

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nataša ŠENK

**VREDNOTENJE MEDU: ZVEZA MED BARVO MEDU IN ANTIOKSIDATIVNO
AKTIVNOSTJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF HONEY: RELATIONSHIP BETWEEN HONEY COLOUR AND
ANTIOXIDATIVE ACTIVITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za vrednotenje živil Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nataša Šenk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 638.16: 543.645:544(043)=863
KG med/ slovenski med/ barva medu/fenoli/ DPPH/ antioksidativna aktivnost/ FRAP/
antioksidativna moč redukcije železa
AV ŠENK, Nataša
SA GOLOB, Terezija (mentorica)/ ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN VREDNOTENJE MEDU: ZVEZA MED BARVO MEDU IN
ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOSTJO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 61 str., 16 pregl., 29 sl., 7 pril., 54 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Diplomaska naloga obsega določanje barve, vsebnosti skupnih fenolnih spojin in antioksidativne aktivnosti v 72 vzorcih slovenskega medu, letnik 2005, ter iskanje zvez med obravnavanimi parametri z računanjem linearnih regresijskih modelov. Ugotovljeno je bilo, da ima najsvetlejši akacijev med najvišjo povprečno vrednost parametra L*, 64,0; precej temnejša medova, gozdni in smrekov, pa le 43,1 oziroma 44,1. Istočasno so imeli vzorci teh dveh vrst medu najvišjo vrednost parametra a*, 9,4 in 9,1, medtem ko sta bili povprečni vrednosti parametra b* najvišji pri cvetličnem in kostanjevem medu, 40,9 oziroma 40,7. Spektrofotometrično merjenje neto absorbance je pokazalo najvišjo povprečno vrednost v gozdnem medu, 433,1, najnižjo pa v akacijevem medu, 77,4. Največ skupnih fenolnih spojin so vsebovali vzorci gozdnega in smrekovega medu, in sicer 199,0 oziroma 195,8 mg_{GA}/kg medu. V vzorcih smrekovega medu so bile določene najvišje vrednosti koncentracije učinkovitosti (IC₅₀), med 5,7 in 12,5 mg/ml, medtem ko je bila najvišja antioksidativna aktivnost, določena s FRAP metodo v 10 % raztopinah medu, izmerjena v gozdnem medu, 350,9 μM Fe(II), najnižja pa akacijevem medu, 66,2 μM Fe(II). Rezultati korelacijske analize so pokazali močno zvezo med parametri določanja barve, vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativno aktivnostjo. Korelacijski koeficienti znašajo od 0,91 do 0,96. Rezultati raziskave kažejo, da temnejše vrste medu (gozdni, smrekov, kostanjev) vsebujejo več skupnih fenolov in imajo večjo antioksidativno aktivnost, svetlejši vrsti medu (akacijev, cvetlični) pa imata manjšo vsebnost skupnih fenolnih spojin in tudi manjšo antioksidativno aktivnost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dc
DC UDC 638.16:543.645:544(043)=863
CX honeys/ Slovenian honey/ honey colour/ phenols/ DPPH/ antioxidative activity/
FRAP/ ferric reducing antioxidant power
AU ŠENK, Nataša
AA GOLOB, Terezija (supervisor), ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000, Ljubljana
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2006
TI EVALUATION OF HONEY: RELATIONSHIP BETWEEN HONEY COLOUR
AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY
DT Graduation thesis (university studies)
NO XII, 67 p., 16 tab., 29 fig., 7 ann., 54 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The graduation thesis has included determining of colour, total phenolics contents and antioxidative activities in 72 samples of Slovenian honey, which were collected in the year 2005, furthermore, searching for relationships between parameters with the calculation of linear regressive models. It was found, that the brightest acacia honey obtained the highest average value of the parameter L*, 64,0, the lowest average values were obtained for the much darker forest and spruce honeys, just 43,1 and 44,1 respectively. At the same time the samples of those honeys had the highest averages of the parameter a*, 9,4 and 9,1, while the highest average values of the parameter b* were obtained in floral and chestnut honey samples, 40,9 and 40,7. The spectrophotometric measurement of net absorbance resulted in the highest average in forest honey, 433,1 and the lowest in acacia honey, 77,4. The largest total phenolics were obtained for forest and spruce honey, 199,0 and 195,8 mg_{GA}/kg. Samples of spruce honey had the highest values of efficient concentration (IC₅₀) and ranged from 5,7 to 12,5 mg/ml, while the highest average values of antioxidative activity, determined by FRAP assay in 10 % (w/v) honey solution, were measured in forest honey, 350,9 µM Fe(II) and the lowest antioxidative activity was measured in acacia honey, 66,2 µM Fe(II). The results of correlation analysis showed strong relationships between colour, total phenolics content and antioxidative activity. Correlation coefficients ranged from 0,91 to 0,96. The results of our research have shown, that the darkest honey species (forest, spruce, chestnut) contain more total phenolics components and have higher antioxidative activity than brightest honey species (acacia, floral) which have lower total phenolics content and also lower antioxidative activity.

KAZALO VSEBINE

	str.
1 UVOD	1
1.1 CILJ RAZISKAVE JE BIL	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SESTAVA MEDU	3
2.2 BARVA MEDU	3
2.2.1 Merjenje barve medu s kromometrom Minolta	6
2.2.2 Spektrofotometrično določanje barve medu	8
2.2.3 Merjenje barve medov po Pfund-u	8
2.3 RADIKALI	10
2.3.1 Vrste in učinki radikalov	10
2.4 ANTIOKSIDANTI	11
2.4.1 Delitev antioksidantov	11
2.4.2 Oksidativni stres	12
2.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	12
2.5.1 DPPH metoda	14
2.5.2 FRAP metoda	15
2.5.3 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda	16
2.5.4 ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metoda	16
2.5.5 Določanje AA z β-karotenom	16
2.6 ANTIOKSIDANTI V MEDU	16
2.6.1 Izvor antioksidantov v medu	16
2.6.2 Vrste antioksidantov v medu	17
2.6.3 Skupni fenoli	19
2.6.4 Pomen antioksidantov v medu	20
2.6.5 Antimikrobno delovanje medu	22
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 VZORCI	23
3.2 MERJENJE BARVE	23
3.2.1 Merjenje barve z Minolta kromometrom	23
3.2.2 Spektrofotometrično merjenje barve	24
3.3 DOLOČITEV VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV S FC METODO	24
3.4 MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	25
3.4.1 DPPH[*] metoda (Beretta in sod., 2005)	25
3.4.2 FRAP metoda (Benzie in Strain, 1996)	26
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	27
4 REZULTATI	30
4.1 REZULTATI MERJENJA BARVE MEDU	30
4.1.1 L*, a* in b* vrednosti barve medu	30
4.1.2 Spektrofotometrično določanje barve medu	36
4.1.2.1 Zveza med vrednostmi parametra L* in neto absorbancami posameznih vrst medu	37
4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV	38

4.2.1	Zveza med barvo in vsebnostjo skupnih fenolov v medu.....	39
4.3	REZULTATI MERJENJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	40
4.3.1	Rezultati DPPH metode	40
4.3.2	Rezultati določanja AA s FRAP metodo	44
4.3.2.1	Zveza med AA določeno s FRAP metodo in vsebnostjo skupnih fenolov	45
4.3.2.2	Zveza med barvo medu in AA določeno s FRAP metodo.....	46
4.3.3	Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA....	47
4.3.3.1	Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za akacijev med.....	47
4.3.3.2	Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za cvetlični med.....	48
4.3.3.3	Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za kostanjev med.....	49
4.3.3.4	Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za smrekov med.....	50
4.3.3.5	Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za gozdni med.....	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.2	SKLEPI	55
6	POVZETEK.....	57
7	VIRI.....	58

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Barvne karakteristike različnih vrst slovenskega medu (Golob in sod., 2002)..	6
Preglednica 2. Parametri barve (L^* , a^* in b^*) različnih vrst medu, kot jih navajajo tuji (González-Miret in sod., 2005; Terrab in sod., 2002; Piotraszewska-Pajak in Ciszak, 2005; Lazaridou in sod., 2004) in slovenski (Zupančič, 2002) avtorji .	7
Preglednica 3. Ameriški standardi institucije United states Department of Agriculture za določanje barve medu (United States Standards..., 1985).....	9
Preglednica 4. Vrednosti merjenja barve različnih vrst evropskega medu po Pfundu (Persano Oddo in sod., 2004).....	9
Preglednica 5. Mesta delovanja in učinki radikalov (Korošec, 2000)	11
Preglednica 6. Vrste fenolnih in nefenolnih spojin v medu (Al-Mamary in sod., 2002; Gheldof in sod., 2002; Tomás-Barberán in sod., 2001)	17
Preglednica 7. Fenolne spojine, ki nastopajo kot markerji botaničnega porekla v posameznih vrstah evropskega medu (Tomás-Barberán in sod., 2001).....	18
Preglednica 8. Vsebnost skupnih fenolov v različnih vrstah medu, kot jih navajajo tuji avtorji (Beretta in sod., 2005; Gheldof in Engeseth, 2002; Al-Mamary in sod., 2002; Küçük in sod., 2007)	20
Preglednica 9. Vrste medu in število ter oznaka vzorcev posamezne vrste.....	23
Preglednica 10. Prikaz razredčevanja izhodne raztopine 15 g medu/25 ml.....	25
Preglednica 11. Vrednosti parametra L^* za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	30
Preglednica 12. Vrednosti parametra a^* za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri.....	33
Preglednica 13. Vrednosti parametra b^* za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri.....	34
Preglednica 14. Vrednosti neto absorbance za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	36
Preglednica 15. Vsebnost skupnih fenolov za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	38
Preglednica 16. FRAP vrednosti za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri	44

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Kemijska struktura nekaterih pigmentov prisotnih v medu (Extrasynthese, 2002: 4)..	4
Slika 2. CIE L*, a*, b* barvni prostor (HunterLab color scale, 2006:3)	6
Slika 3. Nastanek radikalov (Ezdravje, 2006: 1).....	10
Slika 4. Mehanizem lovljenja radikalov (Stanojevič, 2003: 1)	12
Slika 5. Mesta vezave kovinskih ionov (Stanojevič, 2003: 1)	12
Slika 6. Strukturna formula 2,2-difenil-pikril-hidrazila (Merck, 2006: 1).....	14
Slika 7. Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000: 28)	17
Slika 8. Barvni odtenki medov letnika 2005 z izmerjenimi L* vrednostmi	31
Slika 9. Primerjava vrednosti parametra L* za med letnikov 2000 in 2001 (Zupančič, 2002) in naše vzorce medu letnika 2005	32
Slika 10. Povprečne vrednosti parametra a* za posamezne vrste medu	34
Slika 11. Vrednosti a* in b* parametrov za posamezne vrste medu.....	35
Slika 12. Povprečne vrednosti neto absorbanco za posamezne vrste medu	36
Slika 13. Zveza med parametrom L* in neto absorbanco v analiziranih vzorcih medu	37
Slika 14. Povprečne vsebnosti skupnih fenolov za posamezne vrste medu s standardnimi odkloni.....	38
Slika 15. Zveza med barvo in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu	39
Slika 16. Zveza med neto absorbanco in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu	40
Slika 17. IC ₅₀ vzorcev cvetličnega medu	41
Slika 18. IC ₅₀ vzorcev kostanjevega medu.....	41
Slika 19. IC ₅₀ vzorcev gozdnega medu	42
Slika 20. IC ₅₀ vzorcev smrekovega medu	42
Slika 21. Povprečne FRAP vrednosti za posamezne vrste medu s standardnimi odkloni	44

Slika 22. Zveza med FRAP vrednostmi in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu.....	45
Slika 23. Zveza med parametrom L* in AA, določeno s FRAP metodo v analiziranih vzorcih medu.....	46
Slika 24. Zveza med neto absorbanco in AA, določeno s FRAP metodo v analiziranih vzorcih medu.....	46
Slika 25. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA petih vzorcev akacijevega medu	47
Slika 26. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev cvetličnega medu...	48
Slika 27. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev kostanjevega medu	49
Slika 28. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev smrekovega medu..	50
Slika 29. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev gozdnega medu.....	51

KAZALO PRILOG

- Priloga A. Povprečne vrednosti L^* , a^* , b^* parametra, neto absorbance, vsebnosti skupnih fenolov ter vrednosti AA merjene po DPPH in FRAP metodi vzorcev petih vrst medu
- Priloga B. Podatki za umeritveno krivuljo določanja vsebnosti skupnih fenolov
- Priloga B1. Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolov (odvisnost absorbance od koncentracije, izražene kot mg galne kisline na kg medu)
- Priloga C. Podatki za umeritveno krivuljo določanja AA po FRAP metodi
- Priloga C1. Umeritvena krivulja za določanje AA po FRAP metodi (odvisnost absorbance od koncentracije Fe(II))
- Priloga D. Rezultati merjenja AA vzorca gozdnega medu G19 po metodi DPPH
- Priloga D1. Odvisnost preostalega DPPH (%) od koncentracije medu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	akacijev med
AA	antioksidativna aktivnost
AAPH	2,2'-azobis (2-amidino propan)
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzo tiazolin-6-sulfonat)
C	cvetlični med
CAE	ekvivalent kavne kisline
CE	ekvivalent katehina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	(ang. Ferric Reducing Antioxidant Power), antioksidativna moč redukcije železa
G	gozdni med
GA	galna kislina
GAE	ekvivalent galne kisline
HPLC	(ang. High Performance Liquid Chromatography), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC ₅₀	koncentracija učinkovitosti
K	kostanjev med
KV	koeficient variabilnosti
L* a* b*	parametri barvnega prostora
LDL	(ang. Low Density Lipoproteins), lipoproteini majhe gostote
ORAC	(ang. Oxygen Radical Absorbance Capacity), kapaciteta absorbance kisikovega radikala
R	koeficient korelacije po Pearsonu
R ²	koeficient določitve
S	smrekov med
SO	standardni odklon
w/v	(ang. weight/volume), masna koncentracija
\bar{x}	povprečna vrednost
x _{max}	največja vrednost
x _{min}	najmanjša vrednost

SLOVARČEK

APOPTOZA

KATARAKTA

REKONVALESCENCA

programirana celična smrt

siva mrena

okrevanje po bolezni

1 UVOD

Med je gosto tekoče ali kristalizirano naravno živilo, ki ga proizvedejo čebele. Nastane iz različnih virov: cvetličnega nektarja ali drugih izločkov rastlinskih delov oziroma iz različnih vrst mane, to je izločkov žuželk, ki živijo na različnih delih rastlin. Osnovni material prinašajo čebele v panj, ga obdelajo, mu dodajo izločke svojih žlez, zgostijo in nato shranjujejo v pokritih celicah satja (Božnar in Senegačnik, 1998).

