

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja GABER ŽVEPLAN

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST SLOVENSKEGA MEDU
V POVEZAVI Z NEKATERIMI FIZIKALNO-KEMIJSKIMI
PARAMETRI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SLOVENIAN HONEY IN RELATION
WITH SOME PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana doc. dr. Jasna Bertoneclj in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentorica: doc. dr. Jasna Bertoneclj

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Spodaj podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mateja Gaber Žveplan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 638.162:543.61:577.1(043)=163.6

KG med/ botanično poreklo/ fizikalnokemijske lastnosti/ antioksidativna učinkovitost/ metoda DPPH/ fenolne spojine/ vsebnost vode/ električna prevodnost/ vsebnost pepela/ vrednost pH/ proste kisline/ skupne kisline/ laktoni/ kot zasuka/ barva/

AV GABER ŽVEPLAN, Mateja

SA BERTONCELJ, Jasna (mentorica) / KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2013

IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST SLOVENSKEGA MEDU V POVEZAVI
Z NEKATERIMI FIZIKALNO-KEMIJSKIMI PARAMETRI

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP X, 56 str., 15 pregl., 19 sl., 5 pril., 75 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Namen dela je bil določiti antioksidativno učinkovitost ter nekatere fizikalno-kemijske parametre v sedmih vrstah slovenskega medu (akacijevem, lipovem, kostanjevem, hojevem, smrekovem, cvetličnem in gozdnem medu), letnika 2004. Analizirali smo 42 vzorcev slovenskega medu. Določili smo naslednje parametre: antioksidativno učinkovitost, vsebnost skupnih fenolnih spojin, vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost pepela, vrednost pH, vsebnost prostih in skupnih kislin ter laktonov, kot zasuka in barvo medu. Ugotovili smo, da je bila antioksidativna učinkovitost najmanjša v vzorcih akacijevega medu in največja v vzorcih gozdnega medu. Najmanj skupnih fenolnih spojin sta vsebovala akacijev in lipov med. Največja povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin je bila določena v gozdnem medu. S statistično analizo smo preverili obstoj zvez med analiziranimi parametri. Korelacijska analiza je pokazala povezavo med antioksidativno učinkovitostjo, skupnimi fenolnimi spojinami in barvo (parametra L^* in a^*). Fenolne spojine so ena izmed glavnih komponent, ki so odgovorne za antioksidativni učinek medu. Temnejši medovi so imeli večjo antioksidativno učinkovitost in so vsebovali več skupnih fenolnih spojin v primerjavi s svetlejšimi medovi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 638.162:543.61:577.1(043)=163.6

CX honeys/ botanical origin/ physico-chemical properties/ antioxidant activity/ DPPH method/ phenolics / water content/ electrical conductivity / ash content/ pH value/ free acids/ total acids/ lactones/ specific rotation/ colour/

AU GABER ŽVEPLAN, Mateja

AA BERTONCELJ, Jasna (supervisor) / KOŠMERL, Tatjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2013

TI ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SLOVENIAN HONEY IN RELATION
WITH SOME PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS

DT Graduation thesis (University studies)

NO X, 56 p., 15 tab., 19 fig., 5 ann., 75 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The purpose of our work was to determine antioxidant activity and some physico-chemical parameters in seven types of Slovenian honey (acacia, linden, chestnut, fir, spruce, multifloral and forest honey) collected in the year 2004. Forty-two samples of honey were included in our study. The physico-chemical parameters measured were: antioxidant activity, the contents of total phenolic compounds, water, ash, free and total acids and lactones, pH value, electrical conductivity, specific rotation and colour. It was found out, that acacia honey had the lowest antioxidant activity and forest honey the highest. The lowest average content of total phenolic compounds were determined in acacia and linden honey. Forest honey had the highest total phenolic content. Statistical analysis was done to determine relationships among analysed parameters. Correlation analysis showed that there are relationships between antioxidant activity, total phenolic content and colour (parameters L^* and a^*). It indicates that phenolic compounds are one of the main components responsible for antioxidant effect of honey. Darker honeys had higher antioxidant activity and contained more total phenolic compounds as compared with lighter honeys.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 ZGODOVINA ČEBELARSTVA	2
2.2 IZVOR MEDU	2
2.3 VRSTE MEDU	3
2.4 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI MEDU	4
2.4.1 Voda	4
2.4.2 Ogljikovi hidrati.....	4
2.4.3 Kisline	5
2.4.4 Encimi.....	6
2.4.5 HMF	6
2.4.6 Beljakovine in aminokisline	7
2.4.7 Anorganske snovi.....	7
2.4.8 Vitamini	7
2.5 ANTIOKSIDANTI	7
2.5.1 Delitev antioksidantov	8
2.5.2 Oksidativni stres	8
2.5.3 Mehanizem delovanja antioksidantov	8
2.6 ANTIOKSIDANTI V MEDU	9
2.6.1 Antioksidativna učinkovitost medu	9
2.6.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti medu	10
2.6.2.1 Metoda DPPH.....	10
2.7 FENOLNE SPOJINE.....	12
2.7.1 Razvrstitev fenolnih spojin.....	12
2.7.2 Flavonoidi.....	13
2.7.2.1 Flavonoidi v medu	14
2.7.3 Fenolne kisline.....	14
2.7.3.1 Fenolne kisline v medu	15
2.7.4 Določanje fenolnih spojin v medu.....	15
2.7.4.1 Folin-Ciocalteujeva metoda	16
2.8 KORELACIJE MED VSEBNOSTJO SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO IN NEKATERIMI FIZIKALNO-KEMIJSKIMI PARAMETRI.....	16
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 VZORCI	18
3.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	19
3.2.1 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH (Cai in sod., 2003).....	19
3.2.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo (Gheldof in sod., 2002).....	19

3.2.3	Določanje vsebnosti vode v medu z ročnim refraktometrom (AOAC 969.38, 1999)	20
3.2.4	Merjenje električne prevodnosti z laboratorijskim konduktometrom (Kropf in sod., 2008)	21
3.2.5	Določanje vsebnosti pepela (AOAC 920.181, 1999)	22
3.2.6	Določanje vrednosti pH, vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov (AOAC 962.19, 1999)	22
3.2.7	Merjenje specifičnega kota zasuka medu s polarimetrom (Junk in Pancoast, 1973)	24
3.2.8	Merjenje barve medu z Minolta kromametrom	25
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	25
3.3.1	Osnovni statistični parametri	25
3.3.1.1	Aritmetična sredina ali povprečna vrednost	25
3.3.1.2	Standardna deviacija ali standardni odmik (s)	26
3.3.1.3	Koeficient variabilnosti ali variacije (KV)	26
3.3.2	Analiza povezanosti dveh spremenljivk	26
3.3.2.1	Pearsonov koeficient korelacije (R)	27
3.3.2.2	Koeficient determinacije (R^2)	27
3.3.2.2.1	Levenov test homogenosti variance	27
3.3.2.2.2	Analiza variance (ANOVA)	28
3.3.2.2.3	Duncanov test	28
4	REZULTATI	29
4.1	REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI	29
4.2	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	31
4.3	REZULTATI DOLOČANJA NEKATERIH OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV	32
4.4	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PROSTIH IN SKUPNIH KISLIN TER LAKTONOV	35
4.5	REZULTATI MERJENJA SPECIFIČNEGA KOTA ZASUKA	38
4.6	REZULTATI MERJENJA BARVE MEDU	39
4.7	KORELACIJE (ZVEZE) MED ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO IN OSTALIMI PARAMETRI	40
4.7.1	Korelacije med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin	41
4.7.2	Zveza med parametrom barve L^* in antioksidativno učinkovitostjo	42
4.7.3	Zveza med parametrom barve a^* in antioksidativno učinkovitostjo	43
4.7.4	Zveze med antioksidativno učinkovitostjo in preostalimi fizikalno-kemijskimi parametri	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.2	SKLEPI	49
6	POVZETEK	50
7	VIRI	51

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000).....	13
Preglednica 2. Pregled flavonoidov v različnih vrstah medu (Oomah in Mazza, 1996; Anklam, 1998; Al-Mamary in sod., 2002; Yao in sod., 2003; Kenjeric in sod., 2007; Al in sod., 2009; Cavazza in sod., 2012)	14
Preglednica 3. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu določenih s Folin-Ciocalteuovo metodo (Gheldof in Engeseth, 2002).....	16
Preglednica 4. Vrste medu, število vzorcev in oznake vzorcev	18
Preglednica 5. Meje vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk (Seljak, 1996)	27
Preglednica 6. Antioksidativna učinkovitost (%) po 15 minutah za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri.....	29
Preglednica 7. Antioksidativna učinkovitost (%) po 120 minutah za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri.....	30
Preglednica 8. Vsebnost skupnih fenolnih spojin ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$) za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri.....	31
Preglednica 9. Vsebnost vode, električna prevodnost, vsebnost pepela in vrednost pH v različnih vrstah medu	32
Preglednica 10. Vsebnost prostih kislin (meq/kg) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri	36
Preglednica 11. Vsebnost skupnih kislin (meq/kg) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri	36
Preglednica 12. Vsebnost laktonov (meq/kg) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri	37
Preglednica 13. Specifični kot zasuka ($^{\circ}\text{cm}^3/\text{g dm}$) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri	38
Preglednica 14. Vrednosti parametrov L^* , a^* in b^* v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri	39
Preglednica 15. Korelacije med antioksidativno učinkovitostjo medu in ostalimi parametri.....	41

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Strukturna formula stabilnega prostega radikala DPPH [•] in reducirane oblike DPPH ₂ (Molyneux, 2004).....	11
Slika 2. Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000).....	13
Slika 3. Zemljevid Slovenije z označenimi mesti izvora analiziranih vzorcev medu (vir: Geodetski zavod Slovenije).....	18
Slika 4. Antioksidativna učinkovitost (%) v posameznih vrstah slovenskega medu.....	30
Slika 5. Zveza med antioksidativno učinkovitostjo po 120 minutah in antioksidativno učinkovitostjo po 15 minutah v analiziranih vzorcih medu	31
Slika 6. Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin v posameznih vrstah slovenskega medu.....	32
Slika 7. Povprečna vsebnost vode v analiziranih vzorcih medu	33
Slika 8. Povprečna vrednost električne prevodnosti v analiziranih vzorcih medu	34
Slika 9. Povprečna vsebnost pepela v analiziranih vzorcih medu.....	34
Slika 10. Povprečne vrednosti pH v analiziranih vzorcih medu	35
Slika 11. Vsebnost laktonov, prostih in skupnih kislin (meq/kg) v posameznih vrstah slovenskega medu.....	37
Slika 12. Povprečne vrednosti specifičnega kota zasuka v analiziranih vrstah slovenskega medu ..	38
Slika 13. Povprečne vrednosti parametrov L [*] , a [*] in b [*] v analiziranih vrstah slovenskega medu	40
Slika 14. Zveza med antioksidativno učinkovitostjo (15 minut) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu.....	41
Slika 15. Zveza med antioksidativno učinkovitostjo (120 minut) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu.....	42
Slika 16. Zveza med parametrom barve L [*] in antioksidativno učinkovitostjo (15 min) v analiziranih vzorcih medu.....	43
Slika 17. Zveza med parametrom barve L [*] in antioksidativno učinkovitostjo (120 min) v analiziranih vzorcih medu	43
Slika 18. Zveza med parametrom barve a [*] in antioksidativno učinkovitostjo (15 minut) v analiziranih vzorcih medu	44
Slika 19. Zveza med parametrom barve a [*] in antioksidativno učinkovitostjo (120 minut) v analiziranih vzorcih medu	44

KAZALO PRILOG

- Priloga A1. Antioksidativna učinkovitost, vsebnost skupnih fenolnih spojin, vode, pepela, električna prevodnost in vrednost pH v analiziranih vzorcih različnih vrst slovenskega medu
- Priloga A2. Vsebnost skupnih kislin, prostih kislin in laktonov, kot zasuka in parametri barve L^* , a^* in b^* v analiziranih vzorcih različnih vrst slovenskega medu
- Priloga A3. Pearsonovi koeficienti korelacije
- Priloga B1. Umeritvena krivulja za določanje galne kisline za svetlejšje vrste medu (odtehta medu 5 g)
- Priloga B2. Umeritvena krivulja za določanje galne kisline za temnejše vrste medu (odtehta medu 2 g)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	akacijev med
AU	antioksidativna učinkovitost
AU ₁₅	antioksidativna učinkovitost, izmerjena po 15 minutah
AU ₁₂₀	antioksidativna učinkovitost, izmerjena po 120 minutah
C	cvetlični med
C _{xy}	kovarianca
DN	diastazno število
EP	električna prevodnost
FC	vsebnost skupnih fenolnih spojin, določena s Folin-Ciocalteujevo metodo
G	gozdni med
H	hojev med
HMF	5-hidroksimetil-2-furfural
IC ₅₀	koncentracija učinkovitosti
IN	invertazno število
K	kostanjev med
KV	koeficient variabilnosti
L	lipov med
L* a* b*	parametri barvnega prostora
meq/kg	miliekvivalent/kilogram
n	število vzorcev
°	kotna stopinja
PK	proste kisline
R	Pearsonov koeficient korelacije
R ²	koeficient determinacije
S	smrekov med
s	standardni odmik
SK	skupne kisline
x _{max}	največja vrednost
x _{min}	najmanjša vrednost
$\bar{x}$	povprečna vrednost
[α]	izmerjeni kot zasuka linearno polarizirane svetlobe v kotnih stopinjah (°)
[α] _D ²⁰	specifični kot zasuka linearno polarizirane svetlobe pri valovni dolžini natrijeve D linije pri 20 °C vodne raztopine (°cm ³ /g dm)

1 UVOD

Čebelji pridelki so popolnoma naravna živila, ki jih dobimo neposredno iz narave. Čebele z opravevanjem pripomorejo k ohranjanju biološkega ravnovesja v naravi, omogočajo obstoj različnih živalskih vrst ter človeka, ob tem pa dajejo čebelje pridelke, ki nam v hitrem tempu življenja pomagajo krepiti in ohranjati zdravje. Med je ne samo odličen vir energije ter mineralnih snovi in vitaminov, pač pa omogoča tudi boljše izkoriščanje drugih snovi iz hrane (Goljat, 2007).

Pravilnik o medu (2011) navaja, da je med naravna sladka snov, ki jo izdelajo čebele *Apis mellifera* iz nektarja cvetov ali izločkov iz živih delov rastlin ali izločkov žuželk, ki sesajo rastlinski sok na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju.

V osnovi je med koncentrirana vodna raztopina različnih ogljikovih hidratov, kot so fruktoza, glukoza, maltoza, saharoza in ostali oligo- in polisaharidi (Belitz in sod., 2009).

Med vsebuje tudi različne organske kisline, aminokisline, minerale, aromatične spojine, flavonoide, fenolne kisline, vitamine, barvila, vosek, cvetni prah in različne encime. Poročajo, da je v medu več kot 200 različnih komponent (Ferreira in sod., 2009). Velika koncentracija sladkorjev v medu in ostali dejavniki, kot so nizka vrednost pH, ter vsebnost H_2O_2 , fenolnih spojin in terpenov, dajejo medu lastnosti protimikrobnega živila, ki preprečuje rast bakterij. Nekatere od spojin, ki jih med vsebuje (npr. fenolne kisline in flavonoidi), imajo antioksidativne lastnosti. Prisotnost in vsebnost teh spojin je odvisna od botaničnega porekla medu (Kolankaya, 2001).

Evropska unija proizvede okoli 13 % vsega medu na svetu (200.000 ton). Največja proizvajalka je Španija (33.000 ton), sledijo ji Italija, Madžarska in Romunija (vsaka proizvede približno 22.000 ton medu) ter Portugalska (21.000 ton). Slovenski čebelarji so v letu 2010 pridelali nekaj manj kot 1.700 ton medu. To je okoli 27 % manj kot v letu 2000. Poraba medu na prebivalca se giblje med 0,9 in 1,4 kg medu na leto, in v zadnjih štirih letih narašča. Žal domača proizvodnja medu temu ne sledi, saj se je samooskrba z medom v desetih letih zmanjšala s skoraj 112 % na nekaj manj kot 74 % (SURS, 2011; Evropska komisija, 2012)

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil določiti antioksidativno učinkovitost medu ter nekatere fizikalno-kemijske parametre: vsebnost skupnih fenolnih spojin, vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost pepela, vrednost pH, vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov, kot zasuka in barvo medu. Želeli smo ugotoviti povezavo med antioksidativno učinkovitostjo medu in ostalimi fizikalno-kemijskimi parametri.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Znano je, da botanično poreklo medu določa njegove fizikalno-kemijske in senzorične značilnosti ter verjetno tudi njegovo sposobnost antioksidativnega učinkovanja. Predvidevamo, da bodo temnejše obarvane vrste medu imele večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in večjo antioksidativno učinkovitost. Pričakujemo, da bodo nekatere zveze med obravnavanimi parametri statistično značilne.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA ČEBELARSTVA

Zgodovina medu je veliko starejša od samega človeštva. Do nedavnega je veljalo prepričanje, da so se čebele razvile pred okoli 60 milijoni let. Tako je bilo vse do izrednega odkritja leta 2006, do odkritja drobne preproste čebele, odlično ohranjene v jantarju, o kateri so znanstveniki prepričani, da je stara več kot 100 milijonov let. To odkritje v nekem rudniku na severu Burme je zbudilo posebno zanimanje, ker je imela ta žuželka značilnosti tako današnjih čebel kot tudi os, čeprav je bila bližje prvim. To nakazuje, da sta imeli obe žuželki skupnega prednika (Fleetwood, 2009).

Med se uporablja v prehrani človeka že vrsto let. Sprva le kot sladilo, kasneje pa pri pripravi sladic, alkoholnih pijač (medeni liker), fermentaciji v medeno vino. V medicini se med uporablja za zdravljenje ran ter v kozmetiki pri pripravi krem (Belitz in sod., 2009).

2.2 IZVOR MEDU

Glede na geografski in botanični izvor medicine, način pridobivanja in letni čas poznamo različne vrste medu. Po navadi je med poimenovan po rastlini, na kateri so čebele nabirale nektar oziroma mano (Golob in sod., 2008).

Pravilnik o medu (2011) razvršča med glede na izvor na glavne vrste:

- nektarni med ali cvetlični med, ki je pridobljen iz nektarja cvetov,
- manin med ali gozdni med, ki je pridobljen predvsem iz izločkov žuželk (*Hemiptera*) na živih delih rastlin ali izločkov živih delov rastlin.

Med iz nektarja je pridobljen predvsem iz nektarja cvetov. Sem uvrščamo cvetlični med, ki izvira iz več botaničnih vrst, ter vrste medu, ki po večini izvirajo iz ene botanične vrste, kot so akacijev, ajdov, regratov, sončnični in rešeljnikov med ter med oljne ogrščice (Golob in sod., 2008).

Pretvorba sladkega nektarja v med je pomembna s prehranskega stališča. Nektar, ki ga čebele nabirajo v naravi, priteče v medno golšo. Ko je le-ta polna, se čebela vrne v panj in vsebino preda panjskim čebelam, ki jo po predelavi odložijo v satne celice. V treh do štirih dneh se z evaporacijo odstrani toliko vode, da je suhe snovi okoli 80 %. V tem času encim invertaza, ki ga izločijo čebele, razgradi večino saharoze na druge enostavne sladkorje, ki dajejo končni ogljikohidratni spekter medu. Da med ne absorbira vode in se ne pokvari, čebele pokrijejo celice z voščenimi pokrovc, ki so nepropustni za vodo in zrak (Al-Qassemi in Robinson, 2003).

Med manine medove uvrščamo smrekov in hojev med, ter gozdni med, ki je po izvoru iz različnih virov mane. Lipov in kostanjev med sta mešana medova, saj sta iz nektarja in/ali iz mane (Golob in sod., 2008).

Na gozdnem drevju, grmovju in podrasti nabirajo čebele medicino, mano, cvetni prah in propolis. Surovina za medicino in mano je drevesni sok. Če prehaja skozi medovnike, se

spreminja v medičino ali nektar, če pa so posredniki lubne ušice in kaparji, nastaja iz njega mana ali sladka rosa. Ušice predelajo velike količine drevesnega soka. Iz njega porabijo zase le majhen del sladkorjev in beljakovin, ostalo pa izločijo v obliki sladkih kapljic, katere nabirajo čebele in jih nato predelajo v manin med (Šivic, 2008).

2.3 VRSTE MEDU

Vrstni med je izraz, s katerim označujemo med, ki je bil pridobljen po večini iz nektarja ali mane ene same rastlinske vrste. Med označen kot vrstni, mora na splošno vsebovati več kot 45 % cvetnega prahu ene vrste. So pa med vrstnimi medovi tudi razlike glede vsebnosti cvetnega prahu. V kostanjevem medu mora biti najmanj 90 % cvetnega prahu *Castanea* sp., medtem ko je v sivkinem medu dovolj že 15 % cvetnega prahu *Lavandula* sp. Na Hrvaškem velja predpis, da mora akacijev med vsebovati najmanj 20 % cvetnega prahu *Robinia pseudoacacia*. Med slovenske vrstne medove spadajo akacijev, lipov, kostanjev, ajdov, hojev, smrekov, regratov med in med oljne ogrščice ter rešeljike (Golob in sod., 2008; Gomes in sod., 2010; Kenjeric in sod., 2007).

Akacijev med

Akacijev med je zelo svetel, skoraj brezbarven in ima zelo nežen vonj ter šibko aromo. Zanj je značilno, da ima najnižjo električno prevodnost med vsemi vrstami medu v Sloveniji. Tudi vrednost pH te vrste medu je najnižja. Ostaja v tekočem stanju in zelo redko kristalizira (Golob in sod., 2008).

Lipov med

Je svetlo rumene do slamnate barve z zelenim odtenkom. Proizveden je lahko iz nektarja in/ali mane, zato ima lastnosti tako nektarnih, kot tudi maninih medov. Električna prevodnost te vrste medu je lahko od 0,5 mS/cm naprej, lahko pa je tudi višja od 1,0 mS/cm. Ponavadi hitro kristalizira. Okus je po intenzivnosti srednje do močno sladek. Zaznaven je srednje do močno svež okus po mentolu (Golob in sod., 2008).

Kostanjev med

Kostanjev med je rjave barve z rdečim odtenkom. Po navadi ne kristalizira. Morebitna kristalizacija je odvisna od vsebnosti nektarja cvetličnega medu ali mane. Električna prevodnost je zelo visoka, lahko tudi več kot 2 mS/cm. Značilen je grenek vonj in okus ter intenzivna aroma (Golob in sod., 2008).

Hojev med

Barva hojevega medu je temno sivorjava z zelenim odtenkom. Zanj je značilna aroma po karamelu in mleku v prahu. Po navadi ne kristalizira, po daljšem času se lahko pojavi plastenje. Električna prevodnost mora biti po pravilniku več kot 0,8 mS/cm (Golob in sod., 2008).

Smrekov med

Značilnosti smrekovega medu, ki je maninega izvora, sta rdečerjava barva in sijoča površina. Ponavadi ne kristalizira. Značilno je, da je zelo vlečljiv. Aroma spominja na sirup iz smrekovih vršičkov. Električna prevodnost mora biti večja od 0,8 mS/cm (Golob in sod., 2008).

Cvetlični med

Cvetlični med je po svojih senzoričnih lastnostih lahko raznovrsten, saj so te odvisne od vrste cvetov, na katerih so čebele nabrale nektar. Barva je lahko zelo različna, od slamnato rumene do rjave. Hitro lahko kristalizira. Aroma je pestra in raznolika. Lahko je zelo prijetnega vonja. Električna prevodnost mora biti manjša od 0,8 mS/cm (Golob in sod., 2008).

