | 74,5 | 74,2 |
| 10 | 0,561 | 0,564 | 0,028 | 67,4 | 67,8 |
| 12 | 0,528 | 0,531 | 0,034 | 62,5 | 62,8 |
| 14 | 0,492 | 0,486 | 0,038 | 57,4 | 56,6 |
| 16 | 0,459 | 0,461 | 0,045 | 52,3 | 52,6 |
| 18 | 0,438 | 0,436 | 0,050 | 49,1 | 48,8 |
| 20 | 0,398 | 0,404 | 0,057 | 43,1 | 43,9 |

A_{1,2}... absorbanca vzorca medu

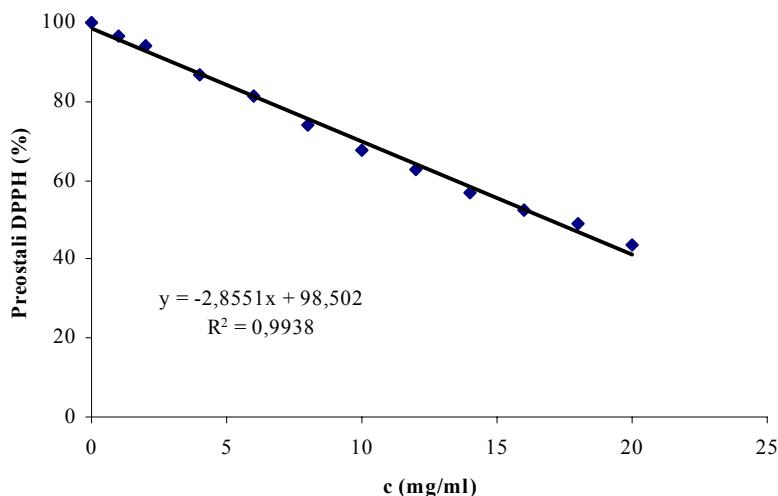
A_{SL}.... absorbanca slepega vzorca

A_K..... absorbanca kontrolnega vzorca (A_K = 0,791)

Primer izračuna preostalega DPPH (%) v vzorcu K23:

$$\text{preostali DPPH (\%)} = \frac{A_1 - A_{SL}}{A_K} \cdot 100 = \frac{0,767 - 0,003}{0,791} \cdot 100 = 96,6 \text{ (c = 1 mg/mL)}$$

$$\text{preostali DPPH (\%)} = \frac{A_1 - A_{SL}}{A_K} \cdot 100 = \frac{0,398 - 0,057}{0,791} \cdot 100 = 43,1 \text{ (c = 20 mg/mL)}$$



Priloga C2: Odvisnost preostalega DPPH (%) od koncentracije medu

Annex C2: The percentage of remaining DPPH against the honey concentration

Primer izračuna IC₅₀ za vzorec K23 iz enačbe premice:

$$y = -2,8551x + 98,502$$

$$y = 50,0$$

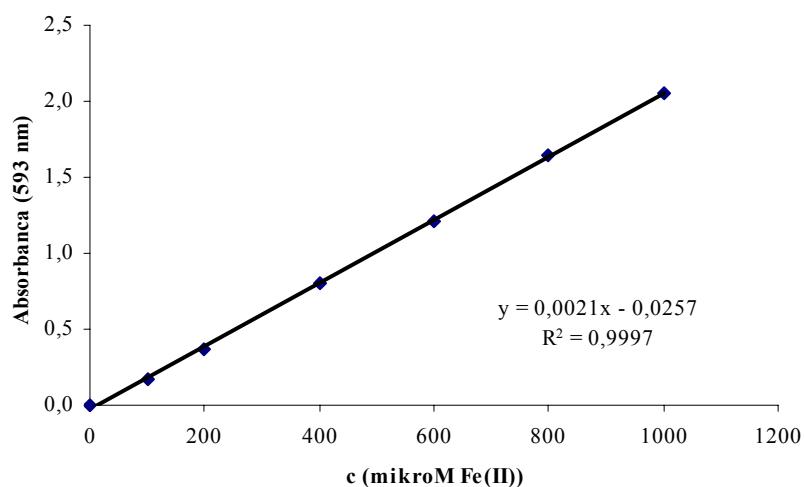
$$IC_{50} = x = 17,0 \text{ mg/mL}$$

Priloga D1: Podatki za umeritveno krivuljo določanja antioksidativne učinkovitosti (AU) s FRAP metodo

Annex D1: Calibration curve data for determination of AU with FRAP method

| c (μM Fe(II)) | A ₁ | A ₂ | \bar{A} |
|---------------------------|----------------|----------------|-----------|
| 0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| 100 | 0,181 | 0,169 | 0,175 |
| 200 | 0,369 | 0,372 | 0,371 |
| 400 | 0,787 | 0,812 | 0,800 |
| 600 | 1,224 | 1,210 | 1,217 |
| 800 | 1,616 | 1,662 | 1,639 |
| 1000 | 2,050 | 2,065 | 2,058 |