Številne raziskave potrjujejo, da mnogo rastlin sintetizira fitokemijske sestavine z antioksidativno aktivnostjo, ki veljajo za naravni vir obrambe človeškega organizma pred radikali. Na teh rastlinah čebele nabirajo pašo ter s tem prenesejo bioaktivne komponente tudi v med (Baltrušaitytė in sod., 2007). Znano je, da je antioksidativna aktivnost medu odvisna od botaničnega porekla. Mnogi avtorji so ugotovili, da so temnejši medovi bogatejši z antioksidanti (Frankel in sod. 1998; Gheldof in Engeseth, 2002).

V Sloveniji je poraba medu tipično sezonska, največja je pozno jeseni in pozimi. Prebivalci Slovenije zaužijemo povprečno toliko medu, kolikor ga povprečno pridelamo, to je približno 2000 ton ali približno 1 kg na prebivalca.

V zadnjih letih se v človeški prehrani pojavlja povečana zahteva po naravnih zdravilnih učinkovinah, saj se vedno večja populacija ljudi zaveda škodljivih posledic sintetičnih aditivov, ki lahko negativno vplivajo na splošno počutje in zdravje človeka. Poleg tega so potrošniki vedno bolj osveščeni glede same sestave živil ter različnih dodatkov. Med lahko tretiramo kot dober vir naravnih antioksidantov, ki ima mnogo pozitivnih učinkov tako na organizem kot na obstojnost živila, če ga uporabimo kot alternativno zamenjavo sintetičnega aditiva (Baltrušaitytė in sod., 2007).

1.1 CILJ RAZISKAVE JE BIL:

- instrumentalno določiti barvo medu z Minolta kromometrom (CIE-L* a* b* sistem),
- spektrofotometrično izmeriti intenziteto barve izbranih vzorcev medu,
- določiti vsebnost skupnih polifenolov z modificirano Folin-Ciocalteujevo metodo,
- spektrofotometrično določiti antioksidativno aktivnost različnih vzorcev medu z DPPH metodo, ki temelji na lovljenju radikalov,
- spektrofotometrično določiti skupno antioksidativno aktivnost s FRAP metodo,
- s statistično obdelavo poiskati zveze med obravnavanimi parametri.

1.2. DELOVNE HIPOTEZE:

- predvidevamo razlike v intenziteti barve in v vsebnosti skupnih fenolov med posameznimi vrstami medu,
- pričakujemo razlike v antioksidativni aktivnosti različnih vrst medu, saj je le-ta odvisna od botaničnega porekla medu, svetlejši medovi naj bi imeli nižji antioksidativni potencial,
- pričakujemo, da bomo z uporabo različnih metod dobili primerljive vrednosti za antioksidativno učinkovitost,
- predvidevamo, da bodo korelacije med intenziteto barve, antioksidativno aktivnostjo medu in vsebnostjo skupnih fenolov statistično značilne.

2 PREGLED OBJAV

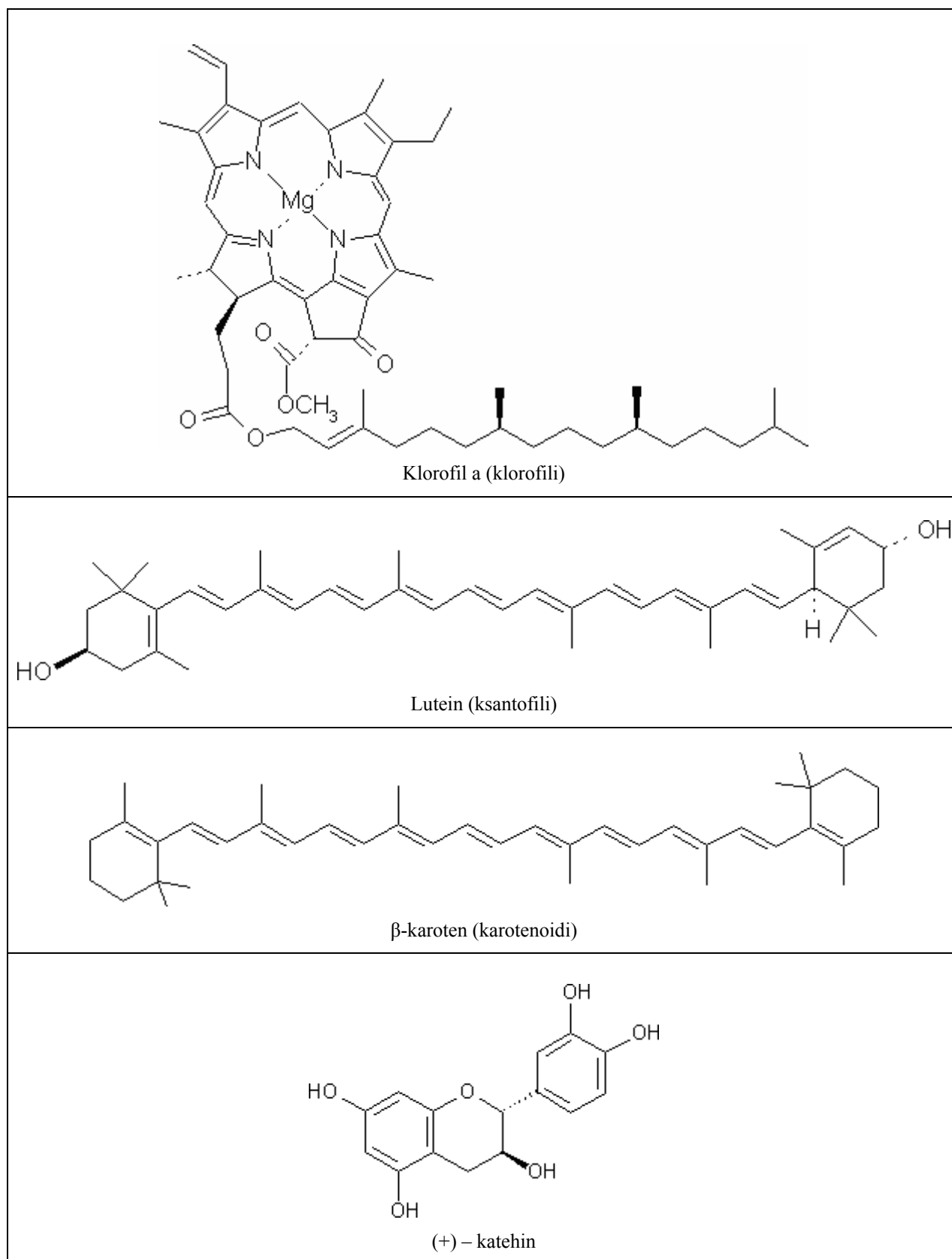
2.1 SESTAVA MEDU

Med ima določene prednosti pred drugimi živili predvsem zaradi svoje lahke in hitre prebavljivosti. Večinoma ga sestavljajo sladkorji (70 - 80 %), predvsem sadni sladkor (fruktoza) in grozdni sladkor (glukoza), nekaj pa je tudi sestavljenih sladkorjev (saharoza, maltoza in drugi). Fruktosa predstavlja precejšen vir energije in je slajša od glukoze in saharoze. Med drugimi sestavinami so pomembni minerali, in sicer kalij, sledijo fosfor, kalcij, natrij, magnezij in drugi (Aparna in Rajalakshmi, 1999).

V medu so v manjših količinah prisotni nekateri vitamini, kot so B₁, B₂, B₆, C, pantotenska, nikotinska in folna kislina ter biotin. Pomembni so tudi encimi, ki sodelujejo pri presnovi npr. invertaza, katalaza, glukoza-oksidadza in fosfataza. Poleg tega med vsebuje še protibakterijske snovi in gradbene elemente celic (aminokislina). Na okus in vonj medu vpliva večja ali manjša prisotnost raznih kislin in aromatičnih snovi (Božnar, 2002).

2.2 BARVA MEDU

Barva medu je zelo raznolika in variira glede na botanično poreklo, od skoraj brezbarvne in blede rumene do temno rjave barve. Odvisna je tudi od vrednosti pH, vsebnosti pepela in prisotnih pigmentov, ki dajejo medu značilno barvo in vplivajo na njeno intenzivnost. To so predvsem klorofil, ksantofil, karotenoidi in tanini ter antocianini, levkoantociani in katehini, prisotni v majhnih količinah. V temnih medovih pa se pojavlja tudi pigment melanin (slika 1) (Baltrušaitytė in sod, 2007; Piotraszewska-Pająk in Ciszak, 2001).



Slika 1. Kemijska struktura nekaterih pigmentov prisotnih v medu (Extrasynthese, 2002: 4)

Aparna in Rajalakshmi (1999) navajata, da vsebujejo temnejši medovi več mineralov od svetlejših, ter da je med z večjo vsebnostjo žvepla in klora temnejše barve. Poleg tega je španska raziskava (González-Miret in sod., 2005) tudi pokazala povezavo med barvo in vsebnostjo mineralov v medu. Barva temnejših medov je močno povezana s koncentracijo arzena, kadmija, železa, žvepla, svinca in kalcija. Večja je vsebnost mineralov v medu, močnejši in izrazitejši okus ima.

Barva je odvisna tudi od nečistoč, ki so prisotne v nektarju in od agregatnega stanja medu oziroma od stopnje kristalizacije. Nastanek in rast kristalov je naraven pojav, ki se običajno zgodi v večini medov. Med je prenasičena raztopina glukoze, ki se pri temperaturah, nižjih kot so bile v panju, v določenih okoliščinah začne izločati. Kristalizacija medu ne povzroča nobenih kemijskih sprememb. Zaradi prisotnih kristalov pride le do spremembe barve, kristaliziran med je nekoliko svetlejši. Včasih je med podvržen toplotni obdelavi iz dveh razlogov. Prvi je preprečiti oziroma zmanjšati pojav kristalizacije, drugi pa je uničenje morebitno prisotnih patogenih mikroorganizmov v medu.

Segrevanje medu navadno poteka nekaj dni pri temperaturi 45 – 50 °C ali v vroči vodni kopeli. Ena izmed posledic segrevanja je nastanek neencimskega porjavenja, tako imenovana Maillardova reakcija, pri kateri sladkorji kondenzirajo s prostimi aminokislinami. Rezultat reakcije je nastanek rjavih pigmentov, ki prispevajo k antioksidativni aktivnosti. Med toplotno obdelavo pa lahko pride do izgube naravno prisotnih antioksidantov, kar lahko kompenziramo z nastankom produktov Maillardove reakcije (Turkmen in sod., 2005).

Mnogo avtorjev je iskalo povezave med barvo medu in botaničnim poreklom, industrijsko predelavo, temperaturo in časom skladiščenja. Tako je znano, da med skladiščenjem postaja med temnejši. Vzrok spremembe barve medu so produkti Maillardove reakcije, karamelizacija fruktoze ter reakcije polifenolov. Med drugim tudi sama sestava medu (vsebnost glukoze, fruktoze, prostih aminokislin in vode) in njegova začetna barva vpliva na stopnjo potemnitve. Opravljena je bila raziskava, kjer so vzorce medu hranili 90 dni pri temperaturi 37 °C. Rezultati kažejo, da se potemnitev medu linearno veča s časom skladiščenja (Pereyra Gonzales in sod., 1999). Vpliv na barvo medu imajo tudi naravno prisotna pelodna zrna, predvsem njihova barva in morfologija. Ugotovljeno je, da rumena pelodna zrna dajejo svetlejšo barvo medu, medtem ko rjava barva pelodnih zrn prispeva k temnejši barvi medu (Terrab in sod., 2004). Frankel in sod. (1998) so ugotovili, da imajo temnejše vrste medu večjo antioksidativno učinkovitost.

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

Barvne karakteristike posameznih vrst slovenskega medu so podane v preglednici 1. Akacijev, kostanjev, smrekov, hojev in lipov med predstavljajo sortne medove, ostali so mešani.