Gozdni med

Gozdni med je mešanica različnih vrst mane, zato se lahko vzorci gozdnega medu med sabo zelo razlikujejo v barvi, vonju, okusu in aromi. Zanj je značilen precej intenziven vonj, ki je lahko zelo različen glede na vrsto mane. Je srednje do močno sladek. Električna prevodnost mora biti več kot 0,8 mS/cm (Golob in sod., 2008).

2.4 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI MEDU

2.4.1 Voda

Vsebnost vode je eden od parametrov za določanje kakovosti medu. Pravilnik o medu (2011) določa, da med lahko vsebuje do 20 % vode.

Čim manjša je vsebnost vode v medu, tem večja je njegova obstojnost in tem manjša je možnost, da bi se pokvaril (Meglič, 2004).

Vsebnost vode je odvisna od vrste in intenzivnosti paše, podnebnih razmer, od vrste panja, tehnologije in od čebelarjenja. Če je v medu manj kot 15 % vode, je ta bolj viskozen, slabo tekoč in hitreje kristalizira. Med z večjim odstotkom vode je občutno bolj tekoč (Golob in sod., 2008).

2.4.2 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati so kot glavna sestavina medu odgovorni za njegove fizikalno-kemijske lastnosti tj. za viskoznost, kristalizacijo in higroskopnost. Sladkorji v medu predstavljajo 95 % njegove suhe snovi. Glavna sladkorja v medu sta monosaharida glukoza in fruktoza. Poleg njiju so v medu še različni oligosaharidi:

- disaharidi (saharoza, maltoza, maltuloza, koibioza, izomaltoza, nigerioza, turanoza, laminaribioza, α in β -trehaloza, gentibioza, palatinoza, celibioza),
- trisaharidi (maltotrioza, melecitoza, panoza, erloza, rafinoza, izomaltotrioza, 3- α -izomaltozil glukoza, 1-kestoza, panoza, izopanoza, teanderoza, centoza, laminaritrioza),
- tetrasaharidi (izomaltotrehaloza, izomaltopentoza) (Anklam, 1998; Božnar, 2003; Doner, 2003; Meglič, 2004; Golob in sod., 2008).

Vsebnost posameznih sladkorjev v medu je odvisna od izvora medu. S senzoričnega in fizikalnega stališča je pomembno predvsem razmerje fruktoza/glukoza. To razmerje nam skupaj z razmerjem glukoza/voda pomaga predvideti, kako hitro bo med kristaliziral. Med, ki vsebuje manj glukoze in več fruktoze, ostane dlje časa tekoč (Meglič, 2004).

Večina ogljikovih hidratov v medu, od 65 do 95 % vseh, je invertni sladkor, ki je mešanica monosaharidov fruktoze in glukoze. V medu iz nektarja je vsebnost invertnega sladkorja večja (> 65,5 %) kot v medu iz mane (> 59 %) (Golob in sod., 2008).

Pravilnik o medu (2011) navaja, da je skupna vsebnost fruktoze in glukoze v cvetličnem medu najmanj 60 g/100 g v maninem pa najmanj 45 g/100 g. Vsebnost saharoze je v medu na splošno do 5 g/100 g, v akacijevem medu pa jo je dovoljeno največ 10 g/100 g medu.

Kasenburger (2006) navaja, da je bilo v analiziranem nektarnem medu povprečno 78,95 g sladkorjev/100 g medu, v medu iz mane pa povprečno 79,74 g sladkorjev/100 g medu.

Med bi lahko šteli med potencialne prebiotike, ker vsebuje oligosaharide, ki stimulirajo rast bifidobakterij. Stres in jemanje antibiotikov poškoduje normalno črevesno mikrofloro med katero spadata *Lactobacilles spp.* in *Bifidobacterium spp.* Prebiotiki so neprebavljiva živila, ki ugodno vplivajo na rast in delovanje bakterij v črevesju. Pomen oligosaharidov je v tem, da bifidobakterije uporabijo oligosaharide v svojem metabolizmu, saj ljudje nimamo encimov za razgradnjo α -galaktozidne vezi. Oligosaharidi se lahko pritrdijo na celično steno bakterij in s tem preprečijo pritrditev bakterij na steno črevesja (Al-Qassemi in Robinson, 2003).

Zaradi velike vsebnosti sladkorjev, kot so fruktoza, glukoza, maltoza, saharoza, in ostalih ogljikovih hidratov, ima med veliko osmolarnost. Protimikrobna aktivnost v medu je posledica prisotnosti vodikovega peroksida, osmolarnosti, kislosti in vsebnosti fenolnih spojin. Stopnja protimikrobne učinkovitosti se razlikuje glede na botanično poreklo medu (Ulusoy in sod., 2010).

2.4.3 Kisline

Med vsebuje različne organske kisline (ocetno, masleno, citronsko, mravljično, mlečno, jabolčno, glukonsko, oksalno, fumarno, jantarno, glikolno in vinsko) in tudi anorganske kisline, ki mu dajejo značilen okus in aromo, prispevajo k njegovi obstojnosti ter vplivajo na antibakterijsko in antioksidativno delovanje. Po navadi je vrednost pH medu od 3,2 do 5,5. Kislost medu daje prisotnost organskih kislin, med katerimi je najpomembnejša glukonska kislina. Izvor teh kislin so sokovi v naravi in čebela sama. Eden od pomembnih parametrov pri preverjanju kakovosti medu je vsebnost prostih kislin. Povečana vsebnost skupnih kislin v medu je lahko znak alkoholne fermentacije in bakterijskega nastanka očetne kisline (Golob in Plestenjak, 1999; Golob in sod., 2008; Božnar, 2003).

Med iz mane vsebuje več mineralnih snovi, zato je vrednost pH višja in je manj kislega okusa (Golob in sod., 2008).

Pravilnik o medu (2011) dovoljuje največ 50 miliekvivalentov prostih kislin v kilogramu medu.

2.4.4 Encimi

Med vsebuje različne encime, ki izvirajo iz čebel, nektarja ali mane in cvetnega prahu in pomembno sodelujejo pri nastajanju medu iz medičine. Najpomembnejši encimi v medu so: invertaza (glukozidaza), diastaza (amilaza) in glukoza oksidaza. Poleg njih sta v medu še encima katalaza in kislja fosfataza (Božnar, 2003; Golob in sod., 2008).

Encim diastaza (β -amilaza) izvira izključno iz čebel. Optimalna vrednost pH za delovanje encima je med 5,0 in 5,3. V primerjavi z invertazo je diastaza bolj toplotno stabilna (Belitz in sod., 2009).

Pravilnik o medu (2011) določa, da vrednost diastaznega števila ne sme biti manjša od 8, razen za medove, ki imajo majhno naravno vsebnost encimov (npr. medovi iz citrusov) in vrednost HMF (5-hidroksimetil-2-furfural) največ 15 mg/kg, je lahko diastazno število najmanj 3.

Encim invertaza (α -glukozidaza) v glavnem izvira iz izločkov čebeljih krmilnih žlez in hidrolizira maltozo ter ostale α -glukozide v pH območju od 5,8 do 6,5. Invertazna in diastazna aktivnost ter vrednost HMF nam povedo, če je bil med toplotno pregret ali ne (Belitz in sod., 2009).

Encim glukoza oksidaza, ki izvira iz čebel, je odgovoren za antibakterijsko delovanje medu. V medu je ta encim normalno neaktiven. Optimalen pH za delovanje encima je 6,1. Encim oksidira glukozo (100 %) in manozo (9 %). Nastaneta glukonska kislina in vodikov peroksid. (Al-Mamary, 2002; Belitz in sod., 2009).

Katalaza je encim, ki vodikov peroksid razgradi v vodo in kisik. Prisoten je tako v nektarju, kot v pelodu (Božnar in Senegačnik, 1998).

Ovčec (2007) je določila diastazno in invertazno število 84 vzorcem različnih vrst slovenskega medu. Najnižjo povprečno vrednost diastaznega števila (DN) je imel akacijev med (DN = 9,5), najvišjo pa kostanjev (DN = 22,0). Najnižjo povprečno vrednost invertaznega števila je imel akacijev med (IN = 6,5), najvišjo pa smrekov (IN = 20,4) in gozdni med (IN = 20,1).

2.4.5 HMF

HMF (5-hidroksimetil-2-furfural) je sestavina medu, ki nastaja pri razgradnji fruktoze v kislem okolju, hitrost njegovega nastanka pa je odvisna od temperature. V svežem medu je vsebnost HMF minimalna. Veliko povečanje vsebnosti HMF je lahko posledica pregrevanja medu, dodajanja invertnega sladkorja ali predolgega skladiščenja (Golob in Plestenjak, 1999; Golob in sod., 2008).

Pravilnik o medu (2011) dovoljuje 40 mg HMF v kilogramu medu, v medu s poreklom iz območij s tropsko klimo pa do 80 mg/kg.

2.4.6 Beljakovine in aminokisline

Med vsebuje malo beljakovin od 0,2 do 0,3 g/100 g. Glavni izvor beljakovin v medu je cvetni prah, nekaj pa jih izvira tudi iz nektarja in mane. Običajno vsebujejo več aminokislin temnejši medovi. Glavni aminokislini v medu sta prolin in fenilalanin (Božnar, 2003).

Tominec (2010) je v diplomski nalogi določila vsebnost skupnih beljakovin v 75 vzorcih slovenskega medu. Povprečna vsebnost skupnih beljakovin je bila najmanjša v akacijevem medu (0,14 g/100 g). Sledili so lipov (0,21 g/100 g), cvetlični (0,31 g/100 g), gozdni (0,39 g/100 g) in kostanjev med (0,40 g/100 g), ki je imel največjo povprečno vsebnostjo skupnih beljakovin.

Al- Qassemi in Robinson (2003) navajata, da vsebnost beljakovin v medu variira od 0,1 do 0,4 g/100 g. V medu so določili osemnajst aminokislin, med njimi največ prolina, lizina, glutaminske in aspartamske kisline.

Tudi nekatere aminokisline imajo antioksidativne lastnosti. Vrednost prolina, ki zelo variira med različnimi vrstami medu je merilo za vsebnost skupnih aminokislin. Služi za ugotavljanje kakovosti in določanje stopnje zrelosti medu (Meda in sod., 2005).

2.4.7 Anorganske snovi

Količina mineralnih snovi v medu je odvisna od izvora in intenzivnosti čebelje paše. Čim več je teh snovi raztopljenih v medu, višja je električna prevodnost medu (Božnar, 2003).

Kropf in sod. (2008) navajajo, da imajo nektarne, svetlejše vrste medu nižji masni delež pepela kot manine vrste medu, ki so temnejše barve. Najnižjo povprečno vsebnost pepela je imel akacijev med (0,06 g/100 g), sledili so cvetlični, lipov, gozdni, hojev in smrekov med. Največjo povprečno vsebnost pepela, 0,70 g/100 g, so določili v kostanjevem medu.

Pravilnik o medu (2011) določa, da ima lahko nektarni med električno prevodnost največ 0,8 mS/cm, manin pa najmanj 0,8 mS/cm.

2.4.8 Vitamini

V medu so prisotni predvsem v vodi topni vitamini, to so vitamini B-kompleksa in vitamin C. V med pridejo v glavnem s cvetnim prahom (Božnar, 2003).

2.5 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so tiste sestavine živil oz. dodatki živilom, ki so bodisi lovilci radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in druge oksidativne spremembe senzoričnih in prehranskih lastnosti živil. Spojine, ki so antioksidanti, preprečujejo oksidacijo snovi. Oksidacijo, ki je verižna reakcija, povzročajo oksidanti in radikali (Abram, 2000).

2.5.1 Delitev antioksidantov

Antioksidante razvrščamo v tri skupine. V prvi so pravi antioksidanti, ki vežejo proste radikale, v drugi so reducenti, v tretji skupini pa so antioksidantni sinergisti, ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine. V prvi skupini so antioksidanti, ki predstavljajo glavno znotrajcelično antioksidativno obrambo (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza), v drugi so neencimski proteinski antioksidanti v plazmi (transferin, hemoglobin, albumin), v tretji pa so neencimski antioksidanti, ki so v plazmi, celicah in v celičnih membranah (vitamin C, reducirana oblika glutathiona, sečna kislina, vitamin E, betakaroten) (Korošec, 2000).

Po kemijski zgradbi jih ločimo na vodotopne antioksidante in antioksidante topne v maščobah.

Vodotopni antioksidanti so:

- askorbinska kislina,
- glutathion,
- flavonoidi.

Najpomembnejši lipofilni antioksidanti so:

- ubikinon, koencim Q₁₀,
- vitamin E,
- karotenoidi in retinoidi,
- kurkumin (Korošec, 2000).

2.5.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je definiran kot neravnovesje med nastankom prostih radikalov in antioksidativnim obrambnim sistemom. Posledica tega neravnovesja je nastanek nekaterih kroničnih bolezni. Prosti radikali, kot sta superoksidni in hidroksidni radikal, povzročajo različne bolezni, od rakavih obolenj, bolezni srca in ožilja, katarjev do ostalih vnetnih procesov. Poleg tega so oksidativne reakcije najbolj nezaželene reakcije v živilskih izdelkih. Raziskave, ki so bile narejene, so se osredotočale na koristne učinke naravnih antioksidantov. Epidemiološke študije so dokazale obratno povezavo med vnosom sadja in zelenjave ter nastankom bolezni. Ta obratna povezava je posledica vsebnosti antioksidativnih vitaminov oz. provitaminov in polifenolnih spojin v sadju, zelenjavi, ostalih rastlinskih živilih (žita, stročnice in oreški) in v pijačah (vino, čaj, pivo in kakav). Ti prehranski antioksidanti pomembno vplivajo na izboljšanje antioksidativnega obrambnega sistema (Gheldof in sod., 2002; Aljadi in Kamaruddin, 2004).

2.5.3 Mehanizem delovanja antioksidantov

Spojine, kot so antioksidanti, preprečujejo oksidacijo snovi. Oksidacijo, ki je verižna reakcija, povzročajo oksidanti in radikali. Vendar vsi radikali niso oksidanti in obratno vsi oksidanti ne radikali (Pryor, 1994).

Učinkovitost antioksidantov je odvisna od redukcijskega potenciala radikala z enim elektronom manj kot starševska spojina. Čeprav je redukcijski potencial glavni dejavnik pri tem, kako učinkovita bo neka spojina kot antioksidant, je pomembna tudi polarnost ali

nepolarnost same spojine in iz tega izvirajoča porazdelitev antioksidanta med polarnim in nepolarnim medijem in kako se določen antioksidant absorbira v organizmu (Abram, 2000).

Za fenolne antioksidante predpostavljajo, da zaustavljajo oksidacijo lipidov, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom. Učinkovitost radikalov je tem večja, čim manjša je jakost vezi. Pri tem nastali fenoksilni radikal ne sme sprožiti novih radikalskih reakcij, niti se hitro oksidirati. Fenolni antioksidanti so dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča (Shahidi in Naczk, 1995).

2.6 ANTIOKSIDANTI V MEDU

Nektar, katerega čebele predelajo v med, vsebuje relativno veliko vode (od 30 do 90 %), zato je velika verjetnost, da je večina antioksidantov v medu topnih v vodi. Poleg vodotopnih antioksidantov najdemo v medu tudi v maščobi topne antioksidante. Med njih spadajo α -tokoferol in karotenoidi (Frankel in sod., 1998; Pichichero in sod., 2009).

Velika koncentracija sladkorjev v medu in ostali dejavniki, kot so nizka vrednost pH, H_2O_2 , fenolne spojine in terpeni dajejo medu lastnosti protimikrobnega živila, ki preprečuje rast bakterij. Med lahko hranimo dlje časa in ni nevarnosti, da bi se nam pokvaril. Visok osmotski pritisk še dodatno preprečuje rast mikroorganizmov (Kolankaya, 2001; Al-Mamary in sod., 2002).

Med spojine, ki imajo antioksidativni učinek, spadajo flavonoidi (krizin, pinocembrin, pinobanksin, kvercetin, kamferol, luteolin, galangin, apigenin, hesperetin, miricetin) in fenolne kisline (kavna, *p*-kumarna, ferulna, elaginska, klorogenska). Te antioksidativne spojine sintetizirajo rastline kot sekundarne produkte in služijo rastlini kot obrambni mehanizem (Gheldof in sod., 2002).

Z več študijami so dokazali, da ima med iz manuke (*Leptospermum scoparium*) najbolj učinkovito protimikrobno delovanje in da dobro vpliva na celjenje ran (Persano Oddo in Piro, 2004; Yao in sod., 2004; Tonks in sod., 2007; Mavric in sod., 2008).

2.6.1 Antioksidativna učinkovitost medu

Med vsebuje veliko komponent, ki delujejo kot antioksidanti. Med njimi so α -tokoferol, askorbinska kislina, flavonoidi, fenolne kisline ter encimi: glukoza oksidaza, katalaza in peroksidaza (Nagai in sod., 2001).

Več študij kaže na to, da se antioksidativna učinkovitost razlikuje glede na botanično poreklo medu. Največji vpliv na antioksidativno učinkovitost ima botanično poreklo medu, predelava in skladiščenje pa vplivata v manjši meri (Lachman in sod., 2010).

Pichichero in sod. (2008) so dokazali, da sta imela italijanski akacijev in pomarančni med večjo antioksidativno učinkovitost kot timijanov med in mešan med.

Nagai in sod. (2001) poročajo, da je imel ajdov med v primerjavi z medom iz grahovca (najbolj znano kitajsko zelišče) in akacijevim medom največjo antioksidativno učinkovitost. V raziskavi so dokazali, da imajo temneje obarvani medovi večjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi s svetlejšimi vrstami medu.

Aljadi in sod. (2004) poročajo, da je antioksidativna učinkovitost malezijskega medu iz čajevca značilno večja kot v kokosovem medu.

Z dodatkom medu lahko preprečimo encimsko porjavenje sadja in zelenjave, lipidno oksidacijo mesa, med lahko zavre rast patogenih mikroorganizmov in potencialnih kvarljivcev v živilih (Lachman in sod., 2010).

Nagai in sod. (2001) so proučevali vpliv toplotne obdelave na antioksidativno učinkovitost medu. Ugotovili so, da je po toplotni obdelavi na 100 °C za 10-30 min antioksidativna učinkovitost medu strmo padla. Vzrok za padec aktivnosti ni samo razgradnja vitaminov B₁, B₂ in C, ampak tudi encimov katalaze in peroksidaze ter ostalih komponent (fenolnih spojin).

Wang in sod. (2004) so prav tako proučevali vpliv toplotne obdelave in shranjevanja na antioksidativno učinkovitost medu iz detelje in ajde. Ti dve vrsti medu imata zelo različno antioksidativno učinkovitost, barvo in kemijsko sestavo. Na med iz detelje toplotna obdelava ni imela posebnega učinka, medtem ko je imel toplotno obdelan ajdov med za povprečno 24 % manjšo antioksidativno učinkovitost kot neobdelan ajdov med. Šest mesecev shranjen, toplotno neobdelan ajdov med pa je imel za 49 % manjšo antioksidativno učinkovitost. Ugotovili so, da sta bili izmerjeni antioksidativni učinkovitosti toplotno obdelanega in neobdelanega ajdovega medu po šestih mesecih skladiščenja zelo podobni.

2.6.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti medu

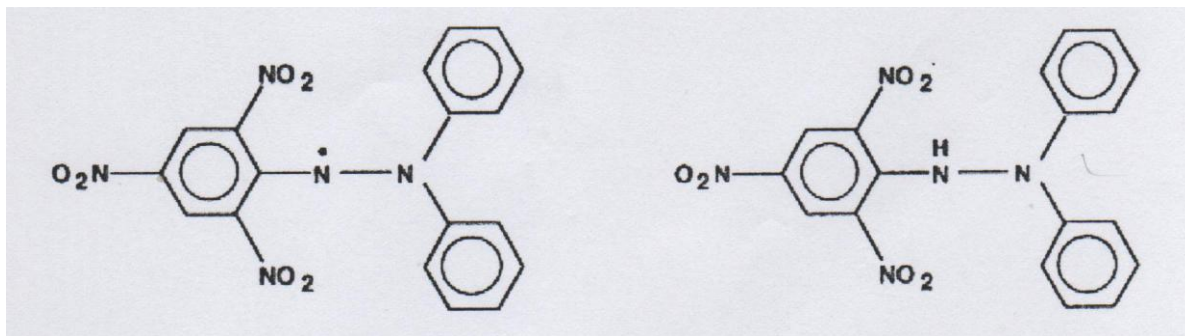
Za natančno določanje antioksidativne učinkovitosti medu je potrebno uporabljati različne metode, ki temeljijo na različnih principih in eksperimentalnih razmerah. Kombinacija spektroskopskih in kemometričnih metod je uporabna kot standardna metoda za določanje antioksidativnih lastnosti medu (Beretta in sod., 2005; Lachman in sod., 2010).

Za določanje antioksidativne učinkovitosti medu se uporablja več metod:

- določanje aktivnih kisikovih spojin (superoksidni anion, peroksilni in hidroksilni radikali),
- sposobnost lovljenja radikalov (npr. metoda DDPH),
- encimsko in neencimsko določanje inhibicije lipidne peroksidacije (Meda in sod., 2005).

2.6.2.1 Metoda DPPH

Je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne učinkovitosti. Leta 1950 jo je vpeljal Blois z namenom, da odkrije donorje vodika (Molyneux, 2004).



Slika 1. Strukturna formula stabilnega prostega radikala DPPH[•] in reducirane oblike DPPH₂ (Molyneux, 2004)

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) je stabilen prosti radikal, ki ima sposobnost delokalizacije prostega elektrona okoli celotne molekule, da molekule ne dimerizirajo. Pri večini prostih radikalov pride do nastanka dimerov.

Pri reakciji pride do obarvanosti v vidnem spektru, zato lahko uporabimo spektroskopijo. Barva se spremeni od vijolične do rumene in absorbanca se pri 517 nm zmanjša (Molyneux, 2004; Roginsky in Lissi, 2004; Ulusoy in sod., 2010).

Antioksidanti ob interakciji z DPPH[•] prenesejo elektron ali vodikov atom k DPPH[•] in na ta način nevtralizirajo njegov prosti radikal. DPPH radikal je predstavljen kot Z[•], donor molekule pa kot AH. Primarna reakcija je naslednja:



pri čemer je ZH reducirana oblika, A[•] pa prosti radikal, ki nastane pri prvi stopnji (Molyneux, 2004).

Pri tej metodi obstajata dve varianti in sicer dinamična in statična. Pri dinamični metodi se meri količina DPPH, ki razpade po dodatku vzorca, ki vsebuje fenolne spojine. Pri statični metodi pa spremljamo količino DPPH, ki se porabi za vezavo z donorjem vodika (Molyneux, 2004; Roginsky in Lissi, 2004; Ulusoy in sod., 2010).

Rezultate metode DPPH lahko izražamo na več načinov in sicer kot koncentracijo učinkovitosti (IC₅₀) ali pa z deležem inhibicije (%).

➤ IC₅₀

Koncentracija učinkovitosti je parameter s katerim lahko interpretiramo rezultate metode DPPH. Definirana je kot koncentracija substrata, ki povzroči 50 % zmanjšanje absorbance radikala DPPH[•], kar se kaže v spremembi barve iz vijoličaste v rumeno.

Ima pa parameter IC₅₀ kar nekaj slabih strani. Ena izmed teh je, da avtorji člankov večkrat ne podajo koncentracije radikala DPPH[•] v testni raztopini, kar nam onemogoča primerjavo z rezultati drugih avtorjev. Slabost je tudi ta, da je pri večji antioksidativni učinkovitosti, vrednost IC₅₀ nižja, kar je moteče predvsem pri grafični predstavitvi rezultatov. Temu se izognemo, če podajamo rezultate v obliki 1/IC₅₀ (Molyneux, 2004).