\bar{A} - povprečna vrednost absorbanc A₁ in A₂



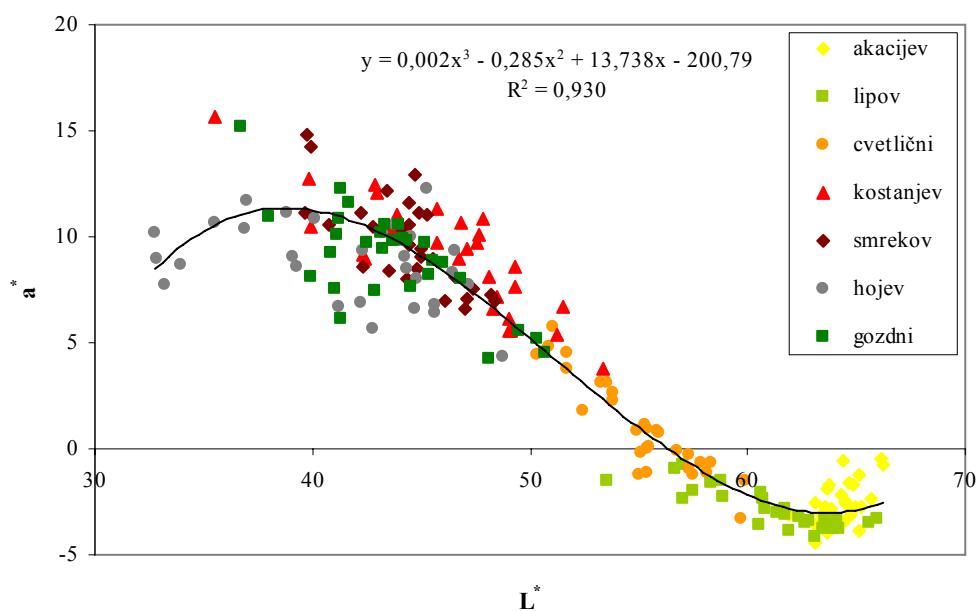
Priloga D2: Umeritvena krivulja za določanje AU s FRAP metodo

Annex D2: Calibration curve for determination of AU with FRAP method

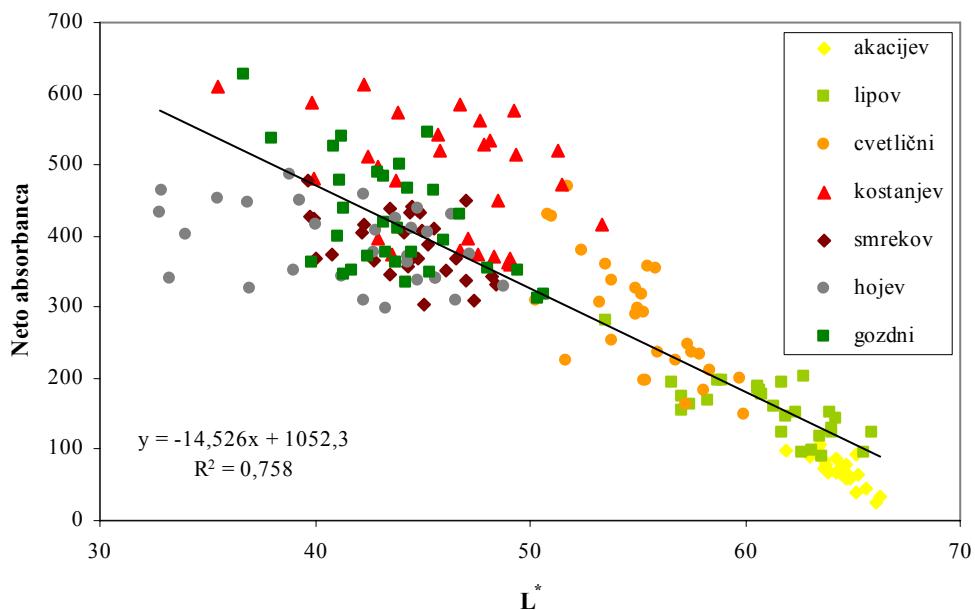
Priloga E1: Barvne karakteristike različnih vrst slovenskega medu
Annex E1: Colour characteristics of different honey types