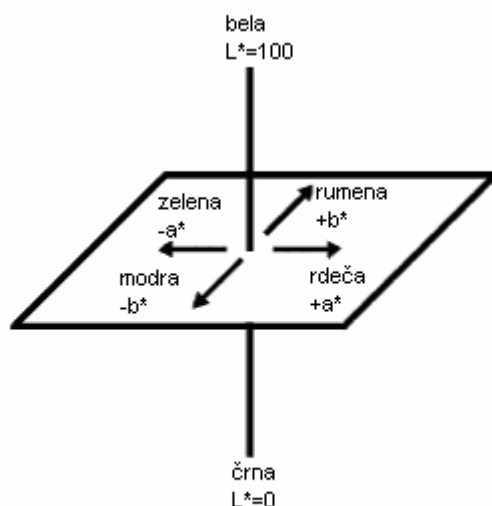
Preglednica 1. Barvne karakteristike različnih vrst slovenskega medu (Golob in sod., 2002)

VRSTA MEDU	BARVA
akacijev	skoraj brezbarvna, svetlo rumena
kostanjev	jantarna, temna z rdečkastim ali zelenkastim odtenkom
smrekov	sijoča, srednje do temno jantarna z rdečim odtenkom
hojev	sivo-rjava s temno zelenim odtenkom
lipov	kremno bela z rumenim ali zelenim odtenkom
cvetlični	odvisno od rastline, od rumene do rjave,
gozdni	svetlo do temno rjava, lahko z rdečkastim ali zelenim odtenkom
škržatov	temno rjava do skoraj črna

Določanje barve medu je eno izmed pomembnih kriterijev klasifikacije medu. Merjenje barve lahko vrednotimo tako subjektivno s senzorično analizo, kot objektivno s pomočjo instrumentalnih metod (Terrab in sod., 2004).

2.2.1 Merjenje barve medu s kromometrom Minolta

Kromometer Minolta v CIE L^* , a^* , b^* sistemu je splošno znan sistem za merjenje barve živil. Barvo določamo s pomočjo L^* , a^* in b^* parametrov. L^* parameter določa svetlost; večja kot je njegova vrednost, svetlejša je živilo. Parameter a^* določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju (rdeča barva je odvisna od prisotnosti flavonoidov in antocianinov) in zelene barve v negativnem območju (zelena barva je povezana s prisotnostjo pigmenta klorofila). Parameter b^* pa predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju (rumena barva povezana s prisotnostjo karotenoidov, ki izvirajo iz nektarja rastlin) in modre v negativnem. Minolta kromometer razdeli barvo vzorca na tri dele in jo prikaže s točko v tridimenzionalnem prostoru (Piotraszewska - Pajak in Ciszak, 2001).



Slika 2. CIE L^* , a^* , b^* barvni prostor (HunterLab color scale, 2006:3)

Delovanje kromometra Minolta CR-200B

Sistem CIE L^* , a^* , b^* s kromometrom Minolta CR-200B ima priključen računalnik DATA DP 100 in CIE 1976- L^* , a^* , b^* sistem. Sestavljata ga merilna glava in mikroprocesorska podatkovna enota. V merilni glavi ksenonova pulzirajoča svetilka daje svetlobo, ki je sestavljena iz enakih delov rdeče, modre in zelene barve. Snop svetlobe pada pod kotom 45° na vzorec. Svetloba enake valovne dolžine, kot je valovna dolžina barv vzorca, se od vzorca odbije in pod kotom 180° pada na optično fotosprejemno ploščo. Ta plošča vsebuje tri spektralne filtre X, Y, Z. Za to ploščo pa so trije foto sprejemniki ali senzorji. Vrednost izmerjenega signala iz merilne glave se zatem ojača in digitalizira. Računalnik nam poda rezultat v L^* , a^* in b^* koordinatah, ki so v direktni odvisnosti od vrednosti X, Y in Z. Pred merjenjem je potrebno kromometer umeriti na beli standard ($Y_n=93,8$, $x_n=0,3134$, $y_n=0,3208$) (Brücker, 1984; Gonzáles-Miret in sod., 1999).

Povezava med vrednostmi L^* , a^* , b^* parametrov in vrednostmi X, Y in Z:

$$L^* = 116 (Y/Y_n) - 16 \qquad b^* = 200 ((Y/Y_n) - (Z/Z_n))^{1/3}$$

$$a^* = 50 ((X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3})$$

V preglednici 2 so podane vrednosti merjenja L^* , a^* , b^* parametrov barve tujih in slovenskih vrst medu. Le-te smo nadalje v rezultatih primerjali in komentirali z opravljenimi analizami slovenskega medu letnika 2005.

Preglednica 2. Parametri barve (L^* , a^* in b^*) različnih vrst medu, kot jih navajajo tuji (Gonzáles-Miret in sod., 2005; Terrab in sod., 2002; Piotraszewska-Pajak in Cizak, 2005; Lazaridou in sod., 2004) in slovenski (Zupančič, 2002) avtorji

		AJDOV	AKACIJEV	CVETLIČNI	EVKALIPTUSOV	GOZDNI	HOJEV	KOSTANJEV	LIPOV	RESOV	SMREKOV
ŠPANIJA (Gonzáles-Miret in sod., 2005)	L			60,75		41,52		39,40		38,55	
	a^*			25,09		21,15		23,76		17,60	
	b^*			51,92		22,12		20,38		16,22	
MAROKO (Terrab in sod., 2002)	L			21,95	19,74					15,33	
	a^*			12,56	11,81					1,92	
	b^*			8,65	6,38					0,37	
POLJSKA (Piotraszewska- Pajak in.,2005)	L	51,28	53,10	60,15					64,27	49,62	
	a^*	6,32	-2,71	-2,40					-3,56	2,38	
	b^*	26,62	9,32	22,89					19,12	25,19	
GRČIJA (Lazaridou in sod., 2004)	L			39,35			41,18				42,94
	a^*			24,02			17,55				15,30
	b^*			38,64			39,99				37,66
SLOVENIJA (Zupančič, 2002)	L		61,26	44,97		40,57		40,99			41,15
	a^*		-2,83	4,31		8,70		8,50			8,71
	b^*		25,51	33,79		30,32		29,59			30,59

2.2.2 Spektrofotometrično določanje barve medu

Barvo vodnih raztopin medu se lahko meri spektrofotometrično pri določenih valovnih dolžinah. Berreta in sod (2005) so 50 % (w/v) vodno raztopino medu filtrirali, izmerili absorbanco pri dveh valovnih dolžinah, 450 in 720 nm, ter izračunali razliko absorbanc. Taormina in sod. (2001) so za spektrofotometrično določanje barve pripravili 10 % raztopino v 0,25 M KH_2PO_4 in jo merili pri valovni dolžini 593 nm. Lazaridou in sod. (2004) so 20 % (w/v) vodno raztopino medu predhodno eno uro segrevali pri 50 °C, filtrirali in merili absorbanco pri 420 nm. Nekateri avtorji vrednosti izmerjenih absorbanc pomnožijo s 1000.

Vsak spektrofotometer je sestavljen iz naslednjih osnovnih delov:

- svetlobni izvor
- monokromator
- celica (kiveta) za vzorce in slepi vzorec
- detektor.

Svetlobni izvor pošilja svetlobo skozi ozko režo v monokromator. Svetlobni žarek pade na konkavno lečo, ki da paralelni svetlobni snop. Ta pade na kvarčno prizmo, kjer svetloba razpade na spekter, ki ga druga konkavna leča fokusira na ozko režo. Valovno dolžino lahko izbiramo z vrtenjem prizme ali rešetke.

Celice (kivete) morajo biti na splošno v obliki in konstrukciji enostavne, konstantne debeline in površine, na katere pada svetloba. Biti morajo gladke in iz materiala, ki je inerten do merjenih raztopin. Prepuščati morajo svetlobo vseh valovnih dolžin v merjenem območju.

Detektor pa je instrument, ki meri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec in lahko pretvori svetlobno energijo v električni signal.

Rokovanje s spektrofotometri je enostavno in posamezne operacije merjenja so splošne. Ločimo slepi in testni vzorec. Slepni se razlikuje od testnega po tem, da ne vsebuje merjene komponente. S slepimi in testnimi vzorci napolnimo kivete in pričnemo z merjenjem. Predhodno izberemo ustrezno valovno dolžino in spektrofotometer nastavimo na nič. Kiveto s slepim vzorcem vstavimo na svetlobno pot monokromatske svetlobe in tako slepi vzorec nastavimo na 100 % transmisijo (propustnost). Zatem celico s slepim vzorcem zamenjamo s testnim ter odčitamo absorbanco na monitorju spektrofotometra (Dobčnik, 2000).

2.2.3 Merjenje barve medov po Pfund-u

Instrument Pfundove barvne lestvice omogoča merjenje celotnega barvnega območja različnim vrstam medu. Gre za primerjavo med režo jantarnega stekla in posebno oblikovano režo, kjer se nahaja vodna raztopina medu. Intenzivnost barve medu je izražena kot razdalja (mm) vzdolž jantarnega stekla in ponavadi obsega vrednosti med 1,0 in 140,0 mm.

Metoda po Pfundu je preprosta in poceni. Slabost je ta, da so izmerjene vrednosti odvisne od izbire instrumentov, ker le-ti obstajajo v različnih izvedbah (Terrab in sod., 2002, Properties of honey, 2006).

Preglednica 3. Ameriški standardi institucije United states Department of Agriculture za določanje barve medu (United States Standards..., 1985)

BARVA MEDU	BARVNA LESTVICA PO PFUNDU (mm Pfunda)
vodeno bela barva	<8
izrazito bela barva	9-17
bela barva	18-34
barva izrazito svetlega jantarja	35-50
barva svetlega jantarja	51-85
barva jantarja	86-114
barva temnega jantarja	>114

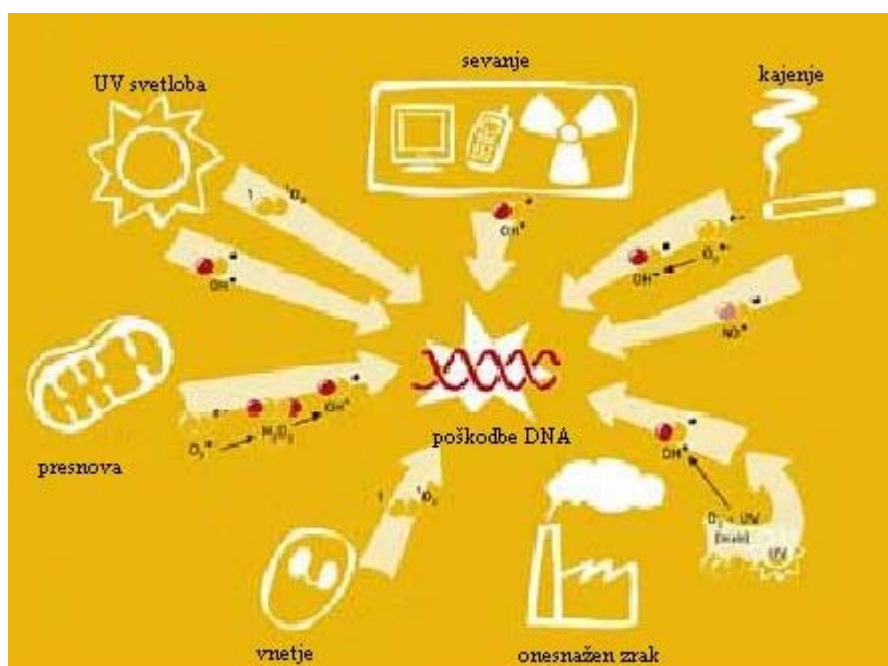
Preglednica 4 prikazuje vrednosti merjenja barve različnih vrst evropskega medu. Po Pfundovi barvni lestvici ima akacijev med najnižjo vrednost 12,9 mm Pfunda in je hkrati najsvetlejši. Sledijo lipov, cvetlični ter gozdni med. Najtemnejši je kostanjev med z vrednostjo 87,9 mm Pfunda.

Preglednica 4. Vrednosti merjenja barve različnih vrst evropskega medu po Pfundu (Persano Oddo in sod., 2004)

VRSTA MEDU	BARVA MEDU (mm Pfunda)
akacijev	12,9
cvetlični	54,2
gozdni	86,0
kostanjev	87,9
lipov	33,3

2.3 RADIKALI

Radikali so nestabilne in zelo reaktivne oblike spojin, ki vključujejo enega ali več neparnih elektronov. V celici nastajajo v normalnih celičnih metaboličnih procesih ali pri izpostavitvi zunanjim virom oksidacije, kot so npr. cigaretni dim, različni polutanti - organska topila, pesticidi in UV svetloba. Veliko molekularnega kisika, ki se porablja med aerobnim intracelularnim metabolizmom, celice reducirajo do H_2O . Ta redukcija poteka v mitohondriju, kjer citokrom-oksidaža prenaša štiri elektrone kisika, kar vodi v nastanek H_2O . Nekaj tega kisika (2-3 %) pa uide in potem lahko nastanejo reaktivne kisikove spojine (Gamaley in Klysubin, 1999).



Slika 3. Nastanek radikalov (Ezdravje, 2006: 1)

2.3.1 Vrste in učinki radikalov

Najpomembnejši kisikovi radikali so hidrosilni ($HO\cdot$), hidroperoksilni ($HOO\cdot$), hiperoksidni ($O_2^{\cdot-}$), alkoksilni ($RO\cdot$), alkilperoksilni ($ROO\cdot$), fenoksilni ($ArO\cdot$) ali še drugi radikali (Abram, 2000). Njihova značilnost je, da izredno hitro reagirajo z drugimi spojinami, in sicer tako, da poskušajo odvzeti elektron, ki je potreben za stabilnost. Ko določeni spojini, ki ni radikal, odvzamejo elektron, ta sama postane radikal, kar sproži verižno reakcijo (Kaur in Kapoor, 2001).

Reaktivne kisikove spojine ali radikali povzročajo različne poškodbe na nivoju celice. Presežek radikalov lahko uniči vrsto zaščitnih encimov (superoksid-dismutaza, katalaza in peroksidaza), kar vodi do oksidacije lipidov celičnih membran, celičnih proteinov, DNA in encimov (preglednica 5). Celično dihanje je s tem onemogočeno, kar privede do apoptoze (Antolovich in sod., 2002).