➤ delež inhibicije (%)

Uporablja se pogosto in je definiran z naslednjo enačbo:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \left(\frac{(A_0 - A_c)}{A_0} \right) \cdot 100 \quad \dots(2)$$

A_0 je absorbanca slepega vzorca, A_c pa absorbanca testiranega vzorca (Molyneux, 2004).

Pri določanju antioksidativne učinkovitosti 22 vzorcev španskega medu z metodo DPPH je bilo ugotovljeno, da imajo večjo povprečno antioksidativno učinkovitost manini medovi (% inhibicije je znašal 64,39 % za manine medove in 34,44 % za nektarne medove) (Lorente in sod., 2007).

Frankel in sod. (1998) so v svoji raziskavi z metodo DPPH analizirali antioksidativno učinkovitost različnih vrst medu. Največjo antioksidativno učinkovitost so določili pri ajdovem medu, sledili so sončnični med, med iz detelje, sojin med, pomarančni med in evkaliptusov med.

Pichichero in sod. (2009) so z metodo DPPH določili, da imata akacijev in pomarančni med večjo antioksidativno učinkovitost kot timijanov in cvetlični med.

Socha in sod. (2011) so analizirali sedem vrst poljskega medu in sicer lipov, nektarno-manin, repični, manin, akacijev, ajdov in mešan cvetlični med. Ajdov med je imel največjo antioksidativno učinkovitost 46,40 %, medtem ko je imel repični med 18,21 %.

Perna in sod. (2012) so analizirali 78 vzorcev medu iz južne Italije. Ugotovili so, da ima največjo antioksidativno učinkovitost, izraženo kot % inhibicije, kostanjev med (78,73 %), sledili so evkaliptusov, mešan cvetlični, med iz medenice (*Hedysarum* spp.) in citrusov med (54,29 %), ki je imel najmanjšo antioksidativno učinkovitost.

2.7 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in eno ali več -OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več -OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime – polifenoli (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine so pomembna skupina in vplivajo na funkcionalne lastnosti medu. So naravne spojine, ki so pomembne zaradi svojih terapevtskih učinkov (Alvarez-Suarez in sod., 2010).

2.7.1 Razvrstitev fenolnih spojin

Rastline vsebujejo znatne količine fenolnih spojin in vsaka rastlina ima določen fenolni profil. Koncentracija in vrsta fenolnih spojin v medu je odvisna od botaničnega porekla

medu in vpliva na biološke učinkovitosti, med drugim na antioksidativno, protimikrobno, protivirusno in antikancerogeno učinkovitost (Ulusoy in sod., 2010).

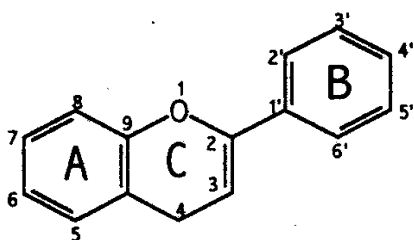
Preglednica 1. Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000)

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C_6	fenoli
7	C_6C_1	fenolne kisline
8	C_6C_2	fenilacetne kisline
9	C_6C_3	hidroksicimetne kisline fenilpropani kumarini izokumarini kromoni
10	C_6C_4	naftokinoni
13	$C_6C_1C_6$	ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	stilbeni antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	flavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	lignani neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	biflavonoidi
n	$(C_6C_3)_n$	lignini
	$(C_6)_n$	melanini
	$(C_6C_3C_6)_n$	kondenzirani tanini

2.7.2 Flavonoidi

Flavonoidi se, tako kot vse drugi fenolne spojine, nahajajo samo v živilih rastlinskega izvora. Sadje ponavadi vsebuje večje vsebnosti flavonoidov kot zelenjava. So sekundarni metaboliti rastlin in imajo nalogo, da rastlino varujejo pred neugodnimi vremenskimi razmerami, kot je suša (Vrhovšek, 2001; Winkel-Shirley, 2002).

Zgrajeni so iz 15 C-atomov, osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označimo s $C_6C_3C_6$. Osnovno strukturno formulo flavonoidov oziroma 2-fenilbenzopirana prikazuje slika 2.



Slika 2. Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000)

Do sedaj je poznanih več kot 5000 različnih flavonoidov. V naravi so flavonoidi glikolizirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza), ali pa tudi daljše verige na obroč. Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon.

Flavonoide ločimo po aglikonu na: flavone, flavonole, katehine, flavanone, dihidroflavonole, flavan-3,4-diole, antocianidine, izoflavone, neoflavone, kalkone, dihidrokalkone in avrone (Abram, 2000).

Naravni antioksidanti, kot so flavonoidi, povzročajo različne učinke od antibakterijskih, antioksidativnih, protivnetnih do antialergijskih (Al-Mamary in sod., 2002).

2.7.2.1 Flavonoidi v medu

Flavonoidi so pomembne spojine v medu, ki so prisotne v manjših količinah in izvirajo v glavnem iz cvetnega prahu rastlin, katere obiskujejo čebele. Rastline biosintetizirajo različne fitokemijske sestavine, ki lahko ugodno vplivajo na zdravje. Več študij kaže na to, da ima med glede na botanično poreklo večjo ali manjšo antioksidativno in antibakterijsko aktivnost. Bioaktivne substance se prenašajo iz rastlin v nektar in naprej v med. V medu tako najdemo različne flavonoide, ki so odvisni od botaničnega porekla. Glavni flavonoidi, ki jih vsebuje med so flavoni (krizin, luteolin, galangin), flavanoni (pinocembrin, pinobanksin, naringerin, hesperetin) in flavonoli (kvercetin, kamferol, mircetin) (Anklam, 1998; Estevinho in sod., 2008; Kaškonienė in Venskutonis, 2010; Perna in sod., 2012; Cavazza in sod., 2012).

Preglednica 2. Pregled flavonoidov v različnih vrstah medu (Oomah in Mazza, 1996; Anklam, 1998; Al-Mamary in sod., 2002; Yao in sod., 2003; Kenjerić in sod., 2007; Al in sod., 2009; Cavazza in sod., 2012)

Vrsta medu	Flavonoid
ajdov med	rutin
akacijev med	krizin, galangin, kamferol
citrusov med	hesperetin, galangin
lipov med	galangin
manukin med	kvercetin, izoramnetin, krizin, luteolin
rožmarinov med	8-metoksi-kamferol
sivkin med	luteolin
sojin med	genistein, daizein
sončnični med	kamferol, kvercetin, naringerin, pinocembrin

Cavazza in sod. (2012), so v dvajsetih vzorcih medu (evkaliptusov, citrusov, kostanjev in lipov med) s HPLC analizo dokazali flavanon hesperetin le v citrusovem medu. Flavon galangin so dokazali v citrusovem in lipovem medu. Naringenin, pinocembrin in krizin so bili prisotni v vseh analiziranih medovih.

2.7.3 Fenolne kisline

Fenolne kisline so prisotne v živilih rastlinskega izvora in vplivajo na barvo, senzorične lastnosti in prehranske ter antioksidativne lastnosti živil. Med sekundarnim metabolizmom rastlin pride do tvorbe hidroksibenzojskih in hidroksicimetnih kislin. Dokazali so, da je koncentracija teh snovi različna v različnih rastlinah. Hidroksibenzojske kisline so *p*-hidroksibenzojska, protokatehinska, vanilinska in siringinska, medtem ko so hidroksicimetne kisline *p*-kumarna, kavna, ferulna in sinapinska. Hidroksibenzojske kisline so večinoma prisotne v obliki glikozidov, hidroksicimetne pa v obliki enostavnih estrov (Anklam, 1998; Bertonecelj, 2008).

2.7.3.1 Fenolne kisline v medu

Yao in sod. (2004) so ugotovili, da je bila galna kislina prisotna v vseh analiziranih vzorcih avstralskega evkaliptusovega medu in se lahko uporablja kot marker za to vrsto medu. Nekaterne fenolne kisline kot npr. elaginska kislina se uporabljajo kot marker za medove iz rese, hidroksicimetne kisline (kavna, *p*-kumarna in ferulna kislina) pa za dokazovanje botaničnega porekla kostanjevega medu.

Yao in sod. (2003) so dokazali, da ima med iz novozelandske manuke (*Leptospermum scoparium*) večjo vsebnost skupnih fenolnih kislin, in sicer 14,0 mg/100 g medu, v primerjavi z medom iz Avstralije (*Leptospermum polygalifolium*).

Andrade in sod. (1997) poročajo, da je pri analizi 11 različnih vzorcev medu z elektroforezo imel resin med največjo vsebnost fenolnih kislin in manjšo vsebnost flavonoidov. Citrusov in rožmarinov med sta vsebovala manj fenolnih kislin.

Aljadi in sod. (2004) poročajo, da med iz čajevca vsebuje nekatere fenolne kisline, kot so galna, ferulna, kavna, benzojska in cimetna, medtem ko kokosov med vsebuje galno, kavno in benzojsko kislino, poleg ostalih neznanih fenolnih spojin.

2.7.4 Določanje fenolnih spojin v medu

Fenolne spojine v medu je možno analizirati na različne načine. Najpogosteje se uporablja spektrofotometrična metoda za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin in metoda HPLC za določanje posameznih fenolnih spojin (Vrhovšek, 2001).

Z analizo fenolnih spojin s HPLC je možno določiti botanično in geografsko poreklo nekaterih vrst medu. Tako se flavanon hesperetin lahko uporablja kot marker za medove iz citrusov, flavon kamferol za rožmarinov med in kvercetin za sončnični med (Yao, 2003).

Pichichero in sod. (2009) so s HPLC metodo določili, da je največ fenolnih spojin v šetrajevem medu, sledijo manin med, kostanjev, timijanov, cvetlični, akacijev in pomarančni med.

Estevinho in sod. (2008) v svoji študiji dokazujejo, da so fenolne spojine v medu delno odgovorne za antibakterijski in antioksidativni učinek medu. Pri analizi ekstrakta fenolnih spojin so imeli temnejši medovi večjo antioksidativno učinkovitost kot svetlejši. To kaže na to, da temnejši medovi vsebujejo več fenolnih spojin in imajo zato večjo vsebnost mikrobnih inhibitorjev.

Socha in sod. (2011) so analizirali sedem vrst poljskega medu in sicer lipov, nektarno-manin, repični, manin, akacijev, ajdov in mešan cvetlični med. Vsebnosti skupnih fenolnih spojin so variirale od 4,46 mg_{GA}/100 g za repični med do 15,04 mg_{GA}/100 g za ajdov med.

Perna in sod. (2012) so pri analizi 78 vzorcev medu iz južne Italije določili vsebnosti skupnih fenolnih spojin, ki so si sledile po naslednjem padajočem vrstnem redu: kostanjev > citrusov > med iz medenice > mešani cvetlični > evkaliptusov med.

2.7.4.1 Folin-Ciocalteujska metoda

Je ena izmed najstarejših metod za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin. Reagent, ki je mešanica tungstata in molibdata v močno bazičnem mediju (5-10 % vodna raztopina Na_2CO_3) je občutljiv na polifenolne spojine in antioksidante, ki oddajajo elektrone (askorbinska kislina, vitamin E). Fenolne spojine oksidirajo v bazičnem mediju in tvorijo O_2^- , ki reagira z molibdatom v molibden oksid (MoO^{4+}), ki ima zelo intenzivno absorbanco pri 750 nm. Ponavadi vsebnost skupnih fenolnih spojin, določeno s Folin-Ciocalteujsko metodo, izražamo v ekvivalentih galne kisline. Reagent lahko reagira tudi z drugimi nefenolnimi reducirajočimi komponentami, kar se kaže v večji vsebnosti skupnih fenolnih spojin (Roginsky in Lissi, 2004; Beretta in sod., 2005; Ferreira in sod., 2009).

Preglednica 3. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v medu določenih s Folin-Ciocalteujsko metodo (Gheldof in Engeseth, 2002)

Vrsta medu	Skupne fenolne spojine
ajdov med	456-796 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$
sojin med	269 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$
med iz detelje	128 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$
akacijev med	46 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$

Iz preglednice 3 je razvidno, da je imel ajdov med največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Sledil je sojin med, med iz detelje in akacijev med.

Bertoncelj (2008) je v slovenskem medu določila naslednje vsebnosti skupnih fenolnih spojin: v akacijevem medu 44,9 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$, v lipovem 93,8 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$, v cvetličnem 138,0 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ in v kostanjevem medu 191,7 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$. Največ skupnih fenolnih spojin so vsebovali medovi iz mane, to so gozdni, smrekov in hojev med, povprečne vrednosti so bile od 210,4 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ v gozdnem medu do 232,5 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ v hojevem medu.

Tudi rezultati drugih študij (Al-Mamary in sod., 2002; Al in sod., 2009) potrjujejo, da manini medovi vsebujejo več skupnih fenolnih spojin kot cvetlični medovi, od katerih je imel največjo vsebnost sončnični med.

Meda in sod. (2005) poročajo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin ($\text{mg}_{\text{GA}}/100 \text{ g}$ medu) v nektarnih medovih 32,6, v maninih pa 93,7.

2.8 KORELACIJE MED VSEBNOSTJO SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN, ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO IN NEKATERIMI FIZIKALNO-KEMIJSKIMI PARAMETRI

Aljadi in sod. (2004) v svoji raziskavi navajajo, da je med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin dobra korelacija ter na podlagi tega sklepajo, da je med antioksidativno učinkovit predvsem zaradi fenolnih spojin, ki jih vsebuje. Med vsebuje tako v vodi, kot tudi v maščobah topne antioksidante, kot so α -tokoferol in karotenoidi. Interakcije med njimi povzročijo, da je med idealni naravni antioksidant, ki lahko deluje na različnih mestih v celici.

Vela in sod. (2007) so z analizo 36 vzorcev španskih medov dokazali značilno korelacijo med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, ter med antioksidativno učinkovitostjo in barvo medu. Ločeno so obravnavali nektarne in manine medove. Pri nektarnih medovih sta barva in kislost v povezavi z antioksidativno učinkovitostjo. Pri maninih medovih pa obstaja povezava med antioksidativno učinkovitostjo in električno prevodnostjo medu, medtem ko ni povezave med antioksidativno učinkovitostjo in barvo.

Frankel in sod. (1998) navajajo, da je barva medu v povezavi z vsebnostjo antioksidantov, saj je barva medu odvisna od prisotnih pigmentov (karotenoidov in flavonoidov), ki imajo antioksidativne lastnosti.

Lorente in sod. (2008) ugotavljajo, da obstaja direktna povezava med senzoričnimi lastnostmi in antioksidativno učinkovitostjo medu. Temnejši in manj sladki medovi imajo večjo antioksidativno učinkovitost.

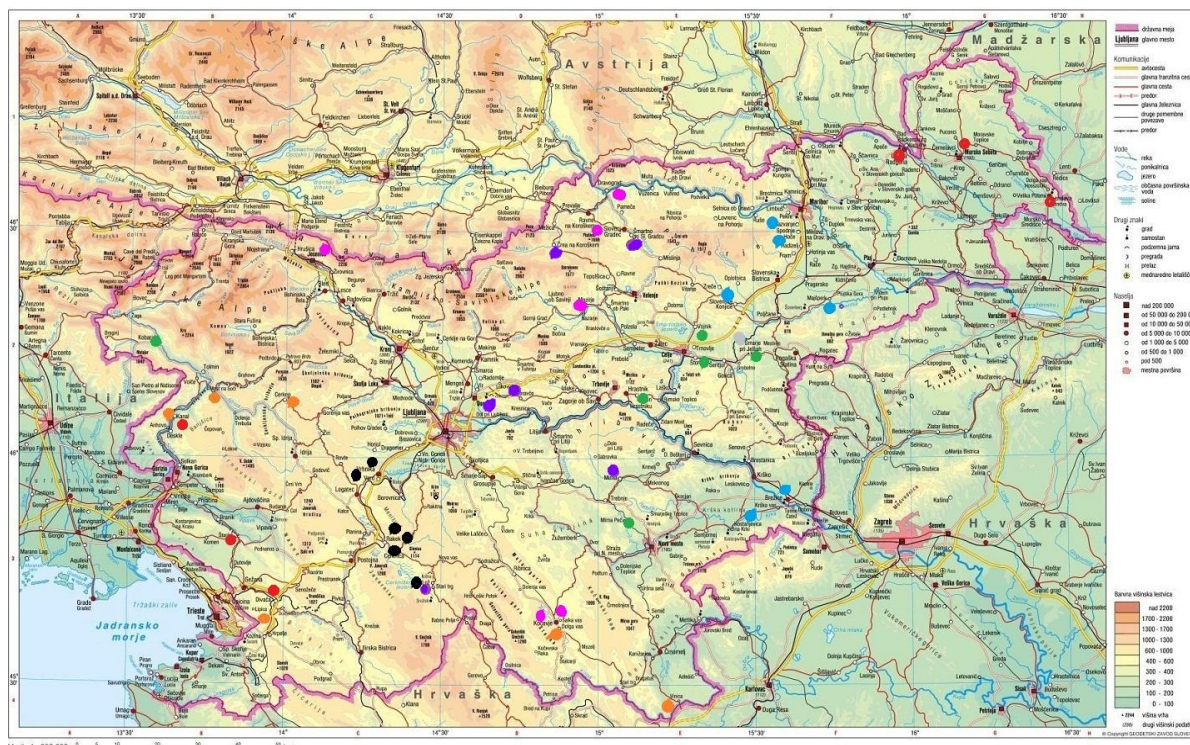
Socha in sod. (2011) so ugotovili močno povezavo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo. Koeficient korelacije je znašal 0,849. Na večjo antioksidativno učinkovitost vplivajo v glavnem fenolne spojine. Manjši delež prispevajo tudi ostale spojine, kot so askorbinska kislina, tokoferol, karotenoidi in prolin.

Perna in sod. (2012) so med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo določili zmerno povezavo, koeficient korelacije je znašal 0,48.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Analizirali smo 42 vzorcev slovenskega medu letnika 2004. V analizo smo vključili po šest vzorcev sedmih vrst medu (akacijevega, lipovega, kostanjevega, hojevega, smrekovega, cvetličnega in gozdnega medu). Vzorce smo dobili neposredno pri čebelarjih. Hranili smo jih v pokritih plastičnih posodah, v temnem prostoru, pri sobni temperaturi.



Slika 3. Zemljevid Slovenije z označenimi mesti izvora analiziranih vzorcev medu (vir: Geodetski zavod Slovenije)

Legenda: **akacijev med**, **lipov med**, **kostanjev med**, **hojev med**, **smrekov med**, **cvetlični med**, **gozdni med**

Preglednica 4. Vrste medu, število vzorcev in oznake vzorcev

Vrsta medu	Število vzorcev	Oznaka vzorcev
akacijev	6	A2, A310, A390, A485, A492, A532
lipov	6	L3, L214, L250, L261, L320, L391
kostanjev	6	K171, K184, K461, K465, K486, K507
hojev	6	H4, H280, H282, H484, H661, H666
smrekov	6	S121, S202, S221, S425, S520, S541
cvetlični	6	C35, C68, C294, C400, C600, C658
gozdni	6	G81, G83, G88, G283, G404, G500

3.2 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

3.2.1 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH (Cai in sod., 2003)

Princip:

Metoda DPPH je ena izmed hitrejših testov za določanje antioksidativne učinkovitosti. DPPH reagira z antioksidativno komponento, ki je donor kisika. Pride do redukcije, kar povzroči, da vijoličasta barva DPPH reagenta prehaja v rumeno. Spremembo absorbance določamo s spektrofotometrom pri 515 nm.

Reagenti:

- 80 % etanol,
- 60 µM DPPH^{*} (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) v 80 % etanolu,
- absolutni etanol,
- destilirana voda.

Aparatura:

Spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 515 nm).

Izvedba:

V čašo smo zatehtali 5,0 g medu in dodali 20 mL destilirane vode. Dobro smo premešali in prenesli v 50 mL merilno bučko ter dopolnili do oznake. Odpipetirali smo 0,1 mL raztopine medu ter dodali 3,9 mL DPPH reagenta. Spektrofotometer smo umerili z 80 % etanolom. Za kontrolo smo vzeli 0,1 mL 80 % etanola kateremu smo dodali 3,9 mL DPPH reagenta. Mešanici smo dobro premešali na mešalu. Po 15 in 120 minutah smo izmerili absorbanco pri 515 nm. Med posameznimi merjenji smo kivete shranjevali v temi.

Račun:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}}{A_{\text{kontrola}}} \right) \cdot 100 \quad \dots(3)$$

3.2.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo (Gheldof in sod., 2002)

Princip:

Spektrofotometrična metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin s Folin-Ciocalteuevim reagentom, ki vsebuje volframat in molibdat. Raztopini izmerimo absorbanco pri 765 nm. Za umeritveno krivuljo uporabimo raztopino galne kisline. Rezultate izrazimo v mg galne kisline na kilogram medu (mg_{GA}/kg medu).

Reagenti:

- 10 % Folin-Ciocalteujev reagent,
- galna kislina,
- 70 % metanol,
- polivinilpolipirrolidon (PVPP),
- destilirana voda,
- Na_2CO_3 (75 g/L).

Aparatura:

- Spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 765 nm).

Izvedba:

V stekleno čašo odtehtamo ustrezno količino medu (2,0 g za temne oz. 5,0 g za svetle medove) in ga raztopimo v približno 20 mL 70 % metanola. Nato vzorec prelijemo v 50 mL merilno bučko in jo dopolnimo do oznake. Odpipetiramo 0,5 mL vzorca medu, dodamo 2,5 mL FC reagenta in po 3 minutah še 2,0 mL Na_2CO_3 . Segrevamo na 45 °C 15 minut in izmerimo absorbanco pri 765 nm.

Za slepi vzorec vzamemo 10 mL raztopine medu in 0,8 g PVPP. Zmešamo in pustimo 10 minut, nato prefiltriramo. Odpipetiramo 0,5 mL filtrata in dodamo 2,5 mL FC reagenta ter po 3 minutah še 2,0 mL Na_2CO_3 . Segrevamo na 45 °C 15 minut in izmerimo absorbanco pri 765 nm.

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v medu smo določili s pomočjo umeritvene krivulje (prilogi B1 in B2), ki smo jo pripravili z raztopinami galne kisline s koncentracijo od 0 do 1250 mg/kg.

3.2.3 Določanje vsebnosti vode v medu z ročnim refraktometrom (AOAC 969.38, 1999)

Princip:

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

Aparatura in oprema:

- Abbejev ročni refraktometer s skalo, prilagojeno za med in termometrom za temperaturno korekcijo (ATAGO, HHR-2N),
- steklene čaše (50 mL),
- steklene palčke.

Priprava vzorca:

Če je med tekoč, ga pred začetkom analize premešamo s palčko ali pretresemo. Če je med kristaliziran, damo zaprto posodo z vzorcem v sušilnik in segrevamo pri temperaturi 40 °C. Med segrevanjem ga premešamo s palčko ali krožno pretresemo, nato ga hitro ohladimo.

Izvedba analize (Golob, 1999):

Na merilno prizmo ročnega refraktometra s plastično žličko nanesemo tanko plast medu tako, da v medu ni nobenih zračnih mehurčkov. Merilno prizmo moramo popolnoma prekriti. Nato nežno zapremo poklopec refraktometra in pritisnemo, da se med razporedi po celotni površini prizme. Refraktometer je umerjen na 20 °C. Refraktometer usmerimo proti viru svetlobe in pogledamo skozi okular. Merjeno vrednost odčitamo v točki, kjer mejna črta seka skalo. Če temperatura merjenja odstopa od 20 °C, odčitamo še korekcijsko vrednost na korelacijski skali, ki je na spodnji skali refraktometra. Odčitano korelacijsko vrednost prištejemo ali odštejemo od izmerjene vrednosti, odvisno od temperature merjenja.