| Vrsta medu | n | Statistični parameter | L* | a* | b* | Neto absorbanca |
|------------|----|-----------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| akacijev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | 64,26 ± 0,97 | -2,61 ± 1,01 | 18,71 ± 6,26 | 74 ± 21 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 61,93 – 66,27 | -4,34 – (-0,47) | 6,20 – 31,70 | 26 – 106 |
| lipov | 28 | $\bar{x} \pm SD$ | 61,17 ± 3,01 | -2,83 ± 0,95 | 31,74 ± 7,15 | 157 ± 42 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 53,52 – 65,91 | -4,18 – (-0,71) | 19,34 – 43,13 | 90 – 281 |
| cvetlični | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | 55,13 ± 2,60 | 0,98 ± 2,25 | 43,15 ± 4,44 | 283 ± 84 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 50,30 – 59,92 | -3,30 – 5,77 | 34,30 – 51,62 | 150 – 470 |
| kostanjev | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | 46,18 ± 3,94 | 9,15 ± 2,62 | 38,91 ± 5,71 | 481 ± 85 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 35,52 – 53,35 | 3,79 – 15,62 | 23,29 – 49,36 | 360 – 613 |
| smrekov | 29 | $\bar{x} \pm SD$ | 44,21 ± 2,49 | 9,80 ± 2,17 | 35,83 ± 3,06 | 389 ± 45 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 39,63 – 48,38 | 6,60 – 14,81 | 29,63 – 40,90 | 305 – 478 |
| hojev | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | 41,54 ± 4,61 | 8,74 ± 1,88 | 32,14 ± 6,61 | 388 ± 54 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 32,75 – 48,75 | 4,34 – 12,22 | 19,11 – 39,80 | 299 – 486 |
| gozdni | 30 | $\bar{x} \pm SD$ | 43,67 ± 3,28 | 9,00 ± 2,36 | 34,61 ± 4,06 | 424 ± 81 |
| | | $x_{\min} - x_{\max}$ | 36,73 – 50,70 | 4,21 – 15,17 | 25,77 – 41,86 | 313 – 626 |

n: število vzorcev, \bar{x} : povprečna vrednost, SD: standardni odklon, x_{\min} : minimalna vrednost, x_{\max} : maksimalna vrednost



Priloga E2: Zveza med parametrom a* in L* barve medu
Annex E2: Correlation between parameter a* and L* of honey colour



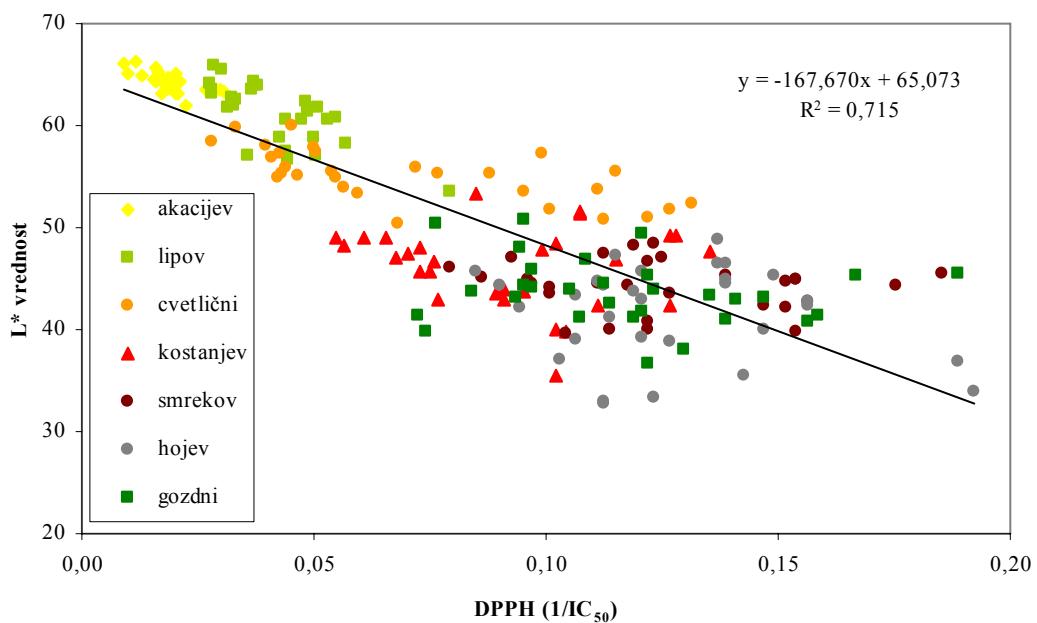
Priloga E3: Zveza med neto absorbenco in parametrom L^* barve medu