Preglednica 5. Mesta delovanja in učinki radikalov (Korošec, 2000)

MESTO	UČINEK
lipidi	peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena propustnost membran
proteini	oksidacija -SH skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (α_1 . antitripsina)
DNK	cepljenje verige, povečana poraba NAD^+ , motena sinteza ATP

Kisikovi radikali so udeleženi pri številnih normalnih in patoloških procesih v telesu. Pomembna je njihova vloga pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, kardiovaskularnih boleznih, aterosklerozi, sladkorni bolezni, zmanjšani imunski odzivnosti, katarakti, bolezni jeter in ledvic, Alzheimerjevi, Parkinsonovi in Chronovi bolezni. Te bolezni so pogosto povezane s pomanjkanjem naravnih antioksidantov (vitaminov A, C, E, β -karotena, flavonoidov, itd.), aminokislin (cistina, cisteina), glutationa ter elementov v sledovih (Se, Zn, Mn, Cu) (Korošec, 2000).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so po definiciji snovi, ki imajo sposobnost, da že v majhnih koncentracijah preprečujejo ali zavirajo neželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih, torej v živilih in živih organizmih (Antolovich in sod., 2002).

2.4.1 Delitev antioksidantov

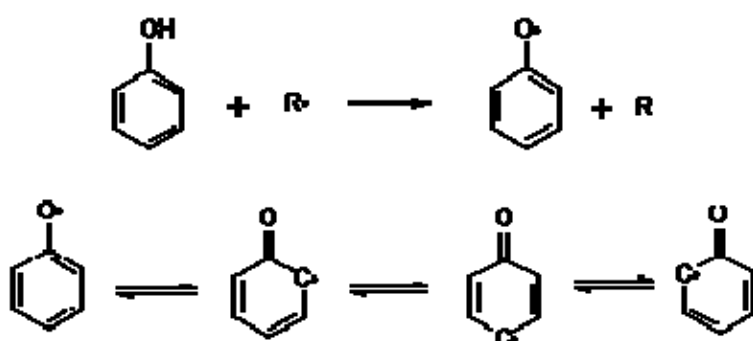
Antioksidante lahko delimo v več skupin (Gutteridge in Halliwell, 1994): primarne, sekundarne in terciarne.

Primarni antioksidanti preprečujejo tvorbo radikalov, so prisotni v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi. To so predvsem encimi (superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza), ki so v celicah. Sekundarni antioksidanti »nevtralizirajo« novonastale radikale in preprečujejo, da bi le-ti vstopali v verižne reakcije in tvorili nove radikale. Sem spadajo vitamini C in E, karoten, albumini, polifenoli, nekateri flavoni in flavonoidi. Terciarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo radikali v strukturi celice (encimi, ki »popravljajo« poškodbe DNA, npr. metionin sulfoksid reduktaza).

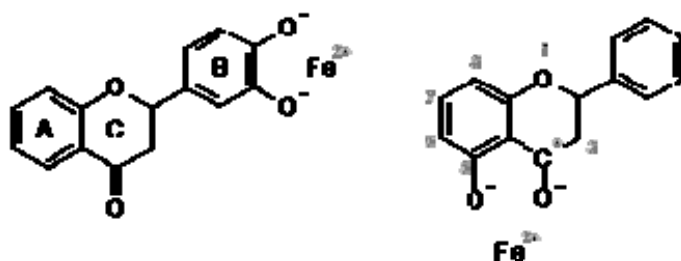
Antioksidante lahko razdelimo tudi glede na njihovo topnost. Ločimo vodotopne (askorbinska kislina – vitamin C, glutation, flavonoidi – katehini, resveratrol, antociani) in v maščobah topne antioksidante (ubikinon – koencim Q₁₀, tokoferoli – vitamin E, karotenidi – vitamin A, likopen, lutein, zeaksantin, kurkumin), ki delujejo intra- in ekstracelularno (Korošec, 2000). Poznana je tudi delitev na encimske in neencimske antioksidante (Abram, 2000).

2.4.2 Oksidativni stres

Porušeno ravnotežje med radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000).



Slika 4. Mehanizem lovljenja radikalov (Stanojevič, 2003: 1)



Slika 5. Mesta vezave kovinskih ionov (Stanojevič, 2003: 1)

Naravni in sintetični antioksidanti imajo pomembno vlogo pri preprečevanju kvarjenja živil. Predvsem zmanjšujejo in preprečujejo nastanek žarkosti in diskoloracij. Te, največkrat neželene spremembe, se pojavijo zaradi oksidacije, ki jo povzročajo toplota, svetloba in prisotnost nekaterih kovin (Meda in sod., 2004).

2.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Učinek antioksidantov je odvisen od strukture antioksidanta, oksidacijskih pogojev in od lastnosti oksidirajoče snovi. Zmožnost določene komponente, da inhibira oksidacijske procese npr. lipidno peroksidacijo, je definirana kot antioksidativna aktivnost (AA). Fenolne spojine so največja skupina antioksidantov, zastopana v živilih. V rastlinskih oljih in maščobah so predvsem pomembni monofenoli (tokoferoli – vitamin E). Vodotopni

polifenoli pa se pojavljajo predvsem v sadju, zelenjavi, čaju, kavi in vinu (Roginsky in Lissi, 2004).

AA polifenolov je povezana s številnimi mehanizmi. Najosnovnejši med njimi je reaktivnost polifenolov do radikalov. Razlikovati moramo med antioksidativno kapacitivnostjo in reaktivnostjo. Prva nam podaja informacijo o trajanju antioksidativnega delovanja antioksidanta, druga pa karakterizira začetno dinamiko učinkovanja v povezavi s koncentracijo antioksidanta oz. mešanico antioksidantov (Roginsky in Lissi, 2004).

Za določanje in primerjavo AA v živilih lahko uporabljamo vrsto različnih metod. Na voljo so relativno enostavne spektroskopske metode, s katerimi določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov v sistemih s kovinskimi ioni ali sintetičnimi radikali, metode s katerimi določamo vpliv antioksidantov na stabilnost realnih vzorcev, kot so proteini ali lipidi, ter metode kot je elektronska spinska resonanca, kjer lahko dejansko izmerimo vsebnost radikalov v določenem sistemu (Antolovich in sod., 2001).

Kompleksni oksidacijski procesi, ki potekajo v različnih sistemih, zahtevajo uporabo večih metod določanja AA, ker na podlagi ene same metode, dobljenih rezultatov ne moremo točno interpretirati in jih dokončno potrditi. Za določanje AA se poslužujemo direktnih (ORAC metoda, določanje AA z β -karotenom) in indirektnih (ABTS, DPPH, FRAP) metod. Podatki pridobljeni s pomočjo direktnih in indirektnih metod so bolj zanesljivi, če se med seboj primerjajo (Roginsky in Lissi, 2004).

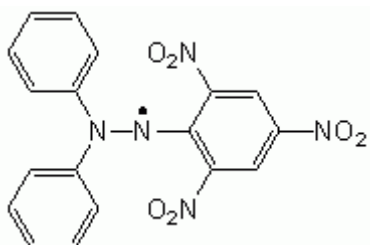
Direktne metode raziskujejo učinke antioksidantov prisotnih v testiranih živilih na oksidativno razgradnjo substratov (lipidi, olja, proteini, DNA, krvna plazma, LDL, biološke membrane, micelle, liposomi, ipd.). Indirektne metode pa proučujejo predvsem učinke prisotnosti elementov v sledovih ter antioksidativno zmožnost lovljenja radikalov, ki pa niso vedno v povezavi z oksidativno razgradnjo. Primer indirektnega določanja je uporaba obarvanih radikalov, kjer določamo sposobnost antioksidanta da odda vodikov atom in ne direktno AA, čeprav sta ti dve lastnosti včasih neposredno povezani (Roginsky in Lissi, 2004).

Antioksidativno aktivnost določamo glede na učinek antioksidanta in s kontroliranjem posameznih stopenj oksidacije. Metode določanja antioksidativne aktivnosti se med seboj močno razlikujejo. Nekatere imajo za posledico izrazit nastanek stopenj oksidacije, ki sledijo po že opravljenih meritvah. V drugih primerih pa ne najdemo nobene jasne razlike med posameznimi stopnjami in samim potekom procesa oksidacije. Značilnost oksidacije je t.i. substrat ali podlaga, ki zajema oksidante, iniciacijske faktorje, intermediate in končne produkte, katere merimo. Te meritve lahko uporabimo za oceno antioksidativne aktivnosti. Pri proučevanju antioksidativne aktivnosti je potrebno upoštevati tudi sam izvor kisikovih radikalov (Antolovich in sod., 2002).

2.5.1 DPPH metoda

Metoda z radikalom DPPH[•] je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Temelji na reakciji med stabilnim radikalom DPPH[•] in donorji vodika (npr. fenolne spojine). Sam mehanizem reakcije pa je odvisen od konformacije antioksidanta. Nekateri od njih z radikalom reagirajo zelo hitro. Število razpoložljivih hidroksilnih skupin DPPH[•] radikala je enako zmanjšanju števila teh DPPH[•] molekul (Bondet in sod., 1997).

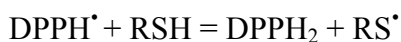
DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ima sposobnost delokalizacije prostega elektrona okoli celotne molekule. S tem je onemogočen nastanek dimer ali dimerizacije, kar pa ne velja za večino radikalov. Delokalizacija je odgovorna tudi za intenzivnost vijolične barve. DPPH[•] ima velik molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom pri 517 nm, kar pomeni, da lahko koncentracijo radikala DPPH[•] določamo spektrofotometrično.



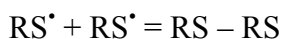
Slika 6. Strukturna formula 2,2-difenil-pikril-hidrazil (Merck, 2006: 1)

Antioksidativno učinkovitost z radikalom DPPH[•] lahko določamo na dva načina, dinamično ali statično. Pri dinamični metodi merimo hitrost razpada DPPH[•] po dodatku antioksidanta. Pri statični metodi pa določamo ravnotežno stanje, ko vsi prisotni antioksidanti reagirajo z radikalom. S prvo metodo torej proučujemo reaktivnost antioksidantov, z drugo pa stehiometrični odnos med antioksidanti in DPPH[•] (Bondet in sod., 1997).

Če molekula DPPH[•] reagira samo z 1 molekulo antioksidanta, potem je stehiometrično razmerje reakcije 1:1. V naslednjih enačbah je prikazan primer reakcije cisteina (RSH) z DPPH[•].

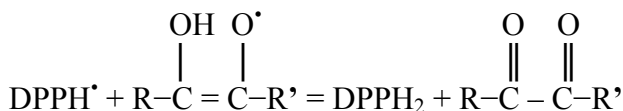
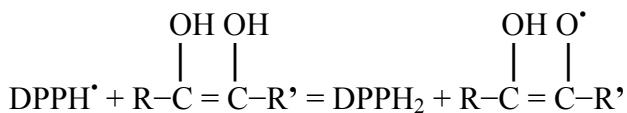


Radikal RS[•] reagira s še eno sebi enako molekulo, ki nastane z vzporedno reakcijo.



Torej sta za redukcijo dveh radikalov DPPH[•] potrebni dve molekuli cisteina.

V primeru, da ima molekula, ki reagira z radikalom, dve vezni mesti (npr. askorbinska kislina) je teoretično razmerje med DPPH[•] in antioksidantom 2:1. Primer reakcije prikazujeta naslednji enačbi:



Iz zgornjih enačb je razvidno, da je za redukcijo dveh molekul DPPH[•] teoretično potrebna ena molekula askorbinske kisline. Stehiometrija ≈ 2:1 velja tudi za α-tokoferole in nekatere druge spojine.

Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 μM, zato da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Delovna valovna dolžina je v literaturi podana različno, med 515 in 520 nm. Reakcijski čas metode je običajno 30 min, vendar so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši čas.

Eden izmed parametrov razlage rezultatov DPPH metode je tako imenovana koncentracija učinkovitosti, pogosto pisana kot IC₅₀. Koncentracija učinkovitosti je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za 50 % redukcijo radikala DPPH[•] oz. podaja koncentracijo substrata, ki vodi do 50 % zmanjšanja DPPH[•] in se kaže kot izguba intenzivnosti barve. Čeprav se ta način podajanja rezultatov pogostokrat pojavlja v literaturi, ima več pomanjkljivosti. Morda je največja ta, da avtorji pogostokrat ne podajo koncentracije radikala DPPH[•] v testirani raztopini, kar onemogoča direktno določanje AA in primerjavo z deli drugih avtorjev. Manjša pomanjkljivost je tudi ta, da se z večanjem AA zmanjšuje vrednost IC₅₀, kar je predvsem nerodno pri grafičnem predstavljanju rezultatov. Avtorji se temu izognejo s podajanjem rezultatov v obliki 1/IC₅₀ (Molyneux, 2004).

2.5.2 FRAP metoda

Antioksidativno moč redukcije železa, t.i. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metodo sta leta 1996 prvič opisala Benzie in Strain in jo 1999 leta še dodatno modificirala. Gre za ponovljivo, preprosto, hitro, poceni in avtomatizirano metodo, ki temelji na redukciji železa iz feri v fero obliko v prisotnosti antioksidanta, kjer se pri nizki vrednosti pH razvije intenzivno modro obarvan kompleks fero tripiridiltriazin, ki ima absorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija je nespecifična. Pomanjkljivost metode je, da ne moremo meriti tiolov, katerih redukcijski potencial je navadno nižji od Fe³⁺/Fe²⁺ polovične reakcije. Vsebnost tiolov v medu je minimalna in prispevek k celotni AA vzorca je tako zanemarljiv (Benzie in Strain, 1996, Beretta in sod., 2005).