Rezultat:

Iz skale direktno odčitamo % vode, pri tem pa upoštevamo temperaturno korekcijsko vrednost.

3.2.4 Merjenje električne prevodnosti z laboratorijskim konduktometrom (Kropf in sod., 2008)

Princip:

Merjenje specifične električne prevodnosti 20 % vodne raztopine medu (glede na suho snov medu) s konduktometrom pri 20 °C.

Aparatura in oprema:

- laboratorijski konduktometer ISKRA, MA 5950,
- ročni konduktometer CD 601 WP,
- plastične čaše (100 mL),
- steklene palčke.

Priprava vzorca:

Odtehta medu je odvisna od količine vode, ki jo med vsebuje. Po določanju vsebnosti vode v medu preračunamo kakšna mora biti odtehta medu, da bo končna raztopina (100 g) vsebovala 20 ut. % suhe snovi. V plastično čašo odtehtamo ustrezno količino medu in dolijemo destilirano vodo do 100 g ter med raztopimo.

Izvedba analize:

Konduktometer pred začetkom merjenja umerimo z 0,1 M raztopino kalijevega klorida, katerega električno prevodnost je 12,88 mS/cm pri temperaturi 25 °C. Pred merjenjem speremo konduktometer z destilirano vodo in ga do suhega obrišemo. Aparat potopimo v raztopino medu ter počakamo, da se na zaslonu pokaže izmerjena vrednost.

Rezultat:

Rezultat direktno odčitamo s konduktometra v mS/cm (miliSiemens na centimeter).

3.2.5 Določanje vsebnosti pepela (AOAC 920.181, 1999)

Princip:

Suhi sežig vzorca pri temperaturi 600 °C do konstantne mase.

Aparatura in pribor:

- žarilna peč,
- tehtnica z natančnostjo $\pm 0,1$ mg,
- porcelanski lonček.

Izvedba:

V prežarjen in stehtan porcelanski lonček odtehtamo 5 do 10 g medu. Lonček položimo na električno ploščo in ga počasi segrevamo tako, da večji del vode izhlapi. Pazimo, da zaradi penjenja vzorca ne izgubljam. Ko se začne iz vzorca kaditi, ga nad plamenom žarimo do pooglenelosti. Ostanek žarimo v žarilni peči pri 600 °C do konstantne mase, približno 13 ur. Lončke nato ohladimo v eksikatorju in tehtamo.

Rezultat:

Vsebnost pepela izračunamo po enačbi:

$$VP \text{ (g/100 g)} = \left(\frac{a}{b} \right) \cdot 100 \quad \dots(4)$$

VP vsebnost pepela

a masa pepela (g)

b odtehta vzorca (g)

3.2.6 Določanje vrednosti pH, vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov (AOAC 962.19, 1999)

Princip:

Direktno merjenje vrednosti pH v raztopini medu s pomočjo pH metra s kombinirano ion selektivno stekleno elektrodo.

Določanje vsebnosti prostih in skupnih kislin ter laktonov s pomočjo titracijske metode z NaCl in HCl.

Reagenti:

- 0,05 M NaOH,
- 0,05 M HCl.

Aparatura:

- pH meter,
- magnetno mešalo,
- 100 mL steklene čaše in steklene palčke.

Priprava vzorca:

Odtehtamo 10,0 g vzorca v čašo in ga raztopimo v 75 mL destilirane vode.

Izvedba:

Umeritev pH metra:

pH meter umerimo s pomočjo dvotočkovnega umerjanja s pufrom znanih vrednosti pH, in sicer s pH 4 in pH 9.

V čašo z raztopino medu dodamo magnet in na magnetnem mešalu mešamo ves čas titracije. Po umerjanju pH metra potopimo elektrode pH metra v raztopino in zabeležimo začetno vrednost pH. Titriramo z 0,05 M NaOH do pH 8,5. Dodamo 10 mL 0,05 M NaOH in titriramo z 0,05 M HCl do pH 8,3.

Slepi vzorec:

titracija 85 mL destilirane vode z 0,05 M NaOH do pH 8,5.

Rezultati:

Vrednost pH odčitamo z zaslona aparature. Kislost izrazimo kot miliekvivalent dodanega NaOH na kg vzorca.

Vsebnost prostih kislin (FA):

$$FA = (a - b) \cdot c(\text{NaOH}) \cdot 100 \quad \dots(5)$$

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

b volumen 0,05 M NaOH pri titraciji slepega vzorca (mL)

Vsebnost laktonov (LA):

$$LA = (10\text{mL} - d) \cdot c(\text{HCl}) \cdot 100 \quad \dots(6)$$

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

Vsebnost skupnih kislin (TA):

$$TA = FA + LA \quad \dots(7)$$

3.2.7 Merjenje specifičnega kota zasuka medu s polarimetrom (Junk in Pancoast, 1973)

Princip:

Specifični kot zasuka $[\alpha]_D^{20}$ je kot zasuka linearno polarizirane svetlobe pri valovni dolžini natrijeve D linije pri 20 °C vodne raztopine v 2 dm cevi polarimetra.

Reagenti:

- Carrezova raztopina I: 10,6 g kalijevega fero cianida ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) raztopimo v destilirani vodi in dopolnimo do 100 mL,
- Carrezova raztopina II: 24 g cinkovega acetata ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) raztopimo v destilirani vodi, dodamo 3 g ledocetne kisline in dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.

Aparatura in pribor:

- polarimeter,
- čaše (50 mL),
- merilne bučke (50 mL),
- liji,
- filtrirni papir (modri trak),
- erlenmajerice (100 mL),
- pipeta (10 mL).

Priprava vzorca:

Odtehtamo $6,0 \pm 0,5$ g vzorca medu (to ustreza približni 5 g suhe snovi) v 50 mL stekleno čašo in ga raztopimo v destilirani vodi. Ko se med raztopi, ga kvantitativno prenesemo v 50 mL merilno bučko, dodamo 5 mL Carrezove raztopine I in temeljito mešamo 30 s. Sledi dodatek Carrezove raztopine II, ponovno temeljito mešamo 30 s in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Tako pripravljeno raztopino pustimo stati 24 h.

Izvedba analize:

Naslednji dan raztopino prefiltriramo skozi filtrirni papir (modri trak). Prve mL filtrata zavržemo. Preostali bistri filtrat natočimo v cev polarimetra. Izmerimo kot zasuka. Posamezen vzorec medu analiziramo v dveh vzorednih določitvah.

Rezultati:

Za izračun uporabimo enačbo specifičnega kota zasuka, ki kvantitativno ovrednoti vsebnost sladkorjev v raztopini.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c} \quad \dots(8)$$

$[\alpha]_D^{20}$ specifični kot zasuka raztopine izražen v kotnih stopinjah (°) pri valovni dolžini 589,3 nm (natrijeva D-linija) in temperaturi 20 °C (°cm³/g dm)

α izmerjeni kot zasuka linearno polarizirane svetlobe v kotnih stopinjah (°)

l dolžina kivete izražena v dm

c koncentracija raztopine v g/100 mL

3.2.8 Merjenje barve medu z Minolta kromametrom

Princip:

Kromameter Minolta CR-200B v CIE $L^* a^* b^*$ sistemu se pogosto uporablja za merjenje barve živil. Barvo vzorca razdeli na tri parametre, L^* , a^* in b^* . Vrednost L^* določa svetlost vzorca: večja kot je vrednost, svetlejšje 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.

Aparatura in pribor:

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

Izvedba:

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

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

3.3.1 Osnovni statistični parametri

3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečna vrednost

Od srednjih vrednosti najpogosteje uporabljamo aritmetično sredino ali povprečje (Adamič, 1989).

Standardna oznaka za aritmetično sredino podatkov $x_1, x_2, \dots, x_n$ je $\bar{x}$. Aritmetična sredina leži med vrednostmi $x_1, x_2, \dots, x_n$. Vsaka posamezna vrednost x_i se od $\bar{x}$ odklanja navzgor ali

navzdol: odklon $x_i - \bar{x}$ je pozitiven ali negativen. Aritmetična sredina je postavljena tako, da je vsota odklonov enaka nič.

Izraz za aritmetično sredino je naslednji:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(9)$$

Aritmetično sredino izračunamo tako, da seštejemo vse vrednosti spremenljivke in vsoto delimo s številom podatkov (Košmelj, 2001).

3.3.1.2 Standardna deviacija ali standardni odmik (s)

Varianca je osnovna mera variacije, podobno kot je aritmetična sredina osnovna mera za srednjo vrednost. Varianca je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Za statistično analizo je zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, saj kvadrat merske enote spremenljivke pogosto nima pravega smisla. Zato se kot opisni parameter variacije bolj uporablja kvadratni koren variance, ki ga imenujemo tudi standardna deviacija ali standardni odmik (Adamič, 1989).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \dots(10)$$

3.3.1.3 Koeficient variabilnosti ali variacije (KV)

Pogosto želimo primerjati variiranje različnih spremenljivk, ki so med seboj v vsebinski zvezi. Primerjamo lahko relativno variiranje, ki ga podajamo z variacijskim koeficientom. Izračunamo ga tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino istega vzorca in to izrazimo kot odstotek po enačbi (Adamič, 1989).

$$KV(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \dots(11)$$

3.3.2 Analiza povezanosti dveh spremenljivk

Za statistično analizo povezanosti dveh spremenljivk (x in y) uporabljamo metodo regresije in korelacije. Vrednost ene spremenljivke si lahko sami izberemo - imenujemo jo neodvisna spremenljivka, druga spremenljivka pa je naključna in odvisna od prve, zato jo imenujemo odvisna spremenljivka. Takšen primer statistične analize povezanosti dveh spremenljivk imenujemo regresija. Korelacija pa je primer statistične analize povezanosti, kjer sta obe spremenljivki odvisni in naključni (Adamič, 1989).

Ločimo dve meri povezanosti:

- Pearsonov koeficient korelacije,
- Spearmanov koeficient korelacije (Košmelj, 2001).

3.3.2.1 Pearsonov koeficient korelacije (R)

Uporabljamo ga lahko le takrat, kadar sta spremenljivki približno normalno porazdeljeni. Koeficient korelacije je merilo za stopnjo povezanosti in pove samo, kako velika je korelacija, nikakor pa na pove, če je povezanost značilna ali ne.

Vrednosti koeficienta so lahko med -1 (maksimalno negativna korelacija) in +1 (maksimalno pozitivna korelacija) (Adamič, 1989).

Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk so podane v preglednici 5.

Preglednica 5. Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk (Seljak, 1996)

Koeficient korelacije (R)	Povezanost
od 0,00 do $\pm 0,20$	ni povezanosti
od 0,20 do $\pm 0,40$	šibka
od 0,40 do $\pm 0,70$	zmerna
> 0,70	močna

Izračunamo ga tako, da delimo kovarianco z zmnožkom standardnih deviacij za obe spremenljivki (x in y) (Adamič, 1989).

$$R = \frac{C_{xy}}{SD_x \cdot SD_y} \quad \dots(12)$$

Kovarianca je povprečen produkt odklonov dveh naključnih spremenljivk od njunih povprečij in predstavlja varianco podatkov zaradi korelacije. Izračunamo jo po enačbi

$$C_{xy} = \frac{\sum (X - \bar{X}) \cdot (Y - \bar{Y})}{n - 1} \quad \dots(13)$$

Značilnost korelacije ocenjujemo s t-testom pri 5 % stopnji tveganja. S t-testom preizkušamo ničelno domnevo, da med obema spremenljivkama ni povezanosti in da je koeficient korelacije enak nič (Adamič, 1989).

3.3.2.2 Koeficient determinacije (R^2)

Regresijski model je lahko boljši ali slabši. Eden izmed načinov s katerim lahko ovrednotimo kakovost regresijskega modela, je koeficient determinacije. Izraža odstotek variabilnosti odvisne številske spremenljivke (y), ki je pojasnjen z regresijskim modelom ene ali več neodvisnih številskih spremenljivk (x). Koeficient determinacije je kvadrat Pearsonovega koeficienta determinacije. Ko je koeficient determinacije večji od 0,5, je povezava med dvema spremenljivkama močna (Košmelj, 2001).

3.3.2.2.1 Levenov test homogenosti variance

S pomočjo tega testa ugotavljamo ali so variance v vseh obravnavanih statističnih vzorcih enake, torej če so vzorci homogeni. Prednost Levenovega testa je manjša občutljivost za morebitna odstopanja podatkov od normalne porazdelitve, zato je primeren tudi ko za obravnavano spremenljivko ne moremo privzeti normalne porazdelitve. Ničelna hipoteza

(H_0) Levenovega testa pravi, da med variancami vzorcev ni razlik, alternativna hipoteza (H) pa pravi, da je med vsaj enim parom variance statistično značilna razlika. Vrednost statistične značilnosti, ki je manjša od stopnje tveganja 0,05 vodi k sprejetju alternativne hipoteze (v tem primeru vzorci niso homogeni, ne moremo nadaljevati z analizo variance). Vrednost večja od 0,05 pa vodi k sprejetju ničelne hipoteze (potrdi se homogenost vzorcev in lahko nadaljujemo z ANOVO) (Košmelj in Kastelec, 2003).

3.3.2.2.2 Analiza variance (ANOVA)

Pri uporabi te analize domnevamo, da se variance statističnih vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Enakost varianc med vzorci imenujemo homogenost varianc in jo predhodno preverimo z Levenovim testom. Ničelna hipoteza (H_0) pri testu ANOVA pravi, da so povprečja po obravnavanjih enaka, alternativna pa, da obstaja vsaj en par, kjer povprečji po obravnavanjih nista enaki. Kadar je vrednost signifikance manjša od 0,05 sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam oz., da med statističnimi vzorci obstaja vsaj en par, ki ima različni povprečji. Sprejmemo alternativno in zavrnemo ničelno hipotezo. V tem primeru lahko statistično obravnavo nadgradimo z uporabo post-hoc testov, med katere spada Duncanov test (Adamič, 1989).

3.3.2.2.3 Duncanov test

Duncanov test je zaključni test, namenjen analizi vzorcev, za katere je znano, da so homogeni (Levenov test) in ne pripadajo isti populaciji (ANOVA) (Adamič, 1989).

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 42 vzorcev medu, ki smo jih pridobili neposredno od čebelarjev. Botanično poreklo posameznih vzorcev medu so določili čebelarji sami glede na lokacijo čebelnjaka in čas cvetenja medovitih rastlin. V laboratoriju smo naredili še senzorično analizo za potrditev deklarirane vrste medu in razvrstili vzorce glede na botanično poreklo v sedem kategorij.

Na vzorcih smo opravili naslednje fizikalno-kemijske analize: določanje antioksidativne učinkovitosti, vsebnosti skupnih fenolnih spojin, vode, pepela, prostih in skupnih kislin ter laktonov, ter merjenje električne prevodnosti, vrednosti pH, specifičnega kota zasuka in barve.

Duncanov test je bilo možno narediti za naslednje parametre: antioksidativno učinkovitost (po 120 minutah), vsebnost skupnih fenolnih spojin, vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov in specifični kot zasuka.

Levenov test homogenosti nam za naslednje parametre: antioksidativno učinkovitost (po 15 minutah), električno prevodnost, vsebnost pepela, vrednost pH ter za parametre barve L^* , a^* in b^* podaja vrednosti signifikance manjše od meje tveganja, zato nadaljnja statistična obdelava rezultatov ni bila možna.

4.1 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

Antioksidativno učinkovitost vzorcev medu smo določili z metodo DPPH. Rezultate smo izrazili kot delež inhibicije (%). Merili smo spremembo absorbance radikala DPPH^{*} po 15 in 120 minutah.

V preglednici 6 je prikazana antioksidativna učinkovitost (%) po 15 minutah. V povprečju je antioksidativna učinkovitost naraščala v naslednjem vrstnem redu: akacijev (5,4 %) < lipov (8,8 %) < kostanjev (11,5 %) < hojev (17,0 %) < cvetlični (18,3) < smrekov (26,2 %) < gozdni med (26,5 %).

Preglednica 6. Antioksidativna učinkovitost (%) po 15 minutah za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s	KV (%)
akacijev	6	5,4	3,2	7,3	1,5	28
lipov	6	8,8	5,1	15,0	3,8	44
kostanjev	6	11,5	8,0	14,6	2,6	23
hojev	6	17,0	11,8	23,7	4,8	28
smrekov	6	26,2	18,3	30,9	4,2	16
cvetlični	6	18,3	16,0	23,3	2,7	15
gozdni	6	26,5	17,0	34,0	6,4	24

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odmik, KV - koeficient variabilnosti

Iz preglednice 7 je razvidno, da je bila po 120 minutah največja povprečna antioksidativna učinkovitost, izražena kot delež inhibicije, določena v vzorcih gozdnega medu (62,4 %). Sledita smrekov in cvetlični med (46,3 % oz. 43,4 %). Najmanjšo povprečno antioksidativno učinkovitost smo določili v vzorcih akacijevga medu (7,5 %).

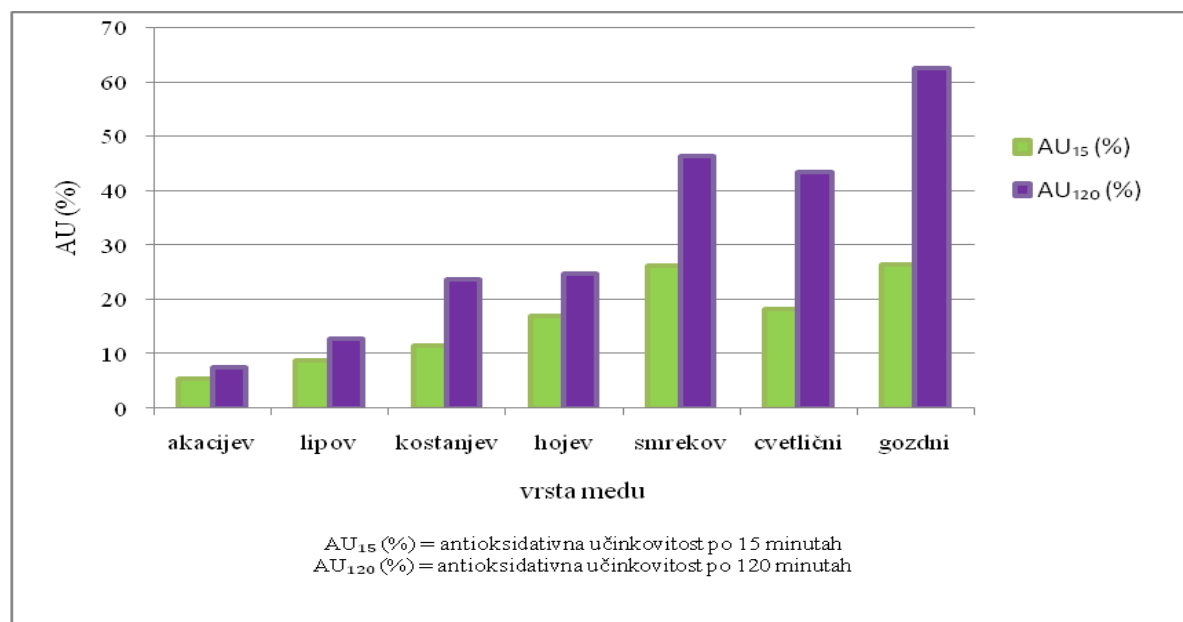
Preglednica 7. Antioksidativna učinkovitost (%) po 120 minutah za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s	KV (%)
akacijev	6	7,5 ^a	5,2	11,6	2,3	31
lipov	6	12,8 ^{a,b}	6,8	23,2	6,6	52
kostanjev	6	23,6 ^b	13,3	36,7	8,1	34
hojev	6	24,8 ^b	16,9	34,9	7,4	30
smrekov	6	46,3 ^c	27,3	66,9	13,3	29
cvetlični	6	43,4 ^c	30,6	66,1	13,7	32
gozdni	6	62,4 ^d	35,8	76,5	14,9	24

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odmik, KV - koeficient variabilnosti

S statistično analizo (Duncanovim testom) smo ugotovili, da se akacijev, kostanjev, smrekov in gozdni med statistično značilno razlikujejo med seboj v antioksidativni učinkovitosti. Kostanjev in hojev med se statistično značilno ne razlikujeta, prav tako se ne razlikujeta med seboj smrekov in cvetlični med. Gozdni med se statistično značilno razlikuje od vseh ostalih vrst medu.

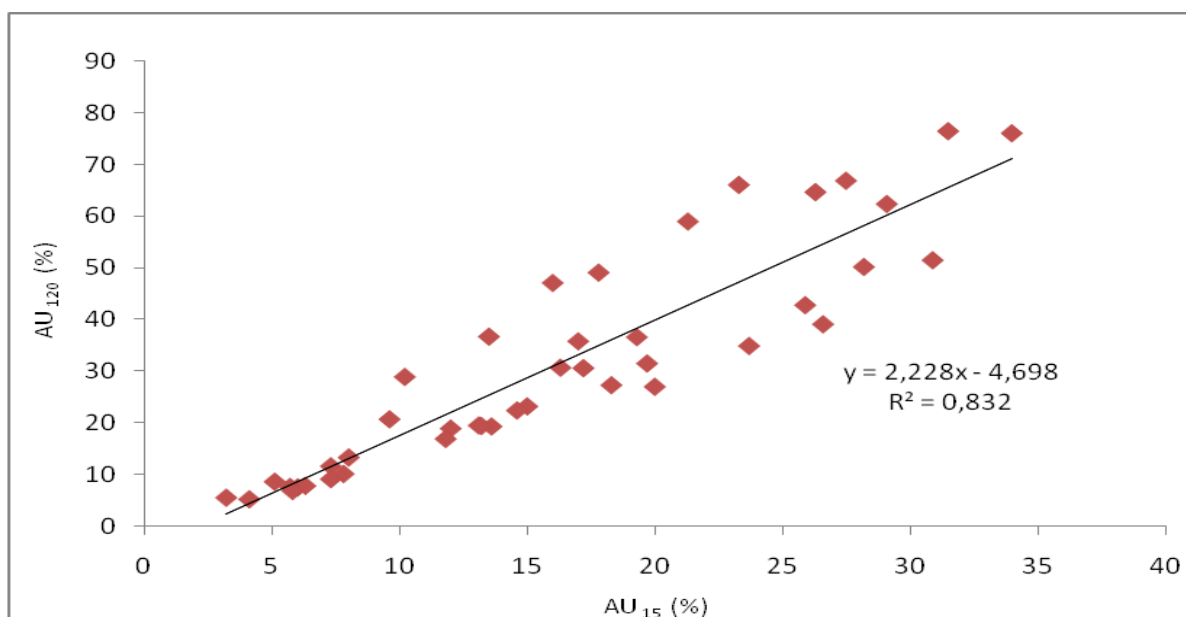
Koeficient variabilnosti je bil največji v lipovem medu, najmanjši pa v vzorcih gozdnega medu.



Slika 4. Antioksidativna učinkovitost (%) v posameznih vrstah slovenskega medu

Na sliki 4 je prikazana primerjava med AU, določeno po 15 oz. 120 minutah. Po 15 minutah smo največjo antioksidativno učinkovitost, izraženo kot delež inhibicije, določili v gozdnem (26,5 %) in smrekovem medu (26,2 %). Po 120 minutah je imel največjo AU gozdni med

(62,4 %). Najmanjša antioksidativna učinkovitost je bila po 15 in 120 minutah v akacijevem medu (5,4 % oz. 7,5 %).