Annex E3: Correlation between net absorbance and L^* parameter of honey colour

Priloga F1: Korelacije med individualnimi fenolnimi spojinami
Annex F1: Correlation of individual phenolic compounds

| | KUM | CIM | FM | ELA | FER | MIR | LUT | KVE | API | KAM | PC | PB | KRI | GAL | NAR | TRI | FIS | IR | PS | ERI | ABA 1 | ABA 2 | |
|------|------|-------|--------|------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| KAV | ,112 | ,019 | ,027 | ,089 | ,168 | -,191 | ,037 | ,164 | -,261 | -,091 | -,092 | -,170 | ,172 | -,066 | -,192 | / | -,041 | ,052 | -,262 | ,706** | ,311 | ,498** | |
| KUM | 1 | -,168 | -,120 | ,051 | ,485** | ,094 | ,162 | ,079 | ,202 | ,333** | ,163 | ,128 | ,139 | ,200 | ,302* | -,312** | ,166 | ,243* | ,385** | ,000 | ,225 | ,280* | |
| CIM | | 1 | ,991** | ,223 | -,097 | ,532** | ,201 | ,276* | ,344** | ,120 | -,168 | -,191 | -,238* | -,201 | ,408** | ,246* | -,159 | ,190 | -,245* | ,008 | ,037 | ,000 | |
| FM | | | 1 | ,188 | -,054 | ,533** | ,183 | ,276* | ,335** | ,134 | -,159 | -,188 | -,225 | -,189 | ,432** | ,208 | -,156 | ,199 | -,203 | -,003 | ,046 | ,017 | |
| ELA | | | | 1 | ,014 | ,305* | ,124 | ,065 | ,061 | ,256* | ,110 | ,097 | ,144 | ,065 | ,079 | -,157 | ,049 | ,267* | -,214 | ,088 | ,117 | ,061 | |
| FER | | | | | 1 | ,153 | ,045 | -,117 | ,160 | ,021 | ,035 | ,020 | ,042 | ,080 | ,239* | -,273* | ,077 | ,096 | ,285* | -,109 | ,040 | ,105 | |
| MIR | | | | | | 1 | ,291* | ,209 | ,497** | ,299* | ,005 | ,042 | -,053 | ,009 | ,509** | ,018 | -,041 | ,398** | -,188 | -,126 | ,074 | ,027 | |
| LUT | | | | | | | 1 | ,365** | ,348** | ,352** | ,173 | ,166 | ,003 | ,131 | ,221 | ,272* | ,085 | ,096 | ,073 | -,119 | ,115 | ,121 | |
| KVE | | | | | | | | 1 | ,299* | ,322** | ,082 | ,032 | -,013 | ,041 | ,239* | ,639** | -,036 | ,307** | -,029 | -,170 | -,009 | -,048 | |
| API | | | | | | | | | 1 | ,339** | ,066 | ,056 | -,063 | ,046 | ,296* | ,068 | ,026 | ,342** | -,048 | -,140 | -,031 | -,035 | |
| KAM | | | | | | | | | | 1 | ,512** | ,455** | ,475** | ,454** | ,154 | -,136 | ,266* | ,619** | ,233 | -,234 | ,359** | ,298* | |
| PC | | | | | | | | | | | 1 | ,935** | ,886** | ,953** | -,332** | -,222 | ,826** | ,249* | ,682** | -,121 | ,051 | ,056 | |
| PB | | | | | | | | | | | | 1 | ,823** | ,955** | -,290* | -,227 | ,834** | ,139 | ,653** | -,090 | ,037 | ,042 | |
| KRI | | | | | | | | | | | | | 1 | ,877** | -,428** | -,327** | ,712** | ,245* | ,578** | ,008 | ,091 | ,080 | |
| GAL | | | | | | | | | | | | | | 1 | -,298* | -,255* | ,878** | ,167 | ,740** | -,130 | ,052 | ,074 | |
| NAR | | | | | | | | | | | | | | | 1 | ,170 | -,272* | ,104 | -,192 | -,188 | ,239* | ,236* | |
| TRI | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | -,200 | -,165 | -,266* | -,019 | -,132 | -,187 | |
| FIS | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | ,053 | ,652** | ,022 | -,002 | ,014 | |
| IR | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | -,012 | -,121 | ,114 | ,059 | |
| PS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | -,250* | ,009 | ,091 | |
| ERI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | -,034 | -,065 | |
| ABA1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | ,974** | |
| ABA2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | |

* oz. **: zveza je statistično značilna pri 0,05 oz. 0,01 stopnji tveganja
 odbeljene vrednosti R: med parametri je močna zveza



Priloga F2: Zveza med barvo medu (L^* vrednost) in antioksidativno učinkovitostjo (DPPH)
Annex F2: Correlation between parameter L^* of honey colour and antioxidant activity (DPPH)

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jasna BERTONCELJ

**IDENTIFIKACIJA IN VSEBNOST NEKATERIH
ANTIOKSIDANTOV V SLOVENSKEM MEDU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2008