2.5.3 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda

Pri metodi določanja kapacitete absorbance kisikovega radikala (ORAC) se uporablja fluorescentni merker β -fikoeritrin kot tarča, na katero delujejo peroksilni radikali, ki jih dobimo iz AAPH (2,2'-azobis(2-amidino propan) dihidroklorid). β -fikoeritrin dodamo preiskovanemu oziroma standardnemu vzorcu. Po dodatku AAPH se fikoeritrin oksidira in posledično fluorescira. Fluorescenco merimo vsaki 2 min pri valovni dolžini 540 nm vstopne svetlobe in 565 nm emitirane svetlobe. Vsi reagenti so pripravljene v nevtralnem mediju (fosfatni pufer). Trolox reagent služi kot standard. Vrednosti ORAC metode se zato izražajo v $\mu\text{mol Trolox/g}$ (Vidrih in Kač, 2000, Beretta in sod., 2005).

2.5.4 ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metoda

Metoda z reagentom ABTS^{•+} je danes med najbolj razširjenimi metodami za indirektno določanje AA. ABTS^{•+} postane ob dodatku donorjev vodika (npr. fenolne spojine) nestabilen, kar vodi do brezbarvne oblike reagenta. ABTS^{•+} močno absorbira pri valovni dolžini med 600 in 750 nm in se ga lahko enostavno spektrofotometrično določi. Možna sta dva pristopa k tej metodi. Prva je spremljanje zaviralnega vpliva antioksidantov na tvorbo radikala ABTS^{•+} v prisotnosti različnih reagentov (Roginsky in Lissi, 2004). Druga možnost pa je proučevanje vpliva dodanih antioksidantov na redukcijo predhodno pripravljenega radikala ABTS^{•+} (Antolovich in sod., 2002). Prednost metode ABTS^{•+} je predvsem njena preprosta uporaba in možnost za rutinsko uporabo v vsakem laboratoriju. Slabost metode je, da dejansko podaja sposobnost spojin za reakcijo z ABTS^{•+} in ne AA (Roginsky in Lissi, 2004).

2.5.5 Določanje AA z β -karotenom

Metoda temelji na antioksidativnih sposobnosti sestavin vzorcev za zmanjševanje oksidacije β -karotena. Meri manjšanje intenzitete barve β -karotena v emulziji β -karotena in linolne kisline v prisotnosti antioksidanta. Slabost metode je ta, da je rezultat izmerjene vrednosti AA podan samo v odstotkih inhibicije (Roginsky in Lissi, 2004).

2.6 ANTIOKSIDANTI V MEDU

2.6.1 Izvor antioksidantov v medu

Kemijska sestava medu je zelo raznolika in je odvisna od same vrste rastlin, saj so le te vir nektarja in mane pašnih čebel, geoklimatskih dejavnikov, kjer rastline uspevajo ter samega postopka pridobivanja medu.

Glavni obrambni mehanizem rastlin predstavljajo t.i. sekundarni metaboliti, ki so rastlini koristni, ne pa nujno potrebni. Rastlino varujejo pred negativnimi okoljskimi dejavniki ter hkrati tudi ščitijo pred napadi virusov, bakterij, gliv in rastlinojedimi živalmi. Med drugim privabljajo tudi opraševalce, koordinirajo delovanje rastlinskih hormonov, imajo

inhibitorno delovanje na nekatere encime in so tudi rastlinska barvila. Te spojine dajejo rastlinam sladek, grenak ali trpek okus. Sinteza sekundarnih metabolitov v rastlinah poteka pod vplivom UV žarkov in je tudi genetsko uravnavana (Logar, 2002).

Na teh rastlinah čebele nabirajo pašo ter s tem prenesejo bioaktivne komponente v sam med. Ugotovljenih je bilo od 4000 do 6000 potencialno antioksidativnih učinkovin, sintetiziranih kot rastlinski sekundarni metaboliti. V največji meri jih zastopajo flavonoidi in druge polifenolne snovi (Küçük in sod., 2007). Med je tako bogat in naravni vir antioksidantov. Med njimi so najbolj pomembne fenolne kisline, flavonoidi (flavanoni, flavoni in flavonoli), določeni encimi (glukoza-oksidaža, katalaza, peroksidaža), askorbinska kislina, α -tokoferoli, produkti Maillardove reakcije, aminokislina (prolin) in proteini. Nekatere študije opravljene na evropskih medovih so pokazale veliko fenolnih komponent, med njimi tudi benzojsko in cimnetno kislino in njihove estre ter aglikone flavonoidov (Aljadi in Kamaruddin, 2004; Gheldof in sod., 2002).

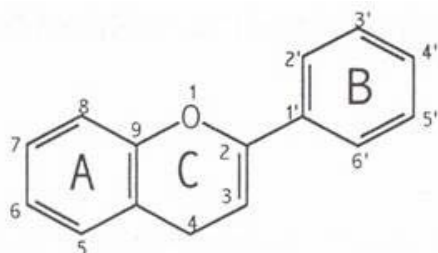
2.6.2 Vrste antioksidantov v medu

Med vsebuje fenolne in nefenolne komponente z antioksidativnim potencialom, ki so podane v preglednici 6:

Preglednica 6. Vrste fenolnih in nefenolnih spojin v medu (Al-Mamary in sod., 2002; Gheldof in sod., 2002; Tomás-Barberán in sod., 2001)

FENOLNE SPOJINE		NEFENOLNE SPOJINE
FENOLNE KISLINE	FLAVONOIDI	
cimetna kislina	pinobanksin	proteini glukonska kislina askorbinska kislina vodikov peroksid hidroksimetilfurfural (HMF) produkti Maillardove reakcije
kavna kislina	pinocembrin	
<i>p</i> -kumarna kislina	galangin	
ferulna kislina	apigenin	
galna kislina	kvercetin	
elaginska kislina	kamferol	
vanilinska kislina	luteolin	
abscizinska kislina	krizin	
benzojska kislina	tektokrizin	

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj 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).



Slika 7. Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000: 28)

Zaradi svoje strukture so polifenoli učinkoviti lovilci prostih radikalov in imajo zmožnost redukcije in vezave železovih ionov, ki katalizirajo lipidno peroksidacijo. Fenolnim spojinam določene študije pripisujejo mnogo močnejši antioksidativni učinek kot ga imata vitamin C in E (Aljadi in Kamaruddin, 2002). Flavonoidi predstavljajo široko paleto fenolnih pigmentov rastlin. V medovih so prisotni kot flavanoni, flavonoli in flavoni.

Vsebnost flavonoidov v cvetnem prahu je 0,5 g/100 g, v propolisu 10 g/100 g, v samem medu je flavonoidov bistveno manj, okoli 6000 µg/kg medu (Anklam, 1998).

Tomás-Barberán in sod. (2001) so s pomočjo HPLC metode analizirali flavonoide v različnih vrstah evropskega medu (kostanj, oljna repica, evkaliptus, citrus, akacija, resa, sivka, lipa, rožmarin in sončnica) in prišli do ugotovitve, da določen flavonoid lahko nakazuje botanično poreklo. Nekatere vrste medu imajo namreč markerje – flavonoide, ki so značilni samo za posamezno vrsto. Za med iz citrusov je npr. značilen flavonoid hesperetin, za rožmarinov med flavonoid kamferol, za med iz sončnic flavonoid kvercetin, za resov med abscizinska kislina (preglednica 7). Za nekatere medove, npr. sivkin in akacijev med pa je značilno, da nimajo specifičnih markerjev oziroma imajo določene nedefinirane komponente, ki jih zaradi pomanjkanja standardov ni možno opredeliti. Velja omeniti, da so v vseh vzorcih medu odkrili značilne komponente propolisa in sicer flavonoide pinobanksin, pinocembrin in krizin, vendar ti ne veljajo za markerje botaničnega porekla medu.

Abscizinska kislina kot rastlinski hormon služi za zaščito rastline v času suše in negativnih vplivov okolja in med ostalimi markerji prav tako odkriva botanično poreklo. Znano je, da je hormon prisoten v cvetličnem nektarju in posledično tudi v samem medu v različnih količinah. Analizirali so ga v resovem, citrusovem, lipovem in akacijevem medu ter medu oljne repice (Tomás-Barberán in sod., 2001).

Preglednica 7. Fenolne spojine, ki nastopajo kot markerji botaničnega porekla v posameznih vrstah evropskega medu (Tomás-Barberán in sod., 2001)

VRSTA MEDU	MARKERJI BOTANIČNEGA POREKLA (flavonoidi in fenolne kisline)
akacijev	abscizinska, hidroksicimetna, kavna, <i>p</i> -kumarna in ferulna kislina, nedefinirani
citrusov	hesperetin
evkaliptusov	nedefinirani
kostanjev	hidroksicimetna, kavna, <i>p</i> -kumarna in ferulna kislina, nedefinirani
lipov	abscizinska kislina, nedefinirani
repični	abscizinska kislina, nedefinirani
resov	abscizinska kislina, elaginska kislina
rožmarinov	kamferol
sivkin	hidroksicimetna, kavna, <i>p</i> -kumarna in ferulna kislina, nedefinirani
sončnični	kvercetin, hidroksicimetna, kavna, <i>p</i> -kumarna in ferulna kislina

2.6.3 Skupni fenoli

Vsebnost skupnih fenolov se v medu običajno določa s pomočjo Folin-Ciocalteujeve (FC) metode, ki je občutljiva na fenolne in polifenolne komponente in ostale antioksidante, kot sta askorbinska kislina in vitamin E. FC metoda je standardizirana in se na široko uporablja pri določevanju skupnih fenolov v naravnih vzorcih.

FC metoda je ena izmed starejših indirektnih, neselektivnih metod za določanje tako mono kot polifenolov. Glavna analizna mešanica sestoji iz volframata in molibdata v močno bazičnem mediju (5-10 % Na_2CO_3). Zaradi alkalnega okolja pride do oksidacije fenolov, in nastanka $\text{O}_2^{\cdot -}$. Le ta reagira z molibdatom do molibdenovega (IV) oksida, kateri močno absorbira okrog 750 nm. Vsebnost fenolov določenih po FC metodi je navadno izražena kot mg galne kisline na kg ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$). V primerjavi z drugimi metodami ima ogromno prednosti. V osnovi gre predvsem za občutljivo metodo, ki ne zahteva natančne standardizacije. Poleg tega se uporablja za približno oceno antioksidativne učinkovitosti vzorcev živil, ki vsebujejo zanemarljivo količino proteinov (Roginsky in Lissi, 2004).

Različni avtorji uporabljajo različne modifikacije te metode. Npr. Beretta in sod. (2005) so določitev vsebnosti skupnih fenolov izvedli v kislem območju in se tako izognili vplivu sladkorjev in obarjanju med samim izvajanjem analize.

Podatki o vsebnosti skupnih fenolov, ki jih najdemo v tuji literaturi, za nas ne predstavljajo posebne uporabne vrednosti. Na to nas opozarjajo že vrste medu, ki jih pri nas ni (npr. ajdov, cikorijev, evkaliptusov, rododendronov, sojin in drugi) ter različne modifikacije metode. K različnim podatkom prispevajo tudi podnebne danosti dežele in njena geografska lega. Rezultat vseh naštetih dejstev so velike razlike v vsebnosti skupnih fenolov, ki nam jih nazorneje prikazuje preglednica 9.

Preglednica 8 nam prikazuje znatne razlike v vsebnosti skupnih fenolov znotraj posamezne vrste medu, saj tuji avtorji uporabljajo različne modifikacije FC metode določanja, poleg tega podajajo rezultate na več možnih načinov. Iz rezultatov izraženih v mg galne kisline na kg medu je razvidno, da največ skupnih fenolov vsebujeta italijanski in ameriški ajdov med, 482,2 oziroma 456,0 mg_{GA}/kg, najmanj pa ameriški in italijanski akacijev med, 46,0 oziroma 55,2 mg_{GA}/kg.

Preglednica 8. Vsebnost skupnih fenolov v različnih vrstah medu, kot jih navajajo tuji avtorji (Beretta in sod., 2005; Gheldof in Engeseth, 2002; Al-Mamary in sod., 2002; Küçük in sod., 2007)

	ITALIJA (Beretta in sod., 2005)	ZDA (Gheldof in Engeseth, 2002)	JEMEN (Al-Mamary in sod., 2002)	TURČIJA (Küçük in sod., 2007)
VRSTA MEDU	(mg _{GA} /kg)	(mg _{GA} /kg)	(mg _{CE} /100 g)	(mg _{KATEHINA} /100 g)
ajdov	482,2	456,0	–	–
akacijev	55,2	46,0	100,1	–
cikorijev	158,5	–	–	–
cvetlični	170,4	–	75,1	198,0
deteljev	67,1	130,0	–	–
kostanjev	211,2	–	–	239,0
gozdni	255,6	–	–	–
rododendronov	–	–	–	132,0
regratov	102,1	–	–	–
sojin	–	278,0	–	–

GA - galna kislina, CE - ekvivalent katehina,

2.6.4 Pomen antioksidantov v medu

Znano je, da se med že od nekdaj uporablja v terapevtske namene, saj vsebuje več kot 200 bioaktivnih komponent, ki zavirajo razvoj nekaterih bolezni in prispevajo k izboljšanju delovanja imunskega sistema (Al-Mamary in sod., 2002). Učinkuje protimikrobno, protivnetno, preprečuje strjevanje krvi in vpliva na širjenje krvnih žil. Med se uporablja za zdravljenje opeklin, lajšanje gastrointestinalnih motenj, kožnih in očesnih sprememb, blaži infekcije in pomaga pri premagovanju kroničnih prehladov. Poleg tega deluje preventivno na nastanek zobne gnilobe in bolezni sluznice ustne votline. Zaradi svoje sestave je primeren tudi za diabetike in se pogosto nudi pri prehrani bolnikom v obdobju rekonvalescence (okrevanje). Med s svojimi učinkovinami pomaga pri regulaciji sekrecije hormonov iz žlez z notranjim izločanjem ter tako sodeluje pri celotni presnovi organizma (Aparna in Rajalakshmi, 1999).