Slika 5. Zveza med antioksidativno učinkovitostjo po 120 minutah in antioksidativno učinkovitostjo po 15 minutah v analiziranih vzorcih medu

Na sliki 5 je podana zveza med antioksidativno učinkovitostjo, določeno po 120 minutah in antioksidativno učinkovitostjo, določeno po 15 minutah. Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 2,228x - 4,698$. Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,832, koeficient korelacije (R) pa 0,912. Spremenljivki sta močno povezani.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določali s Folin-Ciocalteuovo metodo. Iz preglednice 8 je razvidno, da je bila največja povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin v gozdnem medu in sicer 79,5 mg galne kisline na kg medu. Sledijo smrekov (60,4 mg_{GA}/kg), kostanjev (58,7 mg_{GA}/kg), hojev (49,0), cvetlični (38,1 mg_{GA}/kg) in lipov med z 22,2 mg_{GA}/kg medu. Najmanj skupnih fenolnih spojin je vseboval akacijev med (17,1 mg_{GA}/kg).

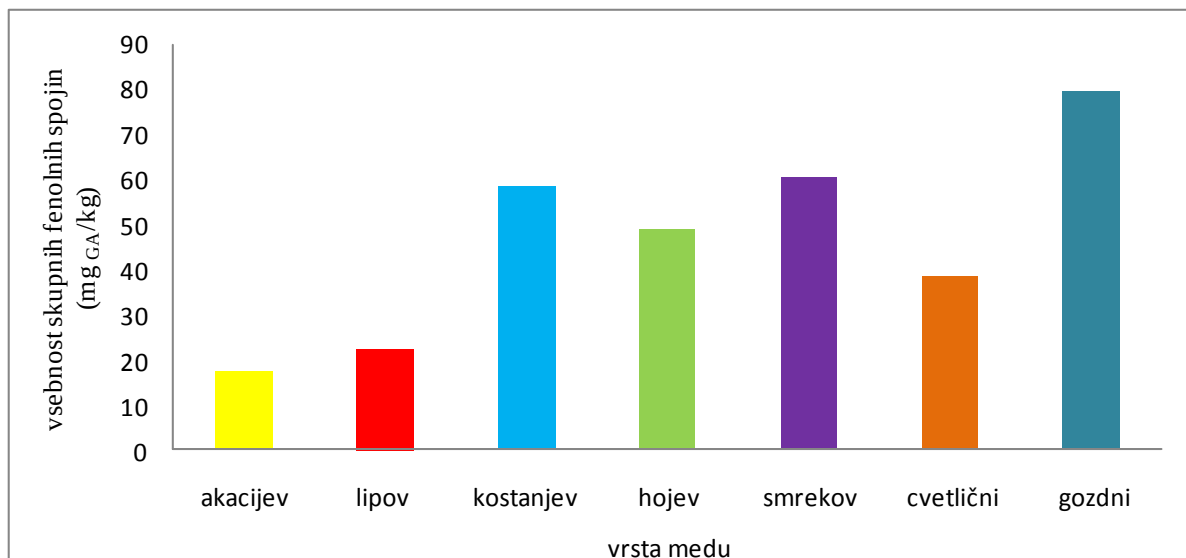
Preglednica 8. Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg_{GA}/kg) za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s	KV (%)
akacijev	6	17,1 ^a	5,1	36,0	11,2	66
lipov	6	22,2 ^a	12,4	46,9	13,1	59
kostanjev	6	58,7 ^{b,c}	25,8	80,2	19,0	32
hojev	6	49,0 ^{a,b,c}	21,3	130,0	41,9	86
smrekov	6	60,4 ^{b,c}	14,6	123,6	36,7	61
cvetlični	6	38,1 ^{a,b}	30,2	65,8	13,8	36
gozdni	6	79,5 ^c	48,0	128,0	29,1	37

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odklik, KV - koeficient variabilnosti

Rezultati Duncanovega testa so pokazali, da se akacijev in lipov med statistično značilno razlikujeta od kostanjevega, smrekovega in gozdnega medu glede vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

Kostanjev, hojev, smrekov in gozdni med se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, kot tudi ne akacijev, lipov, hojev in cvetlični med.



Slika 6. Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin v posameznih vrstah slovenskega medu

S slike 6 je razvidno, da je bila najmanjša povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin določena v akacijevem medu, največja pa v gozdnem medu.

4.3 REZULTATI DOLOČANJA NEKATERIH OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV

Rezultati določanja nekaterih osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov (vsebnost vode, električna prevodnost, vsebnost pepela in vrednost pH) so podani v preglednici 9.

Preglednica 9. Vsebnost vode, električna prevodnost, vsebnost pepela in vrednost pH v različnih vrstah medu

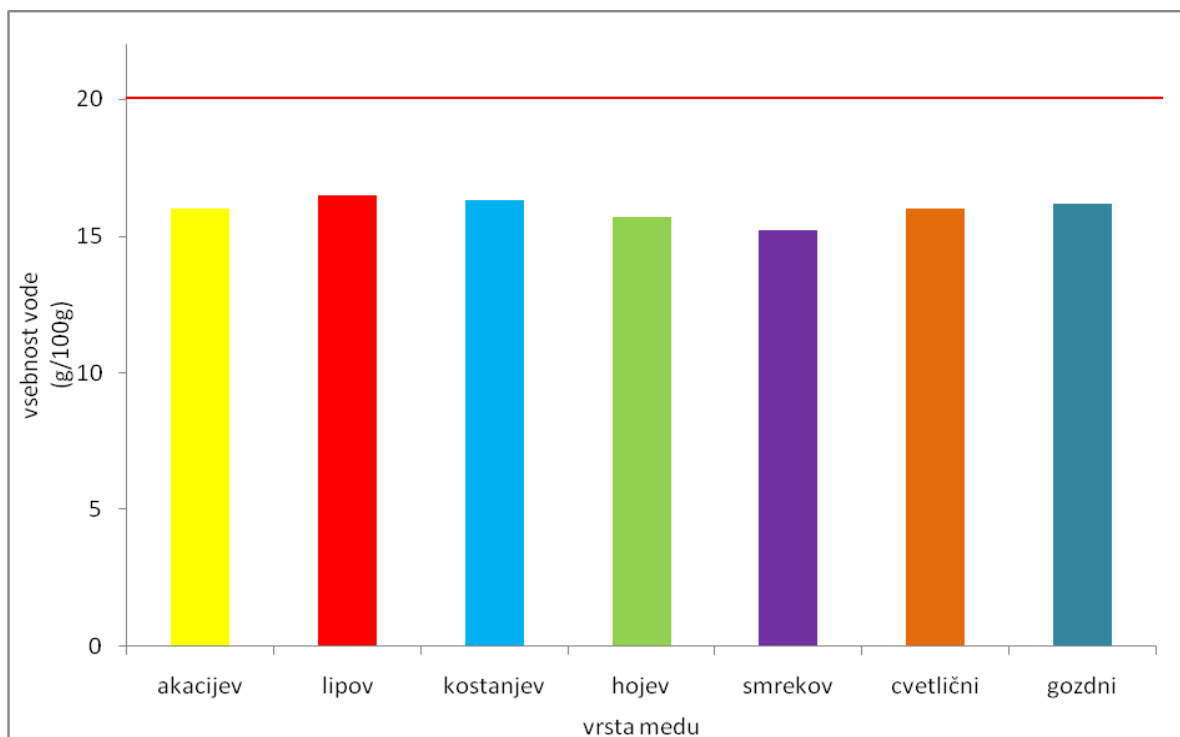
Vrsta medu	n	Statistični parameter	Vsebnost vode (g/100 g)	Električna prevodnost (mS/cm)	Vsebnost pepela (g/100 g)	Vrednost pH
akacijev	6	$\bar{X} \pm s$	$16,0 \pm 0,80$	$0,20 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,02$	$4,04 \pm 0,17$
		$x_{\min} - x_{\max}$	15,3 – 17,5	0,16 – 0,24	0,04 – 0,08	3,86 – 4,34
lipov	6	$\bar{X} \pm s$	$16,5 \pm 1,02$	$0,76 \pm 0,11$	$0,27 \pm 0,06$	$4,67 \pm 0,31$
		$x_{\min} - x_{\max}$	15,3 – 17,5	0,64 – 0,95	0,19 – 0,37	4,14 – 4,98
kostanjev	6	$\bar{X} \pm s$	$16,3 \pm 0,73$	$1,69 \pm 0,34$	$0,75 \pm 0,18$	$5,50 \pm 0,52$
		$x_{\min} - x_{\max}$	15,7 – 17,7	1,28 – 2,25	0,55 – 1,05	4,65 – 5,99
hojev	6	$\bar{X} \pm s$	$15,7 \pm 1,40$	$1,18 \pm 0,13$	$0,48 \pm 0,06$	$4,82 \pm 0,25$
		$x_{\min} - x_{\max}$	14,4 – 18,2	0,96 – 1,29	0,38 – 0,54	4,41 – 5,13
smrekov	6	$\bar{X} \pm s$	$15,2 \pm 0,85$	$1,31 \pm 0,21$	$0,54 \pm 0,10$	$4,66 \pm 0,06$
		$x_{\min} - x_{\max}$	14,4 – 16,5	0,92 – 1,57	0,33 – 0,61	4,59 – 4,75
cvetlični	6	$\bar{X} \pm s$	$16,0 \pm 0,76$	$0,63 \pm 0,11$	$0,22 \pm 0,05$	$4,54 \pm 0,22$
		$x_{\min} - x_{\max}$	15,5 – 17,5	0,50 – 0,78	0,16 – 0,29	4,26 – 4,84
gozdni	6	$\bar{X} \pm s$	$16,2 \pm 1,06$	$1,10 \pm 0,15$	$0,43 \pm 0,08$	$4,55 \pm 0,13$
		$x_{\min} - x_{\max}$	14,9 – 17,60	0,91 – 1,34	0,33 – 0,57	4,43 – 4,80

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odmik

Vsebnost vode se je v analiziranih vzorcih medu gibala od 14,4 g/100 g (vzorca hojevega in smrekovega medu) do 18,2 g/100 g (vzorec hojevega medu).

Vsebnost vode v medu je odvisna od klimatskih pogojev, stopnje zrelosti medu v panju, pogojev pridobivanja in načina shranjevanja medu. Vsebnost vode v medu ni odvisna od botaničnega porekla, zato rezultati vsebnosti vode niso primerni za primerjavo različnih vrst medu med sabo (Bertoncelj in sod., 2011).

Iz preglednice 9 in slike 7 lahko razberemo, da je imel najmanjšo povprečno vsebnost vode smrekov med (15,2 g/100 g), sledili so hojev, akacijev, cvetlični, gozdni, kostanjev in lipov med, ki je imel največjo povprečno vsebnost vode (16,5 g/100 g).



Slika 7. Povprečna vsebnost vode v analiziranih vzorcih medu

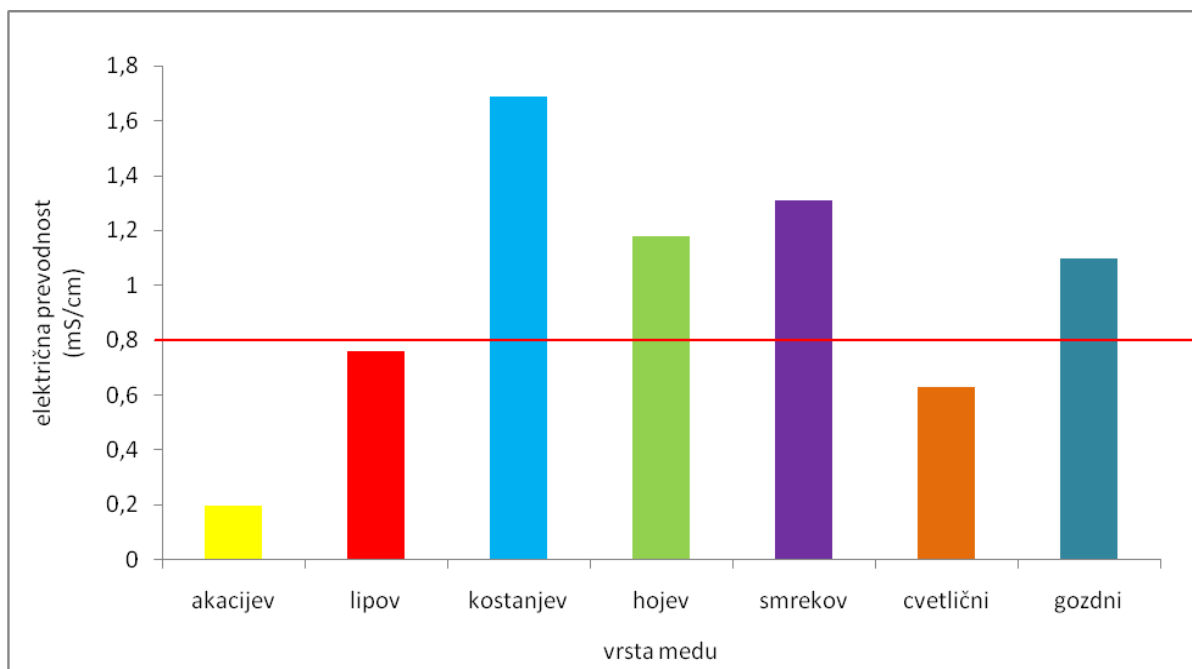
Pravilnik o medu (2011) določa, da lahko med vsebuje do 20 g/100 g vode. Vsi analizirani vzorci ustrezajo pravilniku glede vsebnosti vode.

Električna prevodnost je v povezavi z vsebnostjo mineralov, organskih kislin in beljakovin ter variira glede na botanično poreklo medu (Bertoncelj in sod., 2011).

Najvišjo povprečno električno prevodnost je imel kostanjev med (1,69 mS/cm), sledijo smrekov (1,31 mS/cm), hojev (1,18 mS/cm), gozdni (1,10 mS/cm), lipov (0,76 mS/cm) in cvetlični med (0,63 mS/cm). Najnižja povprečna električna prevodnost je bila določena v akacijevem medu, 0,20 mS/cm.

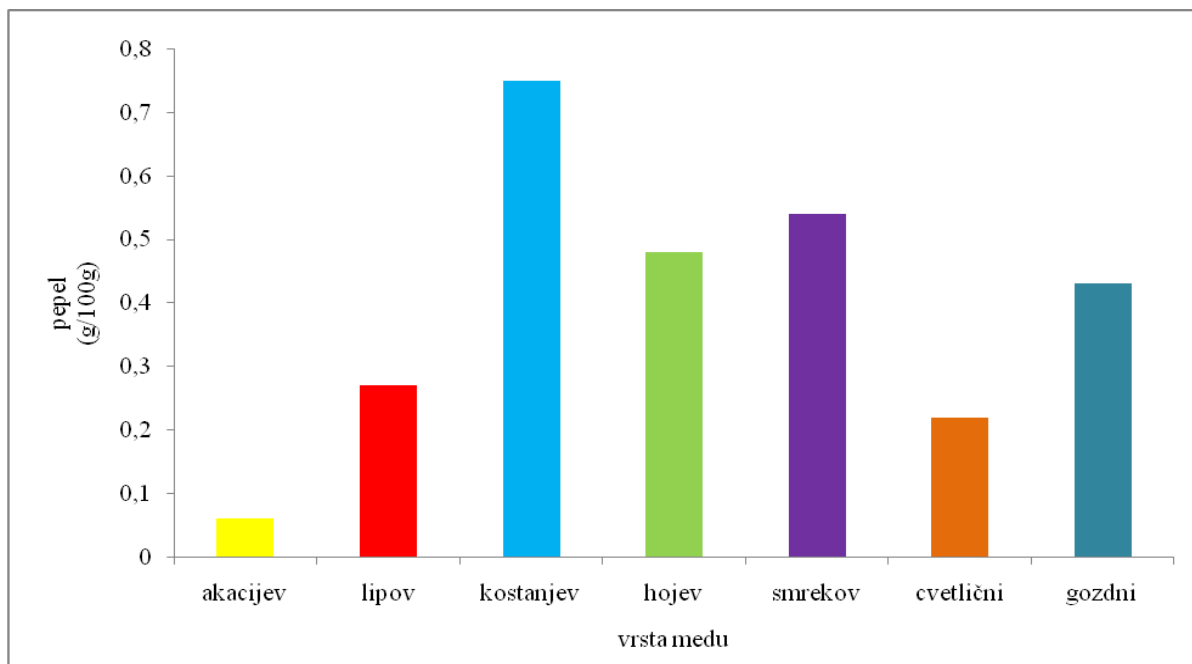
Pravilnik o medu (2011) določa, da morajo imeti gozdni med, kostanjev med in mešanica obeh vrst medu električno prevodnost najmanj 0,8 mS/cm. Električna prevodnost smrekovega in hojevega medu, ki spadata med manine medove, mora biti prav tako višja od

0,8 mS/cm. Za lipov med električna prevodnost ni predpisana. Ostali medovi imajo lahko vrednost električne prevodnosti največ 0,8 mS/cm.



Slika 8. Povprečna vrednost električne prevodnosti v analiziranih vzorcih medu

S slike 8 je razvidno, da vsi analizirani vzorci ustrezajo pravilniku. Akacijev in cvetlični med imata električno prevodnost pod 0,8 mS/cm. Kostanjev, hojev, smrekov in gozdni med pa imajo električno prevodnost nad 0,8 mS/cm.

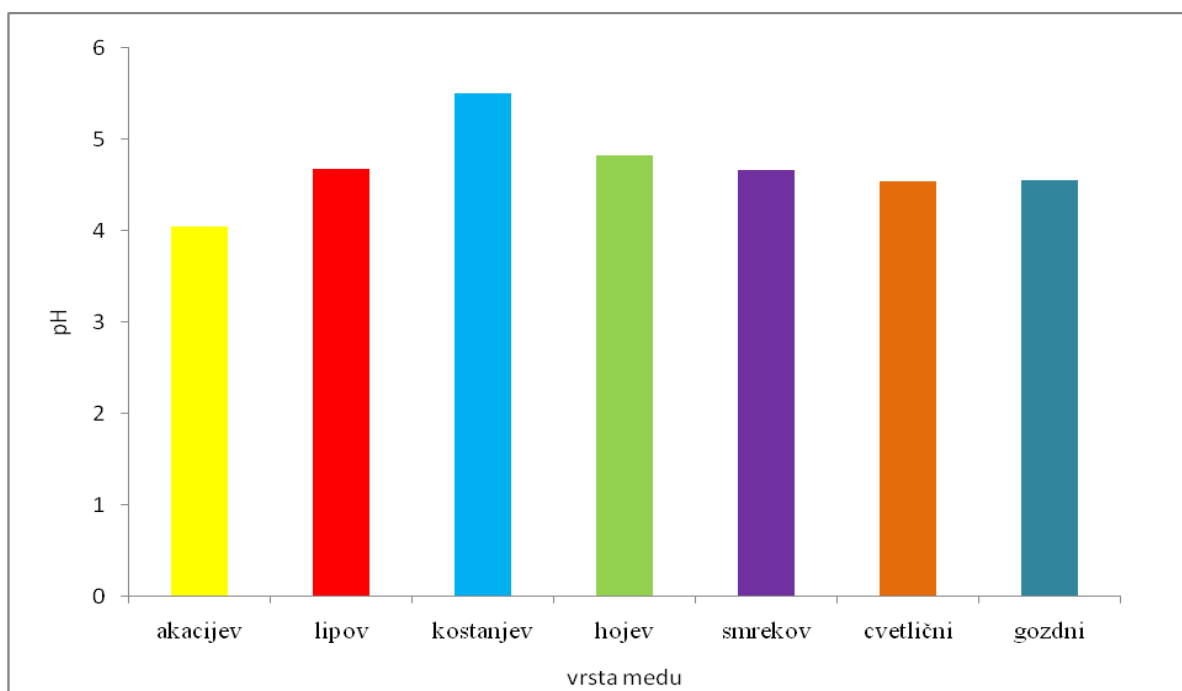


Slika 9. Povprečna vsebnost pepela v analiziranih vzorcih medu

Največjo povprečno vsebnost pepela smo določili v vzorcih kostanjevega medu (0,75 g/100 g), sledili so smrekov (0,54 g/100 g), hojev (0,48 g/100 g), gozdni (0,43 g/100 g), lipov (0,27 g/100 g) in cvetlični med (0,22 g/100 g). Najmanjšo povprečno vsebnost pepela je imel akacijev med, ki je vseboval 0,06 g pepela/100 g.

Manjša je vsebnost pepela v medu, nižja je vrednost električne prevodnosti. Koeficient korelacije za zvezo med električno prevodnostjo in vsebnostjo pepela v medu je znašal 0,991 (priloga A3).

S slike 10 je razvidno, da je imel najnižjo povprečno vrednost pH akacijev med, sledijo cvetlični, gozdni, smrekov, lipov, hojev in kostanjev med, ki je imel najvišjo povprečno vrednost pH.



Slika 10. Povprečne vrednosti pH v analiziranih vzorcih medu

Nizka vrednost pH zmanjša prisotnost in rast mikroorganizmov v medu. Na kislost medu vplivajo organske kisline, posebej še glukonska kislina, estri, anorganski ioni, kot sta fosfat in sulfat (Bertoncelj in sod., 2011).

4.4 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI PROSTIH IN SKUPNIH KISLIN TER LAKTONOV

Vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov smo določili z metodo AOAC 962.19.

Iz preglednice 10 lahko razberemo vsebnost prostih kislin v različnih vrstah medu. Smrekov med je imel v povprečju največjo vsebnost prostih kislin, in sicer 30,6 meq/kg, najmanjšo povprečno vsebnost prostih kislin smo določili v vzorcih kostanjevega in akacijevega medu, 13,6 oz. 13,7 meq/kg.

Preglednica 10. Vsebnost prostih kislin (meq/kg) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s	KV (%)
akacijev	6	13,7 ^a	9,5	17,8	2,9	21
lipov	6	17,9 ^{a,b}	8,9	40,6	11,8	66
kostanjev	6	13,6 ^a	8,3	26,6	6,9	51
hojev	6	24,5 ^{b,c}	19,5	34,1	5,4	22
smrekov	6	30,6 ^c	18,2	35,5	6,2	20
cvetlični	6	17,4 ^{a,b}	12,3	25,0	4,7	27
gozdni	6	28,2 ^c	24,0	33,1	3,2	11

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odmik, KV - koeficient variabilnosti

S statistično analizo (Duncanov test) smo ugotovili, da se akacijev in kostanjev med statistično značilno razlikujeta od hojevega, smrekovega in gozdnega medu glede vsebnosti prostih kislin. Akacijev, lipov, kostanjev in cvetlični med se statistično značilno ne razlikujejo med seboj, prav tako ni razlik med hojevim, smrekovim in gozdnim medom. Pravilnik o medu (2011) določa, da je lahko v kg medu največ 50 meq prostih kislin. Iz preglednice 10 je razvidno, da vsi vzorci ustrezajo pravilniku.

V preglednici 11 so predstavljeni statistični parametri za posamezne vrste medu glede vsebnosti skupnih kislin. Povprečne vsebnosti skupnih kislin za posamezne vrste medu so bile naslednje: 32,4 meq/kg v smrekovem medu, 32,2 meq/kg v gozdnem, 27,2 meq/kg v hojevem, 20,0 meq/kg v cvetličnem, 18,9 meq/kg v lipovem in 16,7 meq/kg v akacijevem medu. Najmanjša povprečna vsebnost skupnih kislin je bila izmerjena v kostanjevem medu (14,9 meq/kg).