Kot že omenjeno, se med, zaradi njegovih antimikrobnih lastnosti, uporablja za zunanjo uporabo zdravljenja opeklin in ran. K temu pripomoreta tudi visoka vsebnost sladkorjev in prisotnost organskih kislin (mravljinčna, očetna, mlečna, oksalna in druge). Sloj medu v stiku s poškodovanim tkivom ustvarja vlažno okolje, ki zmanjšuje razdraženost in izcedek celične tekočine, pripomore k hitrejšemu zdravljenju morebitne infekcije in hkrati pospešuje regeneracijo tkiva (Aparna in Rajalakshmi, 1999, Molan, 2001).

Opravljen je bil tudi vrsta medicinskih raziskav, kjer so proučevali vpliv uživanja medu na okrevanje organizma po določeni bolezni. Ugotovili so zvišano antioksidativno učinkovitost krvnega seruma po zaužitju medu, in sicer se pojavi značilen porast antioksidativne kapacitivnosti krvnega seruma po uživanju medu samega ali pa v kombinaciji s pijačami, ki vsebujejo posamezne antioksidativne učinkovine. Zanimiva je tudi študija o zmanjšanju tumorskega vsadka pri podganah pred in po operativnem posegu. Le-ta pokaže, da fizikalno-kemijske in kemijske značilnosti antioksidantov čebeljega pridelka varujejo operativno poškodbo ob tumorski implantaciji. Znan je tudi demonstracijski poskus antitumorskega učinka medu *in vitro* ter *in vivo* pri raku na mehuru (Beretta in sod., 2005).

Nekatere znanstvene študije dokazujejo, da med kot vir antioksidantov učinkuje proti škodljivim oksidacijskim procesom v hrani (npr. oksidacija lipidov) in encimskemu porjavenju sadja in zelenjave (Gheldof in Engeseth, 2002).

Johnson in sod. (2005) so raziskovali vpliv deteljinega in cvetličnega medu na potek lipidne oksidacije v goveji pašteti. Za upočasnitev lipidne oksidacije se v mesne paštete pogosto dodaja natrijev tripolifosfat (sintetični antioksidant), ki veže prisotne kovine in tako zavira potek reakcije. Izkazalo se je, da ima deteljin med, ki je temnejše barve in hkrati tudi več fenolnih spojin, večji učinek na upočasnitev oksidacije lipidov kot cvetlični med, ki je svetlejši. Študija se zaključuje z ugotovitvijo, da je med s svojo antioksidativno učinkovitostjo primerljiv z antioksidativno učinkovitostjo fosfatov v goveji pašteti, ter tako ena izmed alternativnih možnosti zamenjave sintetičnega antioksidanta z naravnim.

Nagai in sod. (2005) so ugotovili, da med inhibira nastanek oksidativnih spojin pri kuhanem puranju mesa. Antioksidativni učinek se pokaže ob dodatku mešanice medu in aminokislina lizina pred segrevanjem puranjega mesa in se vidi kot porast produktov Maillardove reakcije.

Nekateri avtorji so raziskovali tudi vpliv skladiščenja na AA. Wang in sod. (2004) poročajo o zmanjšanju antioksidativne učinkovitosti preiskovanih vzorcev medu, ki so bili hranjeni za dobo šestih mesecev. Poleg tega so ugotovili, da pri tem pojavu embalaža in temperatura skladiščenja nimata bistvenega vpliva.

2.6.5 Antimikrobno delovanje medu

Fenolni antioksidanti so poznani po antimikrobni aktivnosti in inhibiciji širokega spektra gram negativnih in gram pozitivnih bakterij. Antimikrobno aktivnost medu so dokazali Taormina in sod. (2001). Opravili so študijo o inhibitorni učinkovitosti medu na mikroorganizme *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* in *Bacillus cereus*, ki so odgovorni za kvarjenje živil. Rezultati so pokazali, da imajo temnejše vrste medu večji inhibitorni učinek kot svetlejše. Značilne antibakterijske lastnosti se kažejo tudi v daljši obstojnosti medov v času skladiščenja, kar so dokazali Nagai in sod (2006). Naravno prisotne protimikrobne spojine v temnejših vrstah medu (ajdov, mešani) imajo močan inhibitorni učinek na bakterijsko rast v času skladiščenja (0-7 dni) govejega, piščančjega, svinjskega in ribjega mesa. Poleg tega so ugotovili, da imajo temnejše vrste medu tudi najvišjo AA. Raziskava je pokazala zanimivo povezavo med barvo, AA in protimikrobno učinkovitostjo posamezne vrste medu.

Opravljena je bila tudi raziskava o antimikrobni aktivnosti sortnih kostanjevih, cvetličnih in rododendronovih medov na *Staphylococcus aureus* in *Helicobacter pylori*. Izkazalo se je, da ima največji inhibitorni učinek kostanjev med, sledi cvetlični ter rododendronov. Razlike med njimi so sicer majhne, kar pomeni, da je antimikrobna aktivnost vzorcev pogojena z nekaterimi fizikalnimi (vrednost pH, osmolarnost) in kemijskimi lastnostmi medov ter izvorom same rastline in njene vsebnosti antioksidativnih učinkovin (Küçük in sod., 2007).

V medovih predstavlja največjo antimikrobno učinkovino vodikov peroksid. Njegovo koncentracijo določata prisotnost encimov glukoza-oksidade, ki ga čebele naravno sintetizirajo ter katalaze, ki izvira iz cvetnega prahu. Vodikov peroksid sicer ni obstojen in razpada, ker pa z delovanjem encima neprenehoma nastaja, je določena količina vedno prisotna. Encim glukoza-oksidaža je v surovem medu neaktiven. Ob prisotnosti vode postane aktiven in iz glukoze proizvaja vodikov peroksid in glukonsko kislino: $\text{glukoza} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{glukonska kislina} + \text{H}_2\text{O}_2$. Katalaza cepi vodikov peroksid na vodo in kisik in s tem povečuje razkuževalno moč medu: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Blasa in sod., 2005, Al-Mamary in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Analizirali smo 72 vzorcev slovenskega medu različnega botaničnega porekla, letnika 2005.

Preglednica 9. Vrste medu in število ter oznaka vzorcev posamezne vrste

VRSTA MEDU	ŠTEVILO VZORCEV	OZNAKA VZORCEV
akacijev	17	A16-A32
cvetlični	15	C16-C27, C29-C31
gozdni	15	G16-G30
kostanjev	14	K13-K26
smrekov	11	S16-S26

Vzorci so bili v času analize stari povprečno 1 do 3 mesece. Hranjeni so bili v zaprtih plastičnih posodah, v temnem prostoru ter pri sobni temperaturi.

3.2 MERJENJE BARVE

3.2.1 Merjenje barve z Minolta kromometrom

Princip:

Kromometer Minolta CR-200B deluje na principu odboja svetlobe, ki ga naše oko zazna v obliki barve. Barvo vzorca razdeli na tri komponente (L^* , a^* in b^*), ki jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu. Vrednost L^* določa svetlost vzorca (višje so vrednosti, svetlejši je vzorec). Vrednosti a^* in b^* določata odtenek barve.

Aparatura:

Vzorcem medu smo instrumentalno izmerili barvo v sistemu CIE L^* , a^* in b^* s kromometrom Minolta CR-200B (Konica Minolta, Japonska).

Izvedba:

Kristalizirane vzorce smo predhodno s segrevanjem v zaprtih kozarčkih v sušilniku pri 40 °C utekočinili, medtem ko nekrystaliziranih oziroma tekočih vzorcev medu ni bilo potrebno utekočiniti. Plastične prozorne petrijevke smo napolnili z medom in jih previdno pokrili s pokrovom tako, da smo se izognili nastanku zračnih mehurčkov. Nato smo na petrijevko nastavili merilno glavo kromometra Minolta CR-200B in na računalniku odčitati L^* , a^* in b^* vrednosti za posamezne vzorce. Meritev smo ponovili trikrat na različnih mestih za vsak vzorec in rezultat podali kot povprečje.

3.2.2 Spektrofotometrično merjenje barve

Princip:

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

Aparatura:

Meritve smo opravili na spektrofotometru Cecil CE 2021, pri valovnih dolžinah 450 in 720 nm.

Izvedba:

Pripravili smo 50 % raztopino posameznega vzorca medu (w/v) in jo filtrirali preko filtrirnega papirja (modri trak, 391 Sartorius). Filtratu smo izmerili absorbanco pri dveh valovnih dolžinah, 450 in 720 nm. Vrednosti izračunanih razlik absorbanco (t.i. neto absorbanco) smo nato pomnožili s tisoč (Beretta in sod., 2005).

3.3 DOLOČITEV VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV S FC METODO

Princip:

Fenolne spojine reagirajo s FC reagentom v kislem. Obarvanemu produktu smo izmerili absorbanco (Beretta in sod., 2005). Rezultate smo izrazili kot mg galne kisline na kilogram medu ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu). Analizo smo izvedli v kislih pogojih, s čimer smo preprečili vpliv sladkorjev in obarjanje med samim izvajanjem analize.

Reagenti:

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

Aparatura:

Meritve smo opravili na spektrofotometru Cecil CE 2021 pri valovni dolžini 750 nm.

Izvedba:

V stekleno čašo smo natehtali ($5 \pm 0,001$) g vzorca medu in ga s pomočjo ultrazvočne kopeli raztopili v približno 20 ml destilirane vode. Nato smo vzorec prelili v 50 ml bučko in jo dopolnili do oznake. Za analizo smo odpipetirali 100 μl vzorca in mu dodali 1,0 ml FC reagenta ter na stresalniku mešali 2 min. Po 20 min smo na spektrofotometru izmerili absorbanco proti sladkornemu analogu, ki ima podobno sestavo sladkorjev kot med in služi kot slepi vzorec. Vsak vzorec medu smo analizirali v treh vzporednih določitvah. Koncentracijo skupnih fenolov v medu smo določili s pomočjo umeritvene krivulje (priloga B), ki smo jo pripravili z galno kislino s koncentracijo od 8,0 do 120,0 mg/l.

3.4 MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

3.4.1 DPPH[•] metoda (Beretta in sod., 2005)

Princip:

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

Reagenti:

- 130 µM DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Sigma, ZDA) v absolutnem etanolu
- 100 mM acetatni pufer (CH₃COONa · 3H₂O), pH 5,5 (Kemika, Zagreb)
- absolutni etanol (Merck, Nemčija)
- sladkorni analog (40 % fruktoze, 30 % glukoze, 10 % maltoze in 20 % vode)
- destilirana voda

Aparatura:

Meritve smo opravili na spektrofotometru Cecil CE 2021 pri valovni dolžini 517 nm.

Izvedba:

Pripravili smo izhodno raztopino medu (15 g/25 ml, w/v) in iz nje z razredčevanjem dobimo 11 različnih koncentracij medu (preglednica 11). Nato smo odpipetirali 0,1 ml posamezne raztopine medu in v vsako dodali 1 ml acetatnega pufru in 1,9 ml DPPH[•] reagenta. Vzoredno smo pripravili še kontrolni in slepi vzorec. Pri kontrolnem smo namesto raztopine medu uporabili sladkorni analog, pri slepem pa smo za posamezno koncentracijo vzorca uporabili vse reagente razen DPPH[•] in tako eliminirali vpliv barve medu. Vse mešanice smo močno premešali na Vortex mešalu ter jih za 90 min postavili v temo pri sobni temperaturi. Po tem času smo na spektrofotometru pri 517 nm izmerili absorbance posameznim raztopinam vzorca, slepim raztopinam in kontrolnemu vzorcu.

Preglednica 10. Prikaz razredčevanja izhodne raztopine 15 g medu/25 ml

OZNAKA	V razt. medu (ml)	V vode (ml)	c (mg/ml)	c* (mg/ml)
1	0,1	1,9	30	1
2	0,2	1,8	60	2
3	0,4	1,6	120	4
4	0,6	1,4	180	6
5	0,8	1,2	240	8
6	1,0	1,0	300	10
7	1,2	0,8	360	12
8	1,4	0,6	420	14
9	1,6	0,4	480	16
10	1,8	0,2	540	18
11	2,0	0,0	600	20

*- končna koncentracija merjene raztopine

Iz dobljenih rezultatov smo narisali graf, in sicer odvisnost preostalega DPPH od koncentracije medu. Preostali DPPH smo izračunali po enačbi 1 in rezultate podali v odstotkih. IC_{50} (koncentracija učinkovitosti) izračunamo iz enačbe premice (priloga D):

$$\text{preostali DPPH (\%)} = \frac{A_{VZ} - A_{SL}}{A_K} \cdot 100 \quad \dots (1)$$

A_{VZ} ... absorbanca vzorca medu

A_K ... absorbanca kontrolnega vzorca

A_{SL} ... absorbanca slepega vzorca

3.4.2 FRAP metoda (Benzie in Strain, 1996)

Princip:

Metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) temelji na redukciji Fe^{3+} v Fe^{2+} ob prisotnosti antioksidanta. Nastali Fe^{2+} ioni v prisotnosti TPTZ reagenta (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin) tvorijo obarvan kompleks, ki doseže absorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija poteka v kislem mediju (Benzie in Strain, 1996).

Reagenti:

- 10 mM TPTZ (2,4,6-tri[2-piridil]-s-triazin) (Sigma, ZDA)
- 40 mM HCl (Merck, Nemčija)
- 20 mM železov klorid ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) (Merck, Nemčija)
- 300 mM acetatni pufer ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$), pH 3,6 (Kemika, Zagreb)
- 20 mM železov sulfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck, Nemčija)
- destilirana voda

Aparatura:

Meritve smo opravili na spektrofotometru Cecil CE 2021 pri valovni dolžini 593 nm.

Izvedba:

Priprava FRAP reagenta:

Na analitski tehtnici smo odtehtali ($31,0 \pm 0,1$) mg TPTZ reagenta in mu dodali 10 ml 40 mM HCl ter popolnoma raztopili v vodni kopeli na 50 °C. Nato smo odtehtali ($54 \pm 0,1$) mg železovega klorida in ga raztopili v 10 ml destilirane vode. Za pripravo FRAP reagenta smo odpipetirali TPTZ reagent, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in acetatni pufer v razmerju 1:1:10. FRAP reagent vedno pripravimo tik pred uporabo in ga med analizo hranimo v vodni kopeli pri 37 °C.

Umeritvena krivulja:

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

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

Vzorci:

V stekleno čašo smo odtehtali ($5,0 \pm 0,001$) g posameznega vzorca medu in ga dobro raztopili v cca 20 ml destilirane vode. Nato smo vzorec prelili v 50 ml bučko in jo dopolnili do oznake. Za analizo smo odpipetirali 200 μ l vzorca in mu dodali 1,8 ml FRAP reagenta ter inkubirali 10 min pri 37 °C. Nato smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri 593 nm proti slepemu vzorcu. Vsak vzorec smo merili v treh paralelkah. Rezultate smo izrazili kot FRAP vrednost (μ M Fe(II)) 10 % raztopine medu.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Dobljene rezultate smo statistično obdelali in ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri:

- povprečna vrednost (\bar{x})
- standardni odklon (SO)
- koeficient variabilnosti (KV)
- korelacijski koeficient (r_{xy})

Povprečna vrednost

Od srednjih vrednosti najpogosteje uporabljamo aritmetično sredino ali povprečje. Aritmetična sredina predstavlja nekakšno težišče podatkov, saj je vsota odklonov posameznih vrednosti spremenljivke od povprečja navzgor enaka vsoti odklonov navzdol. Zato je vsota vseh odklonov od aritmetične sredine vedno enaka nič. Dobimo jo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh enot in vsoto delimo s številom enot (Adamič, 1989).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \quad \dots (2)$$

$\sum x_i$... vsota posameznih vrednosti
N..... število enot

Varianca in standardni odklon

Varianca je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Za statistično analizo podatkov 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 standardni odklon (Adamič, 1989).

$$SO = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots (3)$$

Koeficient variabilnosti

Koeficient variabilnosti računamo, kadar želimo primerjati variiranje različnih spremenljivk, ki so med seboj v vsebinski zvezi. Korelacijski koeficient, ki je merilo za stopnjo linearne odvisnosti med dvema numeričnima spremenljivkama, zavzema vrednost

od -1 do 1. Izračunamo ga tako, da standardni odklon delimo z aritmetično sredino in to izrazimo kot odstotek (Adamič, 1989).

$$KV(\%) = \frac{SO}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots (4)$$

Analiza povezanosti dveh spremenljivk

Medsebojno zvezo dveh spremenljivk (x in y) preučujemo z metodo korelacije in regresije. Na ta način lahko preučujemo odnos med spremenljivkama, ali obstaja povezanost in kakšne vrste je, ali pa poskušamo na osnovi ene spremenljivke napovedati vrednost druge.

O regresiji govorimo, kadar imamo neodvisno spremenljivko (x), katere vrednost izberemo sami in je vnaprej določena, ter drugo spremenljivko, ki je od prve odvisna in jo opisuje matematična funkcija $y = f(x)$. Regresijsko analizo je moč predstaviti v grafični obliki. Najpreprostejša in hkrati najbolj zaželena je linearna funkcija, kar pomeni, da je zveza dveh spremenljivk podana z enačbo premice. Kako dobro se posamezne vrednosti parametrov skladajo z enačbo premice nam pove koeficient določitve (R^2). Korelacija je metoda za statistično analizo dveh spremenljivk, vendar obe spremenljivki obravnava kot set neodvisnih. To pomeni, da vrednosti spremenljivk ne moremo izbrati vnaprej, sta naključni, odvisni od napak pri merjenju, na obe delujejo biološki in drugi dejavniki variabilnosti. Korelacija je lahko pozitivna ali negativna, velika ali majhna, ali pa sploh ne obstaja. Korelacijo opisujejo različni koeficienti korelacije, med katerimi je tudi koeficient korelacije po Pearsonu (R). Enak je razmerju (5) med kovarianco (C_{xy}) in zmnožkom varianc obeh spremenljivk x in y (S_x^2 in S_y^2) (Adamič, 1989).

$$R = \frac{C_{xy}}{(S_x^2 \cdot S_y^2)^{1/2}} \quad \dots (5)$$

R.....koeficient korelacije po Pearsonu

C_{xy} ...kovarianca

S_x^2varianca za lastnost x

S_y^2varianca za lastnost y

Kovarianca (C_{xy}) je povprečni produkt odklonov dveh naključnih spremenljivk od njihovih povprečij in pravzaprav predstavlja varianco podatkov zaradi korelacije. Računamo jo po (6):

$$C_{xy} = \frac{1}{N} \cdot \sum (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) \quad \dots (6)$$

Koeficient korelacije po Pearsonu (R) lahko zavzame vse vrednosti med -1 in +1. Pozitivne vrednosti koeficienta pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, med tem ko vrednost druge pada. Vrednost -1 predstavlja maksimalno negativno korelacijo, vrednost +1 maksimalno pozitivno in vrednost 0 nam pove, da med spremenljivkama ni povezanosti. Na osnovi

velikosti korelacijskega koeficienta lahko sklepamo o tem, kako močna je povezava med statističnimi enotami (Adamič, 1989).

Rezultate fizikalno kemijskih analiz medov smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa SPSS/PC⁺ (Statistical Package for Social Sciences) pri 0,05 stopnji tveganja. Rezultati obdelave eksperimentalnih podatkov so podani v obliki vrednosti statistične značilnosti-signifikance in predstavljajo izračunano vrednost izraza, ki ji je bila pripisana verjetnost, odčitana iz ustrezne statistične preglednice vzorčnih podatkov pri 0,05 stopnji tveganja.

Uporabili smo Levenov test homogenosti varianc, kjer iz vsakega vzorca zgradimo nov vzorec, v katerem so združene absolutne vrednosti odmikov od povprečne vrednosti opazovanega vzorca. Na tako dobljenih novih vzorcih, ki opisujejo disperzije statističnih enot znotraj posameznih vzorcev, izvedemo analizo variance, s katero preverimo homogenost varianc neodvisnih vzorcev. Osnovna domneva pri Levenovem testu pravi, da med vsaj enim parom varianc obstaja statistično značilna razlika, ničelna pa, da razlik med variancami ni. Vrednost signifikance pove, katera izmed domnev je prava. Vrednost signifikance, ki je manjša od stopnje tveganja 0,05 vodi k sprejetju osnovne domneve, vrednost večja od 0,05 pa k potrditvi ničelne. Ničelna domneva je tista, ki si jo v danem primeru želimo, saj pomeni, da smemo vzorce medsebojno primerjati z dejansko analizo variance (Adamič, 1989).

4 REZULTATI

Rezultate eksperimentalnega dela, v katerem smo zasledovali zvezo med barvo in antioksidativno aktivnostjo, smo zbrali v 3 sklope:

- rezultati merjenja barve, ki jih prikazujemo v preglednicah od 11 do 14 in na slikah od 8 do 13,
- rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolov, ki jih prikazujemo v preglednici 15 in slikah 14, 15 in 16 ter
- rezultati merjenja AA, ki jih prikazujemo v preglednici 16 in na slikah od 17 do 24.

Naredili smo tudi primerjavo rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA posameznih vrst medu in to prikazujemo na slikah 25-29.

4.1 REZULTATI MERJENJA BARVE MEDU

4.1.1 L^* , a^* in b^* vrednosti barve medu

V preglednici 11 so prikazane vrednosti parametra L^* za posamezne vrste medov. Parameter L^* določa svetlost medu; višja je njegova vrednost, svetlejši je med. Med analiziranimi vrstami medu je najsvetlejši akacijev med, ki ima najvišjo vrednost parametra L^* , in sicer 64,0. Sledijo cvetlični, kostanjev in smrekov med, najnižjo vrednost parametra L^* pa ima gozdni med, 43,1, ki je tudi najtemnejši. Izmed posameznih vrst medu najbolj variirajo vzorci kostanjevega medu, $KV = 7,0 \%$, najmanj vzorci akacijevega medu, $KV = 2,2 \%$. Analize variance v našem primeru nismo opravljali, ravno tako ne zaključnega testa za analizo večjega števila homogenih vzorcev (Duncanov test). Levenov test homogenosti nam podaja vrednost signifikance (0,014), ki je manjša od izbrane meje tveganja 0,05. Tako zavrnilo ničelno hipotezo in potrdimo osnovno domnevo, ki pravi, da obstajajo razlike med variancami statističnih vzorcev parametra L^* petih vrst medu. Vzorci so nehomogeni in zato neprimerni za nadaljnjo statistično obdelavo podatkov.

Preglednica 11. Vrednosti parametra L^* za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	n	\bar{x}	X_{\min}	X_{\max}	SO	KV (%)
akacijev	17	64,0	60,3	66,5	1,4	2,2
cvetlični	15	55,9	50,1	60,4	2,5	4,5
gozdni	15	43,1	36,6	50,7	3,0	7,0
kostanjev	14	50,0	43,4	54,1	2,4	4,8
smrekov	11	44,1	39,5	47,3	2,3	5,2

n - število vzorcev, \bar{x} - povprečna vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SO - standardni odklon, KV - koeficient variabilnosti

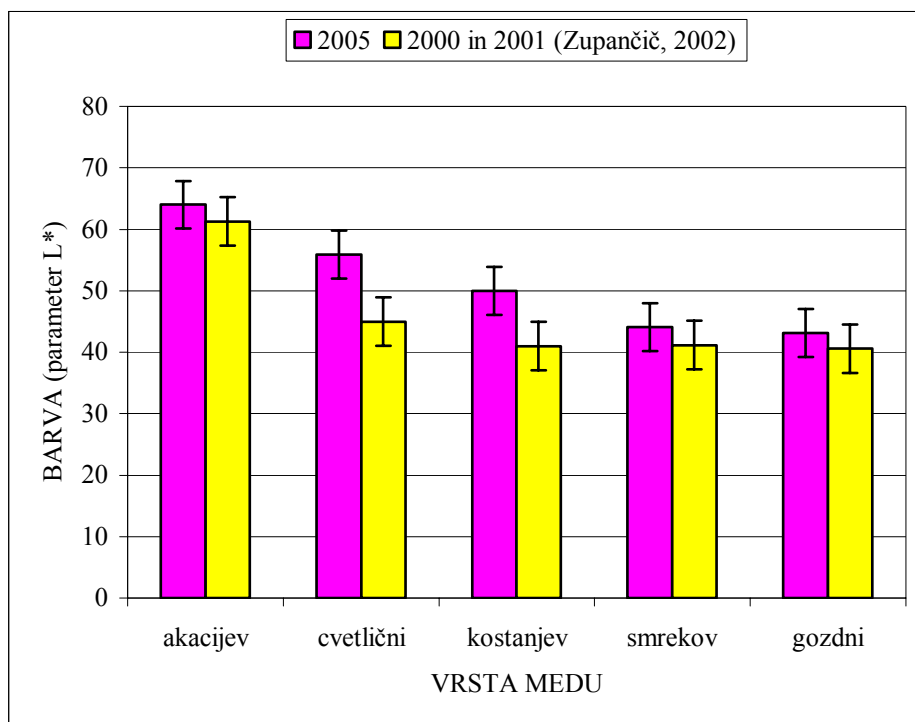
Levenov test homogenosti nam za vse ostale parametre (parameter a^* , parameter b^* , neto absorbanca, vsebnost skupnih fenolov, AA določena s FRAP metodo) ravno tako podaja vrednosti signifikance manjše od meje tveganja, zato nadaljnja statistična obdelava rezultatov ni bila možna.

Na sliki 8 je razvidna pestrost barv slovenskih vrst medu z izmerjenimi L^* vrednostmi. V spodnji vrsti so prikazani najsvetlejši vzorci akacijevnega medu, v srednji vrsti so nekoliko temnejši vzorci akacijevnega, cvetličnega in kostanjevega medu. Na vrhu pa so najtemnejši vzorci cvetličnega, smrekovega in gozdnega medu.



Slika 8. Barvni odtenki medov letnika 2005 z izmerjenimi L^* vrednostmi

V tuji literaturi (preglednica 2) navajajo visoke vrednosti parametra L^* za svetle ($L^* > 50$) vrste medu in nizke vrednosti za temnejše ($L^* < 50$) vrste. González-Miret in sod. (2005) so izmerili vrednost za parameter L^* pri kostanjevem medu 39,4, v gozdnem pa 41,52. Terrab in sod. (2002) za cvetlični med podajajo vrednost parametra L^* 21,95, kar je precej nižje od naše izmerjene vrednosti za to vrsto medu. Vendar pa je ravno pri cvetličnem medu barva lahko raznolika, od rumene do rjave, zato so tudi L^* vrednosti lahko različne. Pietraszewska-Pajak in Ciszak (2001) sta izmerila vrednost parametra L^* v akacijevem medu 53,10 in v cvetličnem 60,15, kar pomeni, da je poljski akacijev med temnejši od cvetličnega. Lazaridou in sod. (2004) so določili vzorcem grškega cvetličnega medu vrednost L^* 39,35, vzorcem smrekovega 42,94 in vzorcem hojevega medu 41,18. Navedeni rezultati so pogojeni z vrsto rastline, lego, geografskim poreklom, vplivi podnebja ter tudi s samo izvedbo analize.