Preglednica 11. Vsebnost skupnih kislin (meq/kg) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s	KV (%)
akacijev	6	16,7 ^a	13,9	21,1	3,1	19
lipov	6	18,9 ^{a,b}	9,2	41,8	12,1	64
kostanjev	6	14,9 ^a	8,9	28,5	7,2	48
hojev	6	27,2 ^{b,c}	21,1	41,7	7,8	29
smrekov	6	32,4 ^c	21,6	38,5	5,8	18
cvetlični	6	20,0 ^{a,b}	12,4	29,8	6,4	32
gozdni	6	32,2 ^c	27,6	38,5	4,4	14

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odmik, KV - koeficient variabilnosti

Rezultati Duncanovega testa so pokazali, da se akacijev in kostanjev med statistično značilno razlikujeta od hojevega, smrekovega in gozdnega medu glede vsebnosti skupnih kislin. Akacijev in kostanjev med se statistično značilno nista razlikovala od lipovega in cvetličnega medu. Prav tako se smrekov in gozdni med nista razlikovala od hojevega medu.

V preglednici 12 so predstavljeni rezultati vsebnosti laktonov v medu. Gozdni med je v povprečju vseboval največ laktonov (4,0 meq/kg). Sledijo akacijev, hojev, cvetlični,

smrekov in kostanjev med s povprečno vsebnostjo laktonov od 3,0 do 1,4 meq/kg. Lipov med je vseboval v povprečju najmanj laktonov, 0,9 meq/kg.

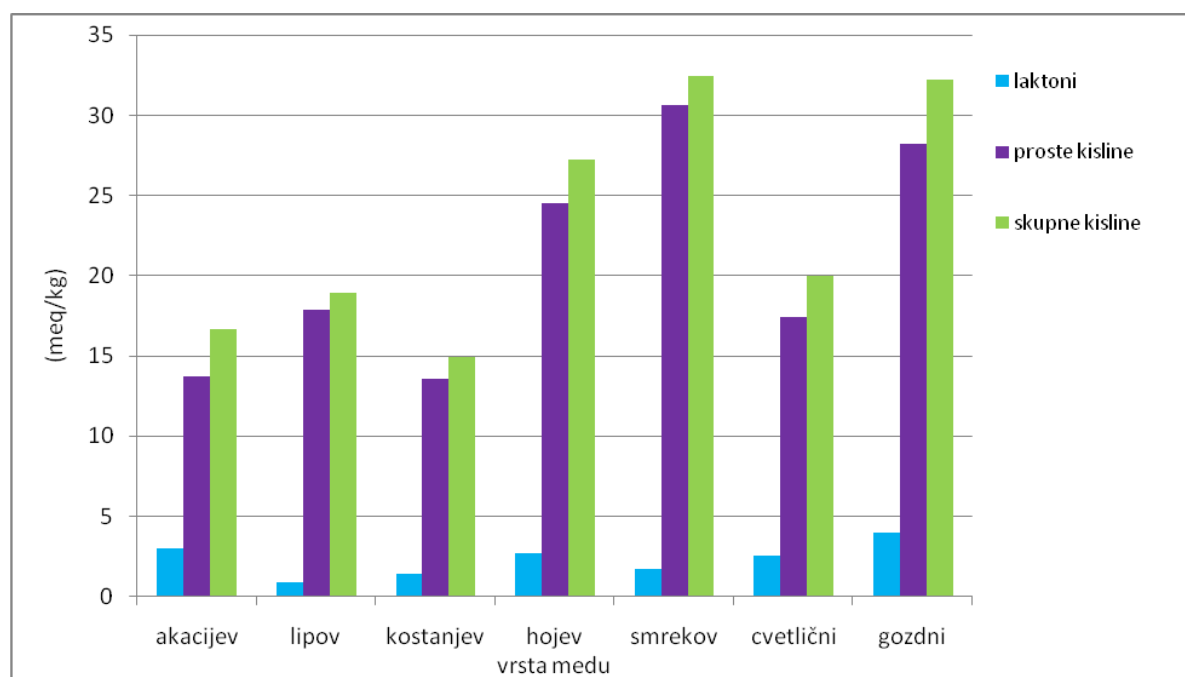
Preglednica 12. Vsebnost laktonov (meq/kg) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s
akacijev	6	3,0 ^{a,b}	1,1	5,2	1,7
lipov	6	0,9 ^a	0,1	2,3	0,8
kostanjev	6	1,4 ^a	0,0	2,9	1,0
hojev	6	2,7 ^{a,b}	0,0	7,6	2,7
smrekov	6	1,7 ^a	0,0	3,9	1,8
cvetlični	6	2,6 ^{a,b}	0,1	4,8	1,9
gozdni	6	4,0 ^b	2,3	5,7	1,4

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odklik

S statistično analizo smo ugotovili, da se lipov, kostanjev in smrekov med statistično značilno ne razlikujejo med seboj glede vsebnosti laktonov, razlikujejo pa se od gozdnega medu. Akacijev, hojev in cvetlični med se med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Gozdni med se statistično značilno ne razlikuje od akacijevega, hojevega in cvetličnega medu.

Na sliki 11 je vsebnost prostih in skupnih kislin ter laktonov še grafično prikazana.



Slika 11. Vsebnost laktonov, prostih in skupnih kislin (meq/kg) v posameznih vrstah slovenskega medu

4.5 REZULTATI MERJENJA SPECIFIČNEGA KOTA ZASUKA

Iz preglednice 13 je razvidno, da smo najnižjo povprečno vrednost specifičnega kota zasuka ($[\alpha]_D^{20}$) določili v akacijevem medu ($-20,3^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$).

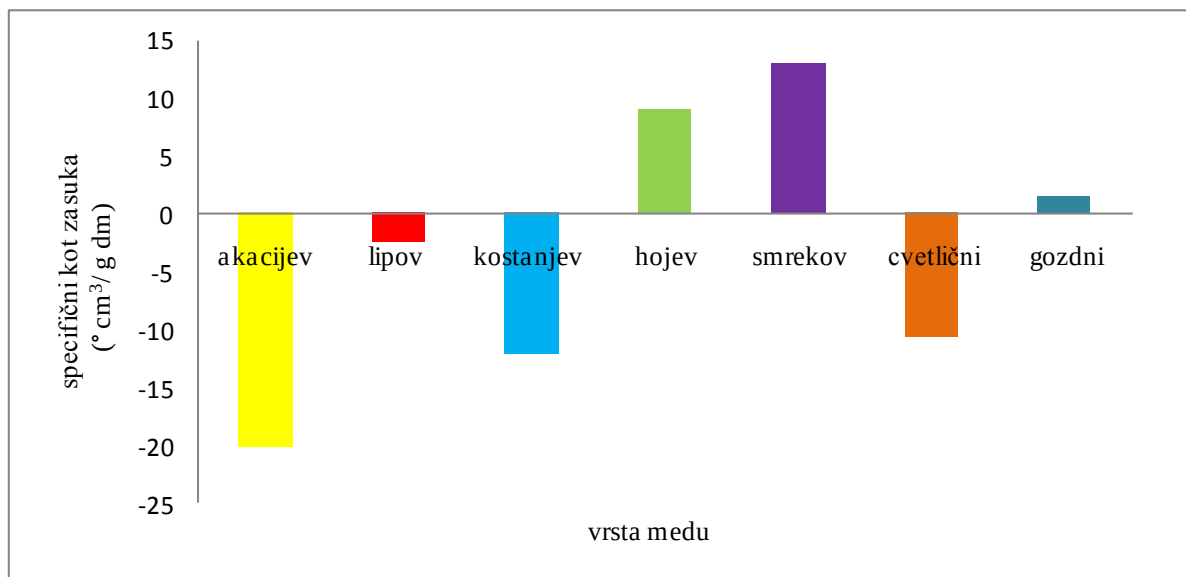
Preglednica 13. Specifični kot zasuka ($^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$) v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	$\bar{X}$	$x_{\min}$	$x_{\max}$	s
akacijev	4	$-20,3^a$	$-28,1$	$-13,6$	7,2
lipov	6	$-2,3^{b,c,d}$	$-22,3$	14,6	14,3
kostanjev	3	$-12,2^{a,b}$	$-19,4$	$-7,5$	6,3
hojev	6	$8,9^{d,e}$	$-5,4$	19,0	8,9
smrekov	6	$13,1^e$	0,5	26,3	8,7
cvetlični	6	$-10,8^{a,b,c}$	$-21,5$	$-1,5$	8,1
gozdni	6	$1,5^{c,d,e}$	$-4,6$	7,7	5,1

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odklik

Sledili so: kostanjev med s povprečno vrednostjo $-12,2^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$, cvetlični z $-10,8^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$, lipov med z $-2,3^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$, gozdni z $1,5^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$ in hojev med z $8,9^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$. Najvišjo povprečno vrednost $[\alpha]_D^{20}$ smo izmerili pri smrekovem medu, $13,1^\circ\text{cm}^3/\text{g dm}$.

S statistično analizo (Duncanov test) smo ugotovili, da se akacijev, kostanjev in cvetlični med statistično značilno ne razlikujejo med seboj, razlikujejo pa se od hojevega in smrekovega medu. Lipov, hojev in gozdni med se med seboj statistično značilno ne razlikujejo v specifičnem kotu zasuka, razlikujejo pa se od akacijevga medu.



Slika 12. Povprečne vrednosti specifičnega kota zasuka v analiziranih vrstah slovenskega medu

Povprečne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$ za posamezne vrste medu prikazuje stolpni diagram na sliki 12. Povprečne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$ medov nektarnega izvora (akacijev in cvetlični med) so v skladu s pričakovanji, saj imajo vsi vzorci negativne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. Manini medovi (hojev, smrekov in gozdni med) imajo po pričakovanjih pozitivne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. Medovi mešanega izvora (lipov in kostanjev med) imajo negativne povprečne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. Vzrok je verjetno večji delež izvora medu iz nektarja kot iz mane.

Iz priloge A2 je razvidno, da so imeli pri analizi lipovega medu štirje vzorci negativne vrednosti, dva vzorca lipovega medu pa sta imela pozitivne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. Vzrok je verjetno ta, da je v dveh vzorcih s pozitivnimi vrednostmi prevladovala mana nad nektarjem.

4.6 REZULTATI MERJENJA BARVE MEDU

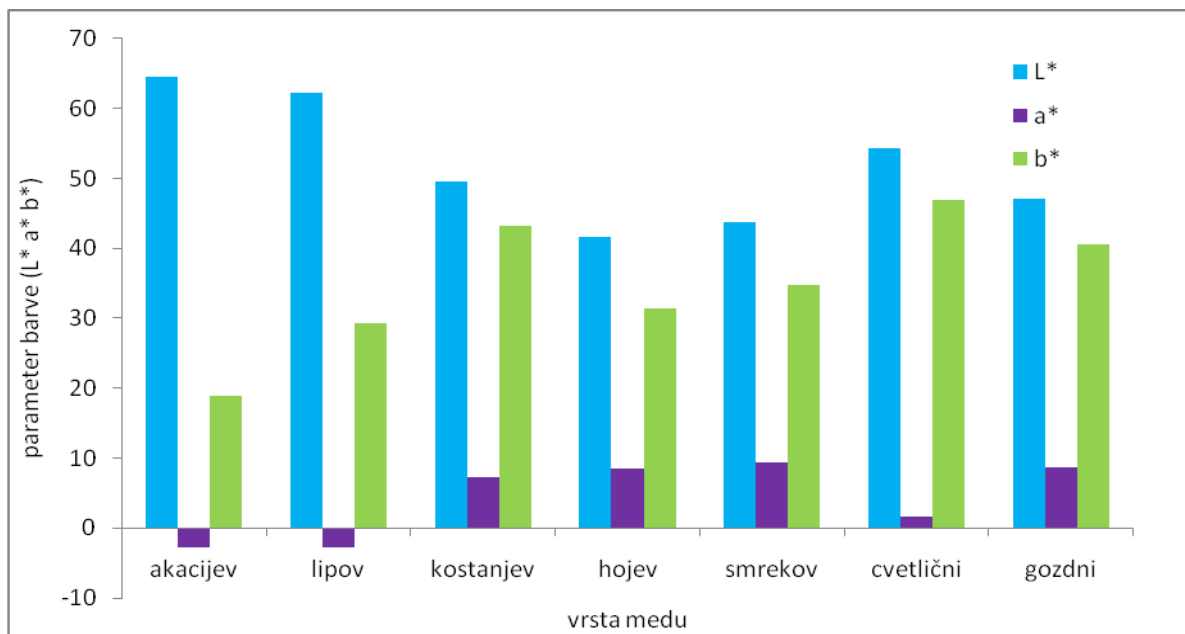
Barvo medu smo določali s pomočjo kromametra Minolta CR-200B, ki barvo vzorca razdeli na tri komponente (L^* , a^* in b^*) in jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu. Vrednost L^* določa svetlost medu: višja kot je vrednost, svetlejši je med. Vrednosti a^* in b^* pa določata odtenek barve. Parameter 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 območju. Vrednosti parametrov barve za analizirane vzorce medu z izračunanimi statističnimi parametri so podane v preglednici 14.

Preglednica 14. Vrednosti parametrov L^* , a^* in b^* v analiziranih vrstah medu z izračunanimi statističnimi parametri

Vrsta medu	n	Statistični parameter	Vrednost L^*	Vrednost a^*	Vrednost b^*
akacijev	6	$\bar{X} \pm s$	$64,55 \pm 0,57$	$-2,83 \pm 0,19$	$18,83 \pm 3,23$
		$x_{\min} - x_{\max}$	63,82 – 65,25	-3,15 do -2,60	14,78 – 23,37
lipov	6	$\bar{X} \pm s$	$62,27 \pm 2,34$	$-2,84 \pm 0,76$	$29,35 \pm 7,88$
		$x_{\min} - x_{\max}$	58,89 – 65,57	-3,53 do -1,50	21,28 – 38,23
kostanjev	6	$\bar{X} \pm s$	$49,52 \pm 4,11$	$7,23 \pm 2,40$	$43,21 \pm 5,49$
		$x_{\min} - x_{\max}$	42,44 – 53,35	3,79 – 10,09	33,32 – 49,36
hojev	6	$\bar{X} \pm s$	$41,71 \pm 6,49$	$8,52 \pm 2,50$	$31,48 \pm 9,38$
		$x_{\min} - x_{\max}$	29,80 – 46,58	5,98 – 12,99	13,67 – 38,39
smrekov	6	$\bar{X} \pm s$	$43,72 \pm 2,19$	$9,39 \pm 2,62$	$34,79 \pm 3,33$
		$x_{\min} - x_{\max}$	39,87 – 45,88	6,37 – 13,61	29,37 – 39,11
cvetlični	6	$\bar{X} \pm s$	$54,31 \pm 1,77$	$1,60 \pm 1,23$	$46,83 \pm 2,51$
		$x_{\min} - x_{\max}$	51,72 – 55,83	0,10 – 3,74	43,37 – 49,22
gozdni	6	$\bar{X} \pm s$	$47,11 \pm 2,81$	$8,63 \pm 1,77$	$40,56 \pm 4,37$
		$x_{\min} - x_{\max}$	44,42 – 50,56	6,59 – 10,77	35,89 – 46,60

n - število vzorcev, $\bar{X}$ - povprečna vrednost, $x_{\min}$ - minimalna vrednost, $x_{\max}$ - maksimalna vrednost, s - standardni odklik

S slike 13 je razvidno, da je imel najvišjo povprečno vrednost parametra L^* akacijev med, in sicer 64,55. Sledijo lipov, cvetlični, kostanjev, gozdni, smrekov in hojev med, ki je imel najnižjo povprečno vrednost parametra L^* , in sicer 41,71. Med obravnavanimi vrstami medu je akacijev med najsvetlejši, hojev med pa najtemnejši.



Slika 13. Povprečne vrednosti parametrov L^* , a^* in b^* v analiziranih vrstah slovenskega medu

Najvišjo povprečno vrednost parametra a^* smo določili v vzorcih smrekovega medu (9,39), ki je tudi na videz nabolj rdeče barve. Najnižjo povprečno vrednost a^* imata lipov in akacijev med, -2,83 oz. -2,84, kar pomeni da so v teh dveh vrstah medu prisotne tudi zelene komponente.

Parameter b^* v pozitivnem območju predstavlja intenziteto rumene barve. Vsi analizirani vzorci medu so imeli pozitivne b^* vrednosti. Povprečne vrednosti so se gibale od 18,83 za akacijev med do 46,83 za vzorce cvetličnega medu.

4.7 KORELACIJE (ZVEZE) MED ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO IN OSTALIMI PARAMETRI

Pri iskanju statistično značilnih in močnih povezav smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije (R). Preglednica s korelacijskimi koeficienti za vse zveze med analiziranimi parametri medu je podana v prilogi A3.

V preglednici 15 so podane zmerne (R v območju od 0,4 do 0,7) in močne ($R > 0,7$) ter statistično značilne ($p < 0,01$) zveze med antioksidativno učinkovitostjo in nekaterimi ostalimi analiziranimi parametri.

Preglednica 15. Korelacije med antioksidativno učinkovitostjo medu in ostalimi parametri

Zveza	Pearsonov koeficient korelacije (R)
AU ₁₅ - FC	0,619
AU ₁₂₀ - FC	0,553
AU ₁₅ - SK	0,670
AU ₁₅ - PK	0,660
AU ₁₅ - L*	-0,711
AU ₁₅ - a*	0,729
AU ₁₅ - [α] _D ²⁰	0,439
AU ₁₂₀ - SK	0,465
AU ₁₂₀ - PK	0,450
AU ₁₂₀ - L*	-0,527
AU ₁₂₀ - a*	0,531
AU ₁₂₀ - b*	0,475

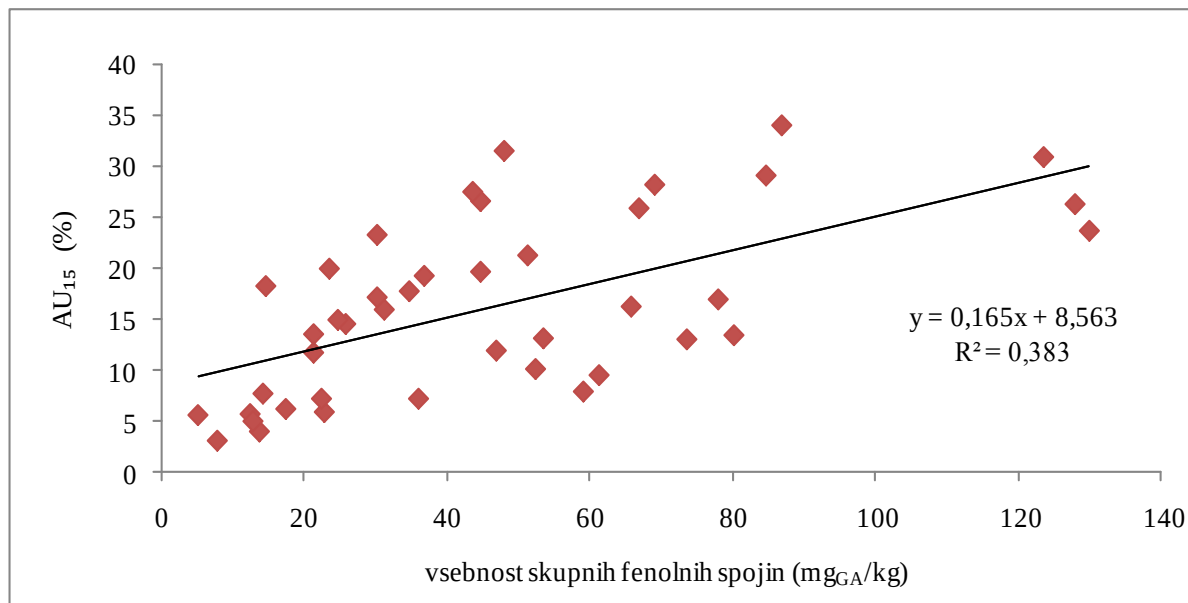
AU₁₅ - antioksidativna učinkovitost (15 minut), AU₁₂₀ - antioksidativna učinkovitost (120 minut), FC - vsebnost skupnih fenolnih spojin, SK- skupne kisline, PK – proste kisline, L* - parameter barve L*, a* - parameter barve a*, b* - parameter barve b*, [α]_D²⁰ - specifični kot zasuka

4.7.1 Korelacije med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin

Za določitev zveze med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin smo uporabili korelacijsko analizo. Korelacija je metoda za statistično analizo dveh neodvisnih spremenljivk.

Za prvo spremenljivko smo izbrali vsebnost skupnih fenolnih spojin (FC) na osi x, za drugo spremenljivko pa antioksidativno učinkovitost (AU) na osi y.

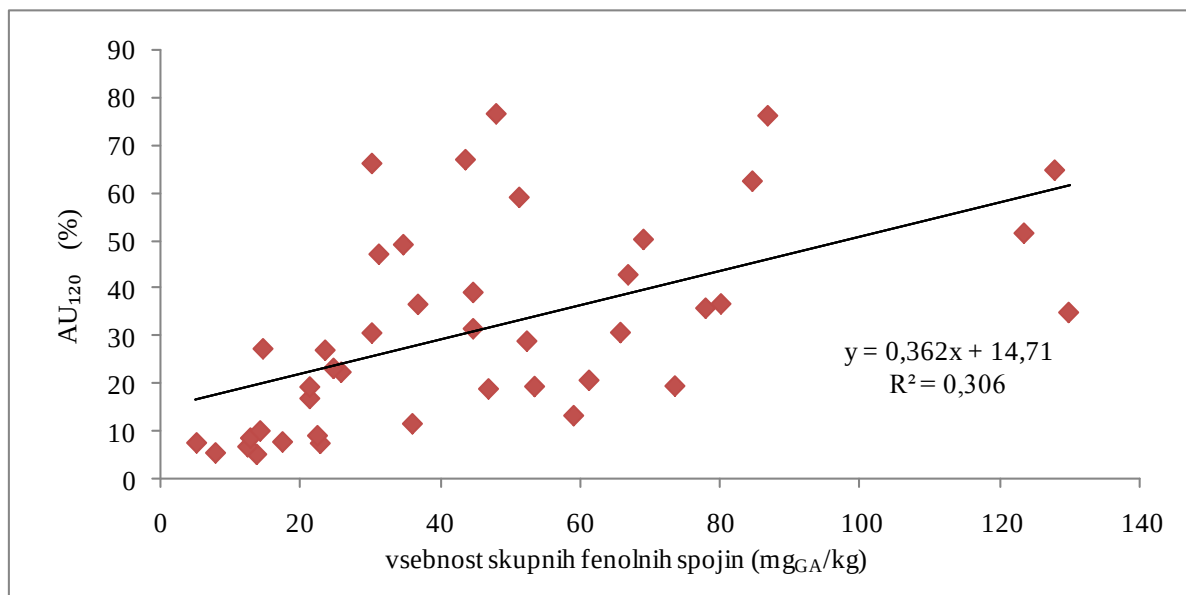
Korelacijsko analizo smo predstavili v grafični obliki in zraven podali enačbo premice.



Slika 14. Zveza med antioksidativno učinkovitostjo (15 minut) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu

Na sliki 14 je prikazana zveza med antioksidativno učinkovitostjo, merjeno po 15 minutah, in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin za 42 analiziranih vzorcev medu. Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 0,165x + 8,563$.

Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,383, koeficient korelacije (R) pa 0,619. Spremenljivki sta zmerno povezani.



Slika 15. Zveza med antioksidativno učinkovitostjo (120 minut) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v analiziranih vzorcih medu

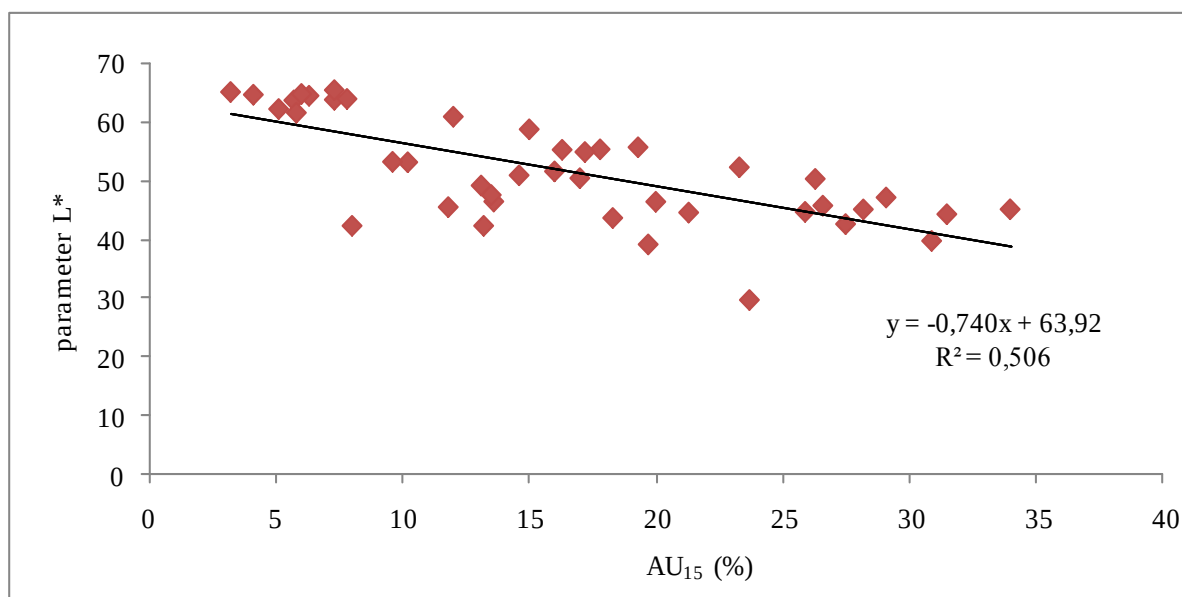
Slika 15 prikazuje zvezo med antioksidativno učinkovitostjo, merjeno po 120 minutah, in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v 42 analiziranih vzorcih medu. Odnos med spremenljivkama opisuje regresijski model $y = 0,362x + 14,71$.

Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,306 koeficient korelacije (R) pa 0,553, kar kaže na povezanost med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin. Spremenljivki sta zmerno povezani.

4.7.2 Zveza med parametrom barve L^* in antioksidativno učinkovitostjo

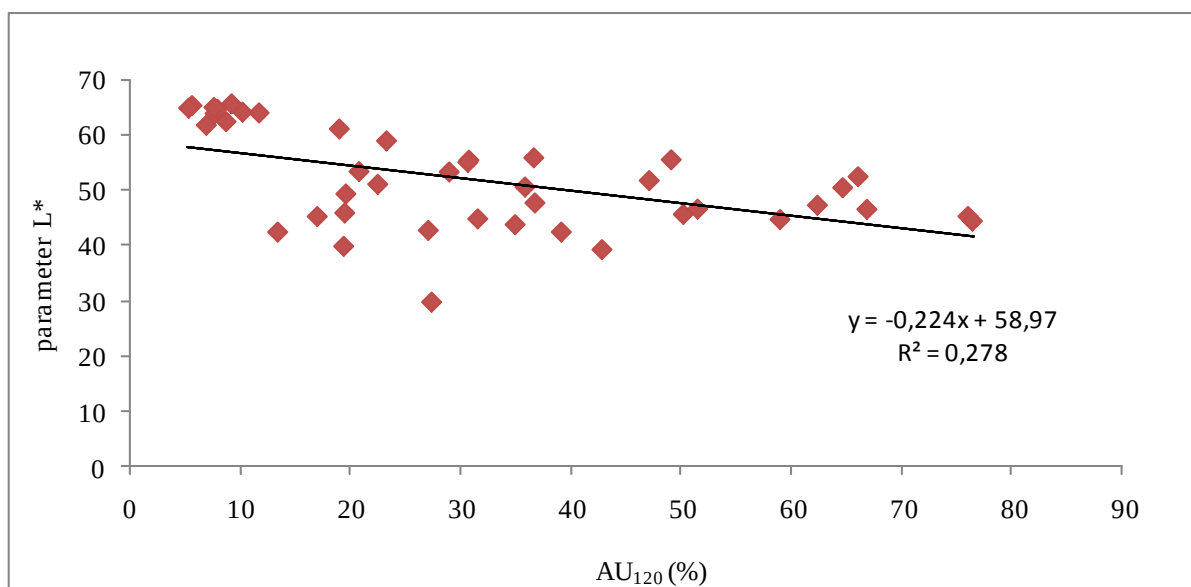
Na sliki 16 je prikazana zveza med barvo (parameter L^*) in antioksidativno učinkovitostjo (15 min) v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto.

Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = -0,740x + 63,92$. Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,506, koeficient korelacije (R) pa $-0,711$. Spremenljivki sta v obratnem sorazmerju. Svetlejši vzorci medu imajo višjo vrednost parametra L^* .



Slika 16. Zveza med parametrom barve L^* in antioksidativno učinkovitostjo (15 min) v analiziranih vzorcih medu

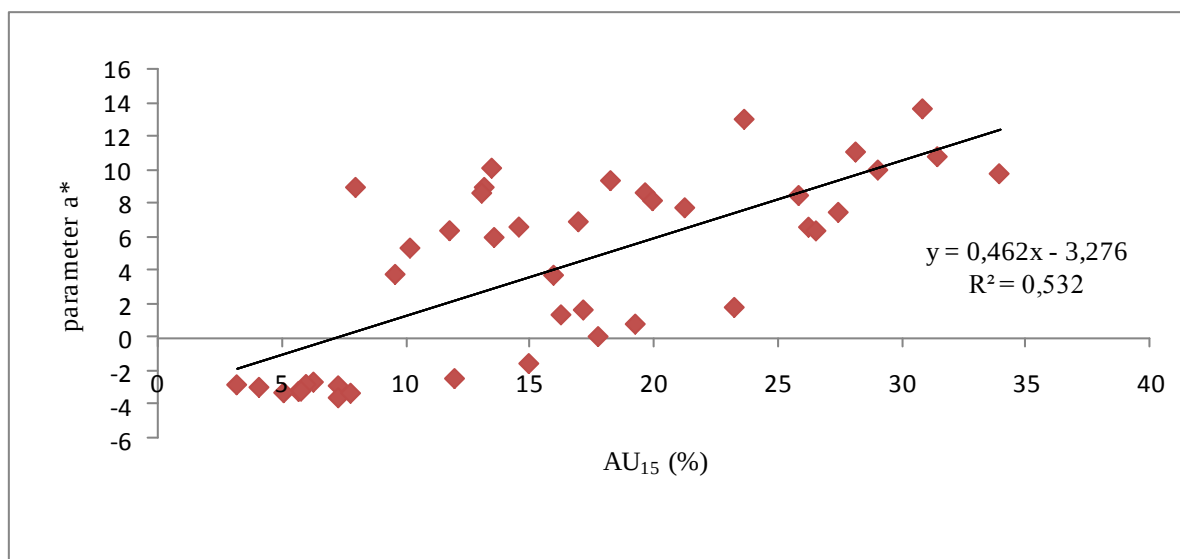
Slika 17 prikazuje zvezo med parametrom barve L^* in antioksidativno učinkovitostjo (120 min). Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = -0,224x + 58,97$. Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,278, koeficient korelacije (R) pa $-0,527$. Spremenljivki sta zmerno negativno povezani.



Slika 17. Zveza med parametrom barve L^* in antioksidativno učinkovitostjo (120 min) v analiziranih vzorcih medu

4.7.3 Zveza med parametrom barve a^* in antioksidativno učinkovitostjo

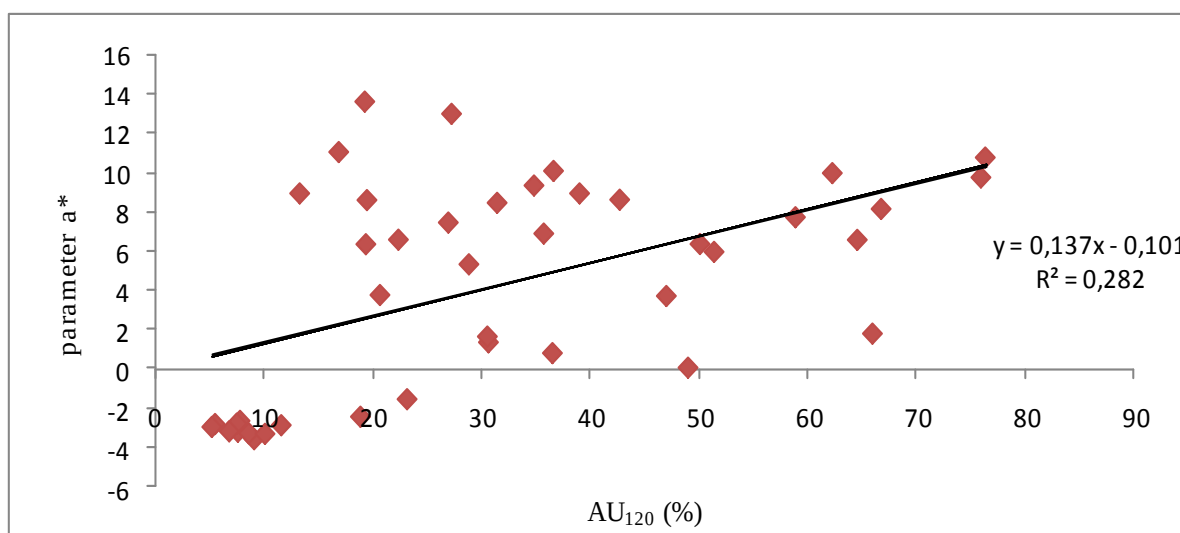
Na sliki 18 je prikazana zveza med parametrom barve a^* in antioksidativno učinkovitostjo (15 minut) v 42 analiziranih vzorcih medu. Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 0,462x - 3,276$.



Slika 18. Zveza med parametrom barve a^* in antioksidativno učinkovitostjo (15 minut) v analiziranih vzorcih medu

Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,532, kar pomeni, da neodvisna spremenljivka antioksidativna učinkovitost pojasnjuje 53 % variance parametra a^* . Vrednost korelacijskega koeficienta (R) v primeru linearne regresije znaša 0,729, kar kaže na močno povezanost med barvo medu (parameter a^*) in antioksidativno učinkovitostjo (15 minut).

Na sliki 19 je prikazana zveza med parametrom barve a^* in antioksidativno učinkovitostjo (120 minut) v analiziranih vzorcih medu ne glede na vrsto. Zvezo lahko opišemo z regresijskim modelom $y = 0,137x - 0,101$.



Slika 19. Zveza med parametrom barve a^* in antioksidativno učinkovitostjo (120 minut) v analiziranih vzorcih medu

Koeficient determinacije (R^2) je znašal 0,282, koeficient korelacije (R) pa 0,531, kar kaže na zmerno povezanost med barvo medu (parameter a^*) in antioksidativno učinkovitostjo, določeno kot % inhibicije po 120 minutah.

4.7.4 Zveze med antioksidativno učinkovitostjo in preostalimi fizikalno-kemijskimi parametri

Iz Priloge A3 je razvidno, da med antioksidativno učinkovitostjo (AU_{15}) in prostimi ter skupnimi kislinami obstaja zmerna korelacija.

Med antioksidativno učinkovitostjo (AU_{15}) in vodo, električno prevodnostjo, pepelom, vrednostjo pH, laktoni, parametrom b^* in kotom zasuka pa ni značilnih zvez.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V analizo smo vključili 42 vzorcev slovenskega medu letnika 2004, po šest vzorcev sedmih vrst medu (akacijevega, lipovega, kostanjevega, hojevega, smrekovega, cvetličnega in gozdnega medu), ki smo jih dobili od čebelarjev in čebelarskih društev iz vseh slovenskih regij.

Z analizami smo vsem vzorcem medu določili antioksidativno učinkovitost, vsebnost skupnih fenolnih spojin, vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost pepela, vrednost pH, vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov, kot zasuka in barvo. S statistično analizo smo želeli ugotoviti ali obstajajo razlike v vrednostih analiziranih parametrov med posameznimi vrstami medu ter preveriti, ali obstajajo zveze (korelacije) med analiziranimi parametri.

Da temnejši medovi vsebujejo več skupnih fenolnih spojin in imajo večjo antioksidativno učinkovitost, je znano iz literature in z našo raziskavo smo to tudi potrdili. Z metodo DPPH smo določili antioksidativno učinkovitost medu kot delež inhibicije po 15 in 120 minutah. Antioksidativna učinkovitost (AU_{15}) je bila najmanjša pri akacijevem medu (5,4 %), sledili so lipov (8,8 %), kostanjev (11,5 %), hojev (17 %), cvetlični (18,3 %), smrekov (26,2 %) in gozdni med (26,5 %), ki je imel največjo antioksidativno učinkovitost.

Gheldof in Engeseth (2002) v svoji raziskavi ugotavljata, da se antioksidativna učinkovitost v medu lahko primerja z antioksidativno učinkovitostjo svežega sadja in zelenjave. Čeprav medu ne uživamo v takšnih količinah kot sadje in zelenjavo, je lahko njegova uporaba v prehrani alternativa namiznemu sladkorju.

Vrsta in vsebnost fenolnih spojin v medu se razlikuje glede na botanično poreklo medu. S Folin-Ciocalteujevo metodo smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin. Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin v analiziranih sedmih vrstah medu je bila najmanjša v akacijevem medu (17,1 mg_{GA}/kg), sledijo lipov (22,2 mg_{GA}/kg), cvetlični (38,1 mg_{GA}/kg), hojev (49,0 mg_{GA}/kg), kostanjev (58,7 mg_{GA}/kg), smrekov (60,4 mg_{GA}/kg) in gozdni med z največjo povprečno vsebnostjo skupnih fenolnih spojin (79,5 mg_{GA}/kg).

Bertoncelj (2008) navaja, da so bile določene najmanjše vsebnosti skupnih fenolnih spojin v akacijevem, lipovem in cvetličnem medu. Največ fenolnih spojin pa so vsebovali medovi iz mane: gozdni, smrekov in hojev med.

Primerjava glede vsebnosti skupnih fenolnih spojin s tujo literaturo je pokazala, da so vrednosti primerljive. Al in sod. (2009) navajajo, da so se vrednosti za akacijev med gibale od 2 do 39 mg_{GA}/kg, za lipov med pa od 16 do 38 mg_{GA}/kg. V naši raziskavi je bila vsebnost skupnih fenolnih spojin za akacijev med od 5,1 do 36,0 mg_{GA}/kg. Pri lipovem medu pa so bile vrednosti od 12,4 do 46,9 mg_{GA}/kg.

Socha in sod. (2011) poročajo, da je imel od sedmih vrst poljskega medu ajdov med največjo antioksidativno učinkovitost. Sledili so lipov, mešan cvetlični, nektarno-manin,

manin, akacijev med in med oljne ogrščice, ki je imel najmanjšo antioksidativno učinkovitost. Ajdov med je vseboval tudi največ skupnih fenolnih spojin, najmanj jih je vseboval med oljne ogrščice.

González in sod. (2008) so analizirali nektarne in manine medove. Manini medovi so imeli povprečno antioksidativno učinkovitost, izraženo kot delež inhibicije, 64,39 %, nektarni pa 34,44 %. Avtorji tudi ugotavljajo, da imajo s senzoričnega vidika temnejši in manj sladki medovi večjo antioksidativno učinkovitost.

Vsebnost vode (g/100 g) je v analiziranih vzorcih medu variirala od 14,4 do 18,2 (povprečna vrednost 16,0), kar kaže na to, da je bil med dovolj zrel. Primerjava z literaturo kaže, da so vrednosti podobne. Feas in sod. (2010) poročajo, da je bila povprečna vsebnost vode v analiziranih vzorcih portugalskega medu 17,1 g/100 g. Bertoncelj in sod. (2011) poročajo, da je bila vsebnost vode v vzorcih slovenskega medu od 13,5 g/100 g do 18,5 g/100 g. Pravilnik o medu (2011) določa, da je lahko v medu do 20 g/100g vode, kar pomeni da so vsi analizirani vzorci glede vsebnosti vode ustrezali zahtevam pravilnika.

Najnižjo povprečno vrednost električne prevodnosti je imel akacijev med (0,20 mS/cm), najvišja pa je bila izmerjena v kostanjevem medu (od 1,28 do 2,25 mS/cm, povprečno 1,69 mS/cm). Podatki so primerljivi z analizami, ki so jih naredili Bertoncelj in sod. (2011), kjer je prav tako imel akacijev med najnižjo vrednost električne prevodnosti, kostanjev med pa najvišjo.

Največjo povprečno vsebnost pepela smo določili v kostanjevem medu (0,75 g/100 g), sledil je smrekov, hojev, gozdni, lipov in cvetlični med. Najmanjša povprečna vsebnost pepela je bila določena v akacijevem medu (0,06 g/100 g).

Najnižja povprečna vrednost pH je bila izmerjena v akacijevem medu, sledili so cvetlični, gozdni, smrekov, lipov, hojev in kostanjev med, ki je imel najvišjo povprečno vrednost pH.

Povprečne vsebnosti prostih kislin so bile od 13,6 meq/kg v kostanjevem medu do 30,6 meq/kg v smrekovem medu. Skupne kisline so si sledile po padajočem vrstnem redu: smrekov, gozdni, hojev, cvetlični, lipov, akacijev in kostanjev med. Največ laktonov je vseboval gozdni med (4,0 meq/kg), najmanj pa lipov med (0,9 meq/kg). Pravilnik o medu (2011) določa, da je lahko v kg medu največ 50 meq prostih kislin zato lahko zaključimo, da vsi vzorci ustrezajo pravilniku.

Specifični kot zasuka medu smo določili s polarimetrom. Medovi nektarnega izvora (akacijev in cvetlični med) imajo negativne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. Manini medovi (hojev, smrekov in gozdni med) pa imajo pozitivne vrednosti. Medovi, ki izvirajo iz nektarja in/ali mane (lipov in kostanjev med) imajo negativne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$, razen dveh vzorcev lipovega medu, ki sta imela pozitivne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. V teh dveh vzorcih je delež mane prevladoval nad deležem nektarja.

Najvišjo povprečno vrednost parametra L^* , ki določa svetlost medu je imel akacijev med, in sicer 64,55. Sledili so mu lipov, cvetlični, kostanjev, gozdni, smrekov in hojev med, ki ima najnižjo povprečno vrednost parametra L^* , in sicer 41,71.

Najvišjo povprečno vrednost parametra a^* je imel smrekov med (9,39), ki je tudi na pogled najbolj rdeče barve. Najnižjo povprečno vrednost a^* sta imela lipov (-2,83) in akacijev med (-2,84), kjer negativne vrednosti parametra kažejo, da v teh dveh vrstah medu prevladuje zelena barva.

Vsi analizirani vzorci medu so imeli pozitivno b^* vrednost, katera predstavlja intenziteto rumene barve. Povprečne vrednosti so se gibale od 18,83 za akacijev med do 46,83 za cvetlični med.

Analiza povezav med obravnavanimi parametri je pokazala, da obstaja zmerna zveza (korelacija) med antioksidativno učinkovitostjo in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin. Koeficient korelacije med antioksidativno učinkovitostjo, izraženo kot delež inhibicije po 15 minutah, in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin je znašal 0,619. Bertoncelj (2008) v svoji raziskavi navaja, da je bila korelacija med AU (metoda DPPH) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin (metoda FC) statistično značilna. Koeficienti korelacije so se gibali od 0,575 za vzorce akacijevega medu, do 0,810 za vzorce cvetličnega medu. Skupni koeficient korelacije za vse analizirane medove je bil 0,920. Korelacija kaže na to, da so fenolne spojine odgovorne za antioksidativno učinkovitost medu.

Med barvo medu (parametrom L^*) in antioksidativno učinkovitostjo (AU_{15}) obstaja močna zveza s koeficientom korelacije -0,711. Prav tako je močna zveza med barvo medu (parametrom a^*) in antioksidativno učinkovitostjo (AU_{15}) s koeficientom korelacije 0,729.

Bertoncelj (2008) navaja, da je bil pri zvezi med vrednostjo L^* in AU (metoda DPPH) koeficient korelacije -0,845.

Vse vrste medu vsebujejo fenolne spojine in so antioksidativno učinkovite. Vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost se razlikujeta med različnimi vrstami medu in sta največji pri temnejših medovih, kot so hojev, smrekov in gozdni med, medtem ko imajo svetlejši medovi, kot sta akacijev in lipov med, manjšo vsebnost skupnih fenolnih spojin in posledično manjšo antioksidativno učinkovitost. To potrjuje, da fenolne spojine vplivajo na antioksidativno učinkovitost medu (Bertoncelj in sod., 2007).

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov določanja antioksidativne učinkovitosti slovenskega medu v povezavi z nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Antioksidativna učinkovitost je bila največja v temnejših medovih (gozdni in smrekov med), v svetlejših vrstah medu, kamor sodita akacijev in lipov med, pa najmanjša.
- Največ skupnih fenolnih spojin je vseboval gozdni med, najmanj pa akacijev in lipov med.
- Vsebnost vode se je v analiziranih vzorcih medu gibala od 14,4 g/100 g (vzorca hojevega in smrekovega medu) do 18,2 g/100 g (vzorec hojevega medu).
- Najvišjo povprečno električno prevodnost in največjo povprečno vsebnost pepela je imel kostanjev med. Akacijev med je imel najnižjo povprečno električno prevodnost in najmanjšo povprečno vsebnost pepela.
- Najnižjo povprečno vrednost pH je imel akacijev med, sledili so mu cvetlični, gozdni, smrekov, lipov, hojev in kostanjev med, ki je imel najvišjo povprečno vrednost pH.
- Smrekov med je imel v povprečju največjo vsebnost prostih in skupnih kislin. Najmanjšo povprečno vsebnost prostih in skupnih kislin smo določili pri kostanjevem medu. Gozdni med je vseboval v povprečju največ laktonov, lipov med pa najmanj.
- Medovi nektarnega izvora (akacijev in cvetlični med) imajo negativne vrednosti specifičnega kot zasuka ($[\alpha]_D^{20}$). Manini medovi (hojev, smrekov in gozdni med) pa imajo pozitivne vrednosti. Medovi mešanega izvora (lipov in kostanjev med) imajo negativne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$, saj vsebujejo več nektarja kot mane, razen dveh vzorcev lipovega medu, ki sta imela pozitivne vrednosti $[\alpha]_D^{20}$. Vzrok je verjetno ta, da je v teh dveh vzorcih prevladovala mana nad nektarjem.
- Najvišjo povprečno vrednost parametra L^* , ki določa svetlost medu je imel najsvetlejši akacijev med. Sledili so lipov, cvetlični, kostanjev, gozdni, smrekov in hojev med, ki je imel najnižjo povprečno vrednost parametra L^* . Najvišjo vrednost parametra a^* je imel smrekov med. Najnižjo povprečno vrednost a^* sta imela lipov in akacijev med. Vrednosti za parameter b^* so se gibale od 18,83 za akacijev med do 46,83 za cvetlični med.
- Med antioksidativno učinkovitostjo (AU_{15}) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin je bila dokazana zmerna povezava. Med parametrom barve L^* in AU_{15} ter med parametrom barve a^* in AU_{15} sta bili močni povezavi.

6 POVZETEK

Med je naravno živilo, sestavljeno v glavnem iz reducirajočih sladkorjev. Vsebuje pa tudi spojine, ki se razlikujejo glede na botanično poreklo, pasmo čebel in vplive okolja. V medu tako najdemo cvetni prah, vosek in druge spojine kot so encimi, vitamini, aminokisline, barvila, fenolne kisline in flavonoidi.

Namen diplomskega dela je bil določiti antioksidativno učinkovitost 42 vzorcem medu v povezavi z nekaterimi fizikalno-kemijskimi parametri.

Z metodo DPPH smo določili antioksidativno učinkovitost medu. Največja antioksidativna učinkovitost, izražena kot sposobnost lovljenja prostih radikalov, je bila določena v gozdnem in smrekovem medu. Najmanjša antioksidativna učinkovitost je bila določena v akacijevem in lipovem medu. Na večjo antioksidativno učinkovitost vplivajo skupne fenolne spojine. Več jih je, temnejša je barva medu in večja je antioksidativna učinkovitost.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo v medu določili s Folin-Ciocalteujevo metodo. Največja povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin je bila določena v gozdnem medu (79,5 mg_{GA}/kg), sledita mu smrekov (60,4 mg_{GA}/kg) in kostanjev med (58,7 mg_{GA}/kg). Značilno najmanj skupnih fenolnih spojin smo določili v svetlejših vrstah medu, lipovem (22,2 mg_{GA}/kg) in akacijevem (17,1 mg_{GA}/kg) medu.

V analiziranih vzorcih medu smo določili tudi vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost pepela, vrednost pH, vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov, kot zasuka in barvo medu. Rezultate analiz smo primerjali s Pravilnikom o medu (2011) in ugotovili, da ustrezajo predpisanim zahtevam.

Med antioksidativno učinkovitostjo (AU_{15}) in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin obstaja zmerne povezanost, med parametrom barve L^* in AU_{15} pa smo ugotovili močno povezanost. Prav tako obstaja močna povezanost med parametrom barve a^* in AU_{15} .

Svetlejši medovi, kot so akacijev, lipov in cvetlični med imajo manjšo antioksidativno učinkovitost, vsebujejo manj skupnih fenolnih spojin, imajo nižjo električno prevodnost in vsebujejo manj pepela, v primerjavi s temneje obarvanimi medovi, kot so kostanjev, hojev, smrekov in gozdni med.

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
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2.izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za biomedicinsko informatiko: 27- 35
- Al L.M., Daniel D., Moise A., Bobis O., Laslo L., Bogdanov S. 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. Food Chemistry, 112, 4: 863-867
- Aljadi A.M., Kamaruddin M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chemistry, 85, 4: 538-542
- Al-Mamary M., Al-Meer A., Al-Habori M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutrition Research, 22, 9: 1041-1047
- Al-Qassemi R., Robinson R.K. 2003. Some special nutritional properties of honey - a brief review. Nutrition and Food Science, 33, 6: 254-260
- Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Diaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S., Battino M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food and Chemical Toxicology, 48, 8-9: 2490-2499
- Andrade P., Ferreres F., Gil M.I., Tomás-Barberán F.A. 1997. Determination of phenolic compounds in honey 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 920.181. Ash of honey. 1999. V: Official method of analysis of AOAC International. Vol. 2 Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 21-21
- AOAC Official method 962.19. Acidity (free, lactone and total) of honey. 1999. V: Official method of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 31-31
- AOAC Official method 969.38. Moisture in honey. 1999. V: Official method of analysis of AOAC International. Vol. 2 Cunniff P. (ed.). 16th ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 21-21

- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. 2009. Food chemistry. 4th rev. and extended ed. Berlin, Springer: 883- 890
- 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
- Bertoncelj 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
- Bertoncelj J. 2008. Identifikacija in vsebnost nekaterih antioksidantov v slovenskem medu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 124 str.
- Bertoncelj J., Golob T., Kropf U., Korošec M. 2011. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 8: 1661-1671
- Bogdanov S. 1989. Determination of pinocembrin in honey using HPLC. *Journal of Apicultural Research*, 28: 55-57
- Božnar A. 2003. Mikrobiologija medu. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 581-585
- Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 376-413
- Cavazza A., Corradini C., Musci M., Salvadeo P. 2012. High-performance liquid chromatographic phenolic compound fingerprint for authenticity assessment of honey *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.5869: 7 str. (v tisku)
- Cai Y., Sun M., Corke H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8: 2288-2294
- Doner L.W. 2003. Honey. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol.5. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Ltd., Academic Press: 3125-3130
- Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G., Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effect of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3774-3779
- Evropska komisija. 2012. Predlog komisije: jasnejši predpisi o statusu cvetnega prahu v medu. Bruselj, Evropska komisija: 2 str.
http://www.europa.eu/rapid/press-release_IP-12-992_sl.doc (september, 2012)

- Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M., Estevinho L.M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 4: 1438-1443
- Fleetwood J. 2009. Med. Tržič, Učila: 96 str.
- Frankel S., Robinson G.E., Berenbaum M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 1: 27-31
- Gazzani G., Papetti A., Daglia M., Berte F., Gregotti C. 1998. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsomes and the effect of thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4123-4127
- Gheldof 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
- Gheldof 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
- Goljat A. 2007. Med. Ljubljana, ČZD Kmečki glas, d.o.o.: 142 str.
- Golob T., Jamnik M., Božič J., Kropf U., Kandolf A., Bertonecelj J., Zdešar P., Meglič M., Goljat A. 2008. Med: značilnosti slovenskega medu. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 84 str.
- Golob T., Plestenjak A. 1999. The physico-chemical characteristics of Slovenian honey. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 73: 209-217
- Gomes S., Dias L.G., Moreira L.L., Rodrigues P., Estavinho L. 2009. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 2: 727-733
- González L.M., De Lorenzo C.C., Pérez M.R.A. 2008. Sensory attributes and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Sensory Studies*, 23, 3: 193-302
- Junk W.R., Pancoast H.M. 1973. Handbook of sugars for processors, chemists and technologists. Westport, AVI Publishing Company: 295-296
- Kasenburger P. 2006. Vsebnost sladkorjev ter prostih in skupnih kislin v različnih vrstah slovenskega medu. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 98 str.
- Kaškonienė V., Venskutonis P. R. 2010. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 6: 620-634

Kolankaya D. 2001. Antioxidant effect and honey. *Mellifera*, 1, 1: 45-50

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih 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:11-21

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 56 str.

Košmelj K., Kastelec D. 2001. Uporabna biostatistika. Načrtovanje in analiza poskusov: delovno gradivo za podiplomski študij. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 108 str.

Kropf U., Jamnik M., Bertonec 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

Lachman J., Orsák M., Hejtmánková A., Kovářová E. 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1: 52-58

Lorente M.G., de Lorenzo C.C., Martin R.A.P. 2008. Sensory attributes and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Sensory Studies*, 23, 3: 293-302

Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52: 483-489

Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 3: 571-577

Meglič M. 2004. Čebelji pridelki, pridobivanje in trženje. 1. izdaja. Brdo pri Lukovici, Čebelarstva zveza Slovenije: 96 str.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219

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

Oomah B.D., Mazza G. 1996. Flavonoids and antioxidant activities in buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1746-1750

- Ovčec S. 2007. Encimska aktivnost medu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 76 str.
- Perna A., Simonetti A., Intaglietta I., sofo A., Gambacorta E. 2012. Metal content of southern Italy Honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 9: 1909-1917
- Persano Oddo L., Piro R. 2004. Main european unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35: 38-81
- Pichichero E., Canuti I., Canini A. 2008. Characterization of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 4: 609-616
- Pravilnik o medu. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21, 4: 345-346
- Pryor W.A. 1994. Oxidants and Antioxidants. V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 1-24
- Roginsky V., Lissi E.A. 2004. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2: 235-254
- Saxena S., Gautam S., Sharma A. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, 118, 2: 391-397
- Seljak J. 1996. Statistične metode. Ljubljana, Visoka upravna šola: 197-199
- Shahidi F., Naczk M. 1995. Antioxidant properties of food phenolics. V: Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Shahidi F. (ed.). Lancaster, Pennsylvania, Technomic Publishing Company, Inc.: 235-273
- Socha R., Juszczak L., Pietrzyk S., Gałkowska D., Fortuna T., Witczak T. 2011. Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 3: 528-534
- SURS. 2011. Tradicionalni slovenski zajtrk. Priloga s podrobnejšimi podatki. Ljubljana, Statistični urad republike Slovenije: 1 str.
http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=4350 (november, 2011)
- Šivic F. 2008. Mana ali medena rosa. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje. Zdešar P. (ur.). Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 338-338
- Tominec M. 2010. Kvantitativna določitev aminokislin v medu z metodo HPLC. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 80 str.

- Tonks A.J., Dudley E., Porter N.G., Paton J., Brazier J., Smith E.L., Tonks A.J. 2007. A 5.8 kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *Journal of Leukocyte Biology*, 82, 5: 1147-1155
- Ulusoy E., Kolayli S., Sarikaya A.O. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of different floral origin honeys from Turkiye. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 1: 321-335
- 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
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001. Portorož, 8-9 nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-106
- 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
- Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:218-223
- 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., Datta N., Raymont K. 2004. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86, 2: 169-177

ZAHVALA

- Najprej bi se rada zahvalila prof. dr. Tereziji Golob, doc. dr. Jasni Bertoncelj, prof. dr. Tatjani Košmerl in dr. Urški Kropf za vso pomoč pri izdelavi praktičnega in pisnega dela diplomske naloge.
- Naslednja zahvala gre mojemu možu Silvu in hčerki Ajdi za vso podporo.
- Zahvala gre tudi mojim staršem.

PRILOGE

Priloga A1. Antioksidativna učinkovitost, vsebnost skupnih fenolnih spojin, vode, pepela, električna prevodnost in vrednost pH v analiziranih vzorcih različnih vrst slovenskega medu

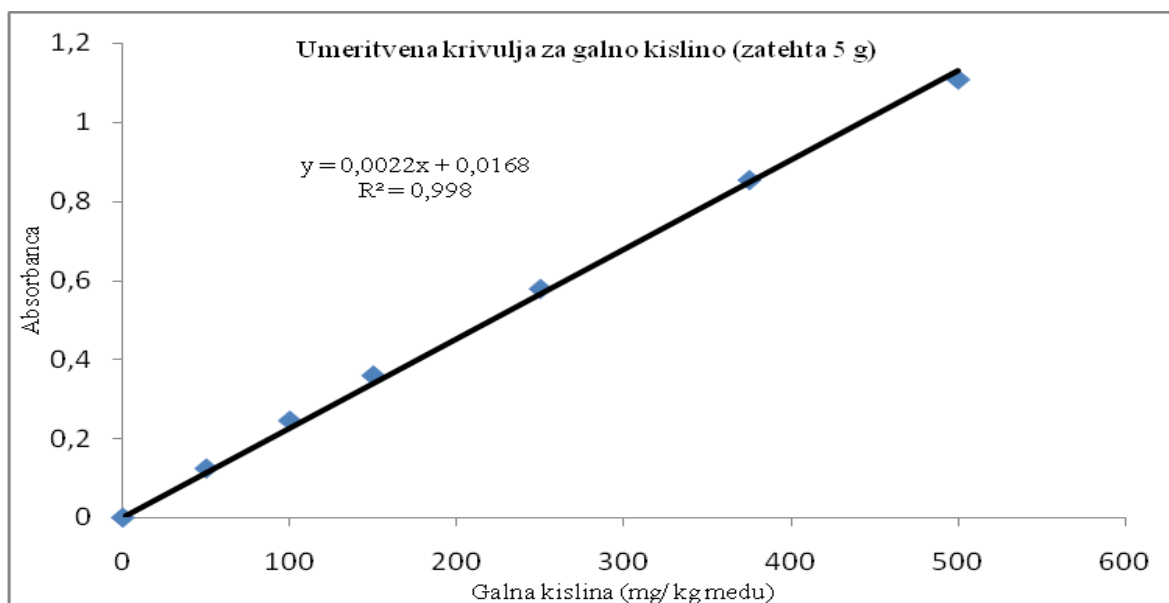
Vrsta medu	Vzorec	AU ₁₅ (%)	AU ₁₂₀ (%)	Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/kg)	Vsebnost vode (g/100 g)	Vsebnost pepela (g/100 g)	EP (mS/cm)	pH
akacijev	A 2	5,7	7,6	5,1	16,1	0,08	0,193	4,34
	A 310	6,0	7,5	22,8	17,5	0,05	0,201	4,06
	A 390	7,3	11,6	36,0	15,9	0,06	0,235	3,90
	A 485	6,3	7,8	17,4	15,4	0,05	0,197	3,86
	A 492	3,2	5,5	7,8	15,8	0,04	0,157	3,99
	A 532	4,1	5,2	13,7	15,3	0,08	0,187	4,11
lipov	L 3	5,1	8,6	12,8	16,5	0,30	0,776	4,76
	L 214	15,0	23,2	24,7	17,0	0,37	0,950	4,60
	L 250	12,0	18,9	46,9	15,3	0,27	0,765	4,14
	L 261	7,8	10,1	14,2	17,5	0,24	0,734	4,58
	L 320	5,8	6,8	12,4	15,3	0,24	0,705	4,98
	L 391	7,3	9,1	22,4	17,5	0,19	0,637	4,95
kostanjev	K 171	9,6	20,7	61,3	15,7	0,65	1,567	5,99
	K 184	13,5	36,7	80,2	16,2	0,68	1,524	5,11
	K 461	8,0	13,3	59,1	17,7	1,05	2,245	5,82
	K 465	14,6	22,4	25,8	15,7	0,55	1,280	4,65
	K 486	10,2	28,9	52,4	16,2	0,71	1,617	5,89
	K 507	13,1	19,5	73,6	16,5	0,84	1,889	5,51
hojev	H 4	13,6	19,3	21,3	15,9	0,47	1,099	4,76
	H 280	20,0	27,0	23,5	14,7	0,51	1,269	5,13
	H 282	19,7	31,5	44,7	14,4	0,54	1,290	5,02
	H 484	11,8	16,9	21,3	14,9	0,38	0,963	4,82
	H 661	13,2	19,4	53,5	18,2	0,52	1,288	4,75
	H 666	23,7	34,9	130,0	16,1	0,47	1,155	4,41
smrekov	S 121	30,9	51,5	123,6	14,4	0,54	1,259	4,64
	S 202	27,5	66,9	43,6	14,5	0,33	0,923	4,60
	S 221	25,9	42,8	66,9	15,7	0,58	1,566	4,68
	S 425	28,2	50,2	69,1	14,6	0,61	1,385	4,76
	S 520	26,6	39,1	44,7	15,7	0,60	1,388	4,59
	S 541	18,3	27,3	14,6	16,5	0,56	1,334	4,67
cvetlični	C 35	17,8	49,1	34,7	15,9	0,22	0,579	4,84
	C 68	16,0	47,1	31,2	17,5	0,26	0,775	4,54
	C 294	16,3	30,7	65,8	15,7	0,29	0,754	4,45
	C 400	17,2	30,6	30,2	16,0	0,16	0,496	4,26
	C 600	23,3	66,1	30,2	15,5	0,19	0,603	4,77
	C 658	19,3	36,6	36,8	15,5	0,18	0,574	4,39
gozdni	G 81	17,0	35,8	78,0	17,6	0,33	0,910	4,54
	G 83	26,3	64,7	128,0	16,7	0,45	1,117	4,46
	G 88	29,1	62,4	84,7	16,9	0,57	1,342	4,55
	G 283	34,0	76,1	86,9	14,9	0,42	1,129	4,80
	G 404	21,3	59,0	51,3	16,0	0,38	0,990	4,43
	G 500	31,5	76,5	48,0	15,1	0,43	1,084	4,52

Priloga A2. Vsebnost skupnih kislin, prostih kislin in laktonov, kot zasuka in parametri barve L*, a* in b* v analiziranih vzorcih različnih vrst slovenskega medu

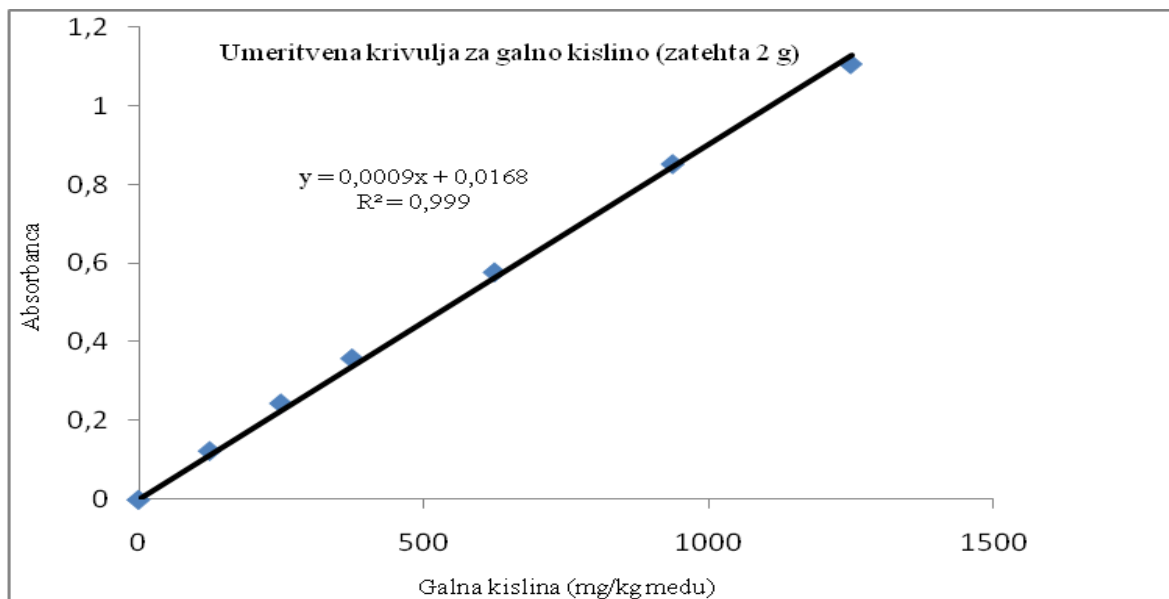
Vrsta medu	Vzorec	Vsebnost skupnih kislin (meq/kg)	Vsebnost prostih kislin (meq/kg)	Vsebnost laktonov (meq/kg)	Kot zasuka (° cm ³ /g dm)	L*	a*	b*
akacijev	A 2	14,50	9,54	4,96	-24,72	63,82	-3,15	21,16
	A 310	15,99	13,03	2,96		64,92	-2,74	14,78
	A 390	21,13	15,91	5,22	-13,58	63,93	-2,82	23,37
	A 485	19,96	17,83	2,13	-14,78	64,61	-2,60	19,56
	A 492	13,87	12,75	1,12		65,25	-2,76	15,88
	A 532	14,58	12,87	1,71	-28,15	64,79	-2,91	18,21
lipov	L 3	12,95	12,90	0,05	14,57	62,35	-3,23	33,19
	L 214	21,64	19,38	2,27	-5,81	58,89	-1,50	38,23
	L 250	41,78	40,58	1,20	-11,60	61,04	-2,39	37,54
	L 261	17,13	16,03	1,10	-22,32	64,07	-3,26	21,28
	L 320	10,53	9,53	1,00	13,11	61,71	-3,13	23,91
	L 391	9,20	8,95	0,25	-1,99	65,57	-3,53	21,94
kostanjev	K 171	8,85	8,29	0,56	-19,40	53,35	3,79	45,50
	K 184	17,06	15,63	1,43	-7,46	47,69	10,09	41,32
	K 461	12,07	9,16	2,92		42,44	8,95	33,32
	K 465	28,55	26,58	1,97	-9,72	51,05	6,60	45,46
	K 486	10,03	10,03	0,00		53,28	5,35	49,36
	K 507	13,35	11,58	1,77		49,31	8,61	44,30
hojev	H 4	24,81	21,79	3,02	5,45	46,58	5,98	37,70
	H 280	21,13	19,52	1,61	17,53	46,54	8,16	38,39
	H 282	22,50	22,50	0,00	19,05	39,27	8,63	29,10
	H 484	22,83	21,75	1,08	7,50	45,63	6,38	36,67
	H 661	30,24	27,42	2,82	9,85	42,44	8,95	33,32
	H 666	41,73	34,09	7,64	-5,42	29,80	12,99	13,67
smrekov	S 121	34,50	30,44	3,96	12,25	39,87	13,61	29,37
	S 202	21,57	18,61	2,96	0,47	42,74	7,47	33,04
	S 221	35,10	34,63	0,48	10,44	44,82	8,47	35,08
	S 425	32,53	32,53	0,00	10,54	45,24	11,05	39,11
	S 520	38,50	35,50	3,00	18,22	45,88	6,37	36,77
	S 541	32,18	32,18	0,00	26,35	43,78	9,35	35,39
cvetlični	C 35	13,57	12,79	0,78	-19,94	55,48	0,10	49,18
	C 68	19,77	17,46	2,31	-7,88	51,72	3,74	43,37
	C 294	29,79	25,01	4,78	-5,33	55,40	1,39	47,64
	C 400	21,36	17,07	4,29	-8,43	55,02	1,68	47,44
	C 600	12,43	12,32	0,12	-1,48	52,42	1,83	44,15
	C 658	23,10	19,58	3,52	-21,55	55,83	0,84	49,22
gozdni	G 81	29,76	27,02	2,74	-4,00	50,56	6,91	46,60
	G 83	35,51	29,78	5,73	4,07	50,44	6,59	44,54
	G 88	38,53	33,09	5,44	5,33	47,27	9,98	41,57
	G 283	27,56	24,02	3,54	0,47	45,26	9,76	37,33
	G 404	28,35	26,02	2,33	-4,63	44,70	7,74	37,41
	G 500	33,30	28,96	4,34	7,68	44,42	10,77	35,89

Priloga A3. Pearsonovi koeficienti korelacije

	FC	AU ₁₅	AU ₁₂₀	Voda	EP	Pepel	pH	Skupne kisline	Laktoni	Proste kisline	L [*]	a [*]	b [*]	Kot zasuka
FC	1													
AU ₁₅	0,619 **	1												
AU ₁₂₀	0,553 **	0,912 **	1											
Voda	-0,034	-0,372 *	-0,285	1										
EP	0,510 **	0,384 *	0,274	0,041	1									
Pepel	0,494 **	0,335 *	0,225	0,039	0,991 **	1								
pH	0,177	0,006	0,030	0,057	0,765 **	0,761 **	1							
Skupne kisline	0,542 **	0,670 **	0,465 **	-0,154	0,221	0,191	-0,376 *	1						
Laktoni	0,481 **	0,303	0,247	0,099	-0,117	-0,098	-0,396 **	0,464 **	1					
Proste kisline	0,484 **	0,660 **	0,450 **	-0,186	0,263	0,227	-0,323 *	0,982 **	0,290	1				
L [*]	-0,619 **	-0,711 **	-0,527 **	0,218	-0,710 **	-0,689 **	-0,341 *	-0,541 **	-0,216	-0,538 **	1			
a [*]	0,684 **	0,729 **	0,531 **	-0,193	0,765 **	0,752 **	0,370 *	0,537 **	0,200	0,537 **	-0,947 **	1		
b [*]	0,232	0,385 *	0,475 **	-0,033	0,431 **	0,403 **	0,416 **	0,113	-0,107	0,145	-0,269	0,325 *	1	
Kot zasuka	0,159	0,439 **	0,242	-0,172	0,602 **	0,586 **	0,293	0,370 *	-0,184	0,441 **	-0,563 **	0,548 **	0,055	1



Priloga B1. Umeritvena krivulja za določanje galne kisline za svetlejše vrste medu (odtehta medu 5 g)



Priloga B2. Umeritvena krivulja za določanje galne kisline za temnejše vrste medu (odtehta medu 2 g)