Slika 9. Primerjava vrednosti parametra L* za med letnikov 2000 in 2001 (Zupančič, 2002) in naše vzorce medu letnika 2005

Na sliki 9 so podane vrednosti parametra L* za slovenski med letnikov 2000 in 2001 (Zupančič, 2002) in naše vzorce medu, pridelane leta 2005. S slike je razvidno, da so vrednosti L* parametra slovenskega kostanjevega medu letnika 2005 nekoliko višje, kar pomeni, da je med svetlejši. L* vrednost cvetličnega medu letnika 2005 je kar za 20,0 % višja od letnikov 2000 in 2001. Višje vrednosti zasledimo tudi pri ostalih vrstah medu. Vrednosti parametra L* so pri akacijevem medu višje za 4,0 %, kostanjevem za 18,0 %, smrekovem za 7,0 % in gozdnem za 6,0 %. Višje vrednosti parametra L* za leto 2005 so v največji meri pogojene z neugodnimi vremenskimi razmerami (velika količina padavin, temperaturna nihanja).

Persano-Oddo in sod. (2004) so zbrali podatke različnih avtorjev za evropski med in ugotovili, da imata najtemnejšo barvo kostanjev med z vrednostjo 87,9 mm Pfunda in gozdni med z vrednostjo 86,0 mm Pfunda. S pomočjo Pfundove barvne lestvice so ju opisali z barvo jantarja. Najsvetlejšo barvo ima akacijev med, in sicer 12,9 mm Pfunda, ki so mu po Pfundovi lestvici pripisali izrazito belo barvo. Primerjava evropskih in slovenskih vrst medu letnika 2005 nam kaže, da so vrednosti, ki določajo intenzivnost oz. svetlost barve, obratnosorazmerne. Vrednosti parametra L* slovenskih vrst medu so tako najvišje pri akacijevem, 64,0 in cvetličnem, 55,9 medu, ki sta hkrati najsvetlejša. Nižje vrednosti parametra L* imajo kostanjev, 50,0, smrekov, 44,1 in gozdni, 43,1, med, ki so temnejše barve.

Preglednica 12. Vrednosti parametra a^* za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	n	\bar{x}	X_{\min}	X_{\max}	SO	KV (%)
akacijev	17	-2,2	-4,5	-0,4	1,1	-50,0
cvetlični	15	-0,07	-5,0	5,0	2,3	–
gozdni	15	9,4	5,0	15,5	2,2	23,4
kostanjev	14	4,3	1,0	10,7	2,3	53,5
smrekov	11	9,1	6,4	12,6	1,8	19,8

n - število vzorcev, \bar{x} - povprečna vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SO - standardni odklon, KV - koeficient variabilnosti

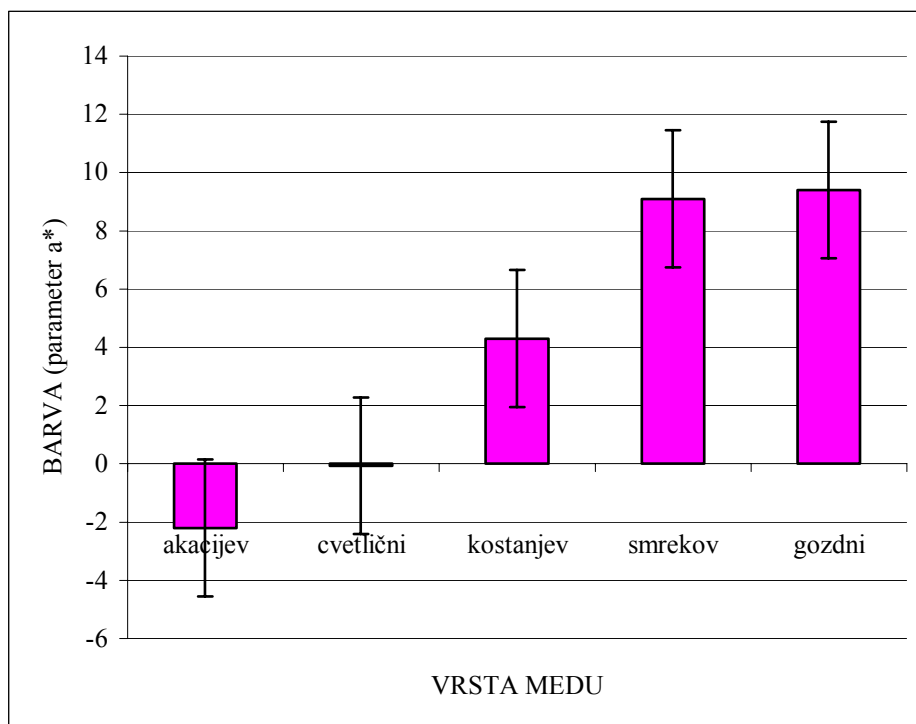
V preglednici 12 so prikazane vrednosti parametra a^* za posamezne vrste medu. Parameter a^* določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem območju. Pozitivne vrednosti tako pomenijo bolj rdečo barvo, negativne pa bolj zeleno. Povprečna vrednost parametra a^* v analiziranih vrstah medu se giblje od -2,2 v akacijevem do 9,4 v gozdnem medu.

Gozdni med ima najvišjo povprečno vrednost parametra a^* , in sicer 9,4. To pomeni, da je med vsemi vrstami našega medu najintenzivnejše rdeče obarvan, kar je razvidno že na pogled. Gozdnemu sledijo smrekov, kostanjev, cvetlični in akacijev med. Negativno povprečno vrednost parametra a^* smo dobili pri cvetličnem (-0,07) in akacijevem (-2,2) medu. Pri slednjem imajo vsi vzorci negativno vrednost parametra a^* . Iz tega sledi, da pri akacijevem medu prevladuje zelena barva, pri vseh ostalih analiziranih vrstah medu pa rdeča.

González-Miret in sod. (2005) so v kostanjevem medu izmerili vrednost parametra a^* 23,76, pri vzorcih gozdnega medu pa vrednost 21,15. Rezultati vzorcev kostanjevega medu letnika 2005 so dvakrat nižji od španskih, vrednosti gozdnega pa celo petkrat. Terrab in sod. (2002) navajajo za vzorce cvetličnega medu vrednost parametra a^* 12,56. Pietraszewska-Pajak in Ciszak (2001) navajata za vzorce akacijevnega medu negativne vrednosti parametra a^* , in sicer -2,71, za cvetlične vzorce pa -2,40. Pri vzorcih akacijevnega in cvetličnega medu se slednje vrednosti ujemajo z našimi izmerjenimi vrednostmi, kar pomeni, da zelena barva prevladuje pred rdečo. Lazaridou in sod. (2004) podajajo vrednosti parametra a^* za več vzorcev cvetličnega medu, in sicer povprečna vrednost znaša 24,02. Vrednosti parametra a^* so višje od vzorcev cvetličnega medu letnika 2005, kar pomeni, da vsebujejo več rdečega odtenka barve. Pri grških smrekovih vzorcih znaša povprečna vrednost 15,30 in je prav tako višja od povprečne vrednosti naših vzorcev smrekovega medu letnika 2005.

Vrednosti parametra a^* so pri slovenskih vzorcih medu letnikov 2000 in 2001 (Zupančič, 2002) višje pri cvetličnem in kostanjevem medu, medtem ko so pri akacijevem, gozdnem in smrekovem medu vrednosti parametra a^* nekoliko nižje (preglednica 2) od vrednosti analiziranih vzorcev medu letnika 2005.

Primerjava s tujo in domačo literaturo (preglednica 2) pokaže, da se vrednosti parametra a^* za iste vrste medu znatno razlikujejo. Ta pojav lahko razložimo s tem, da rastline izvirajo iz različnih geografskih področij. Na rast in posledično tvorbo pigmentov, kateri prispevajo k rdeči barvi (antocianini, karotenoidi), vplivajo tudi spremenljive podnebne razmere.



Slika 10. Povprečne vrednosti parametra a* za posamezne vrste medu

S slike 10 je razvidno, da smo vsem vzorcem akacijevega medu izmerili negativne vrednosti parametra a*. V nobenem torej nismo zaznali rdeče barve. Pri devetih vzorcih cvetličnega medu smo dobili negativne vrednosti parametra a*, kar kaže na to, da v njih zelena barva prevladuje. V nobenem izmed vzorcev gozdnega, kostanjevega in smrekovega medu nismo dobili negativnih vrednosti parametra a*, kar pomeni, da prevladuje rdeča barva.

Preglednica 13. Vrednosti parametra b* za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	n	\bar{x}	X_{\min}	X_{\max}	SO	KV (%)
akacijev	17	18,3	6,1	32,3	7,4	40,4
cvetlični	15	40,9	34,0	52,1	4,4	10,8
gozdni	15	34,1	25,2	41,0	3,8	11,1
kostanjev	14	40,7	34,3	44,8	2,2	5,4
smrekov	11	35,6	29,8	42,1	3,2	9,0

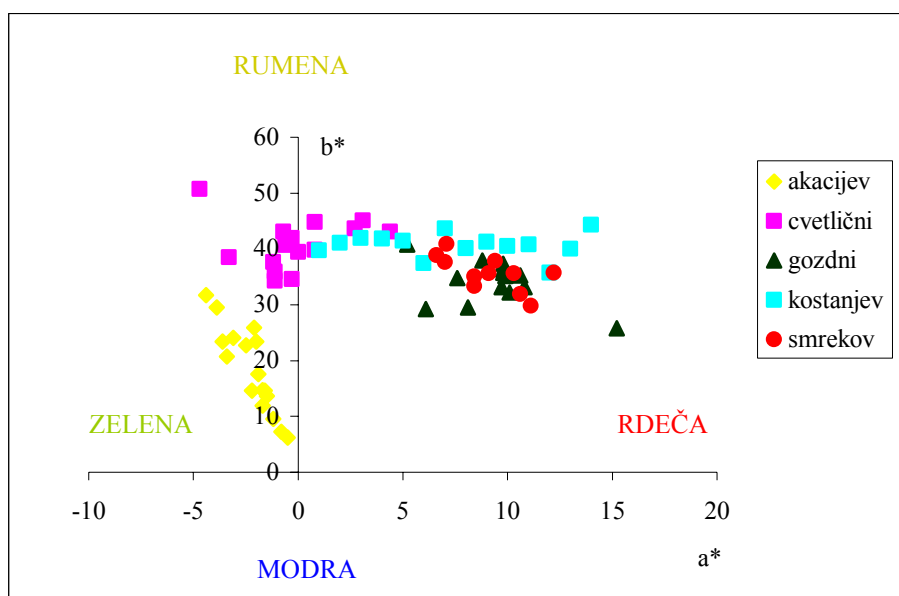
n - število vzorcev, \bar{x} - povprečna vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SO - standardni odklon, KV - koeficient variabilnosti

V preglednici 13 so prikazane vrednosti parametra b* za posamezne vrste medu. Parameter b* določa intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre barve v negativnem območju. Vse vrednosti so pozitivne, kar potrjuje našo domnevo, da v medu ni modrih pigmentov, saj le-ti za med niso značilni. Med analiziranimi vzorci medu, imata najvišjo povprečno vrednost parametra b* cvetlični in kostanjev med, vrednosti znašata 40,9 oz. 40,7. Nektar cvetočih rastlin je poln karotenoidnih pigmentov. Visoka vsebnost le-teh v teh

dveh vrstah medu, ima za posledico najintenzivnejše rumeno obarvanje. Sledijo smrekov, gozdni in akacijev med, ki ima najmanjšo povprečno vrednost parametra b^* , 18,3.

Vrednost parametra b^* so določili tudi González-Miret in sod. (2005), in sicer v kostanjevem, 20,38 in gozdnem medu, 22,12. Le-te so nižje od naših analiziranih vzorcev kostanjevega in gozdnega medu. Terrab in sodelavci (2002) poročajo za cvetlični med vrednost parametra b^* 8,65. Pietraszewska-Pajak in Ciszak (2001) sta za akacijev med izmerila vrednost 9,32 za cvetličnega pa 22,89. Vse vrednosti parametra b^* , ki so navedene v tuji literaturi so nižje od naših vrednosti, razen povprečne vrednosti vzorcev smrekovega medu, ki so ga analizirali grški raziskovalci (Lazaridou in sod., 2004), kjer znaša vrednost 37,66.

Če primerjamo vzorce slovenskega medu letnika 2005 z vzorci medu letnikov 2000 in 2001 (preglednica 2), je povprečna vrednost parametra b^* vzorcev akacijevnega medu letnika 2005 nižja. Iz tega sledi, da je intenzivnost rumene barve akacijevnega medu manjša v primerjavi s povprečno vrednostjo akacijevnega medu letnikov 2000 in 2001. Pri vseh ostalih vrstah medu pa so povprečne vrednosti parametra b^* letnika 2005 višje od rezultatov letnikov 2000 in 2001.



Slika 11. Vrednosti a^* in b^* parametrov za posamezne vrste medu

Na sliki 11 vidimo, da je največ vzorcev medu v zgornjem desnem kvadrantu, kar pomeni, da večina naših vrst medu vsebuje rdečo in rumeno barvo. Rumena barva je posledica večje količine karotenoidov v nektarju, medtem ko dajejo rdečo barvo v nektarju prisotni flavonoidi in antocianini (Piotraszewska-Pajak in Ciszak, 2001). Od petih vrst medu so vsi vzorci akacijevnega in nekaj vzorcev cvetličnega medu v zgornjem levem kvadrantu in namesto rdeče in rumene barve vsebujejo zeleno in rumeno. Med, v katerem prevladuje zelena barva, nastane iz nektarja, ki vsebuje veliko klorofila (Piotraszewska-Pajak in Ciszak, 2001).

4.1.2 Spektrofotometrično določanje barve medu

V preglednici 14 so prikazane vrednosti neto absorbanca za posamezne vrste slovenskega medu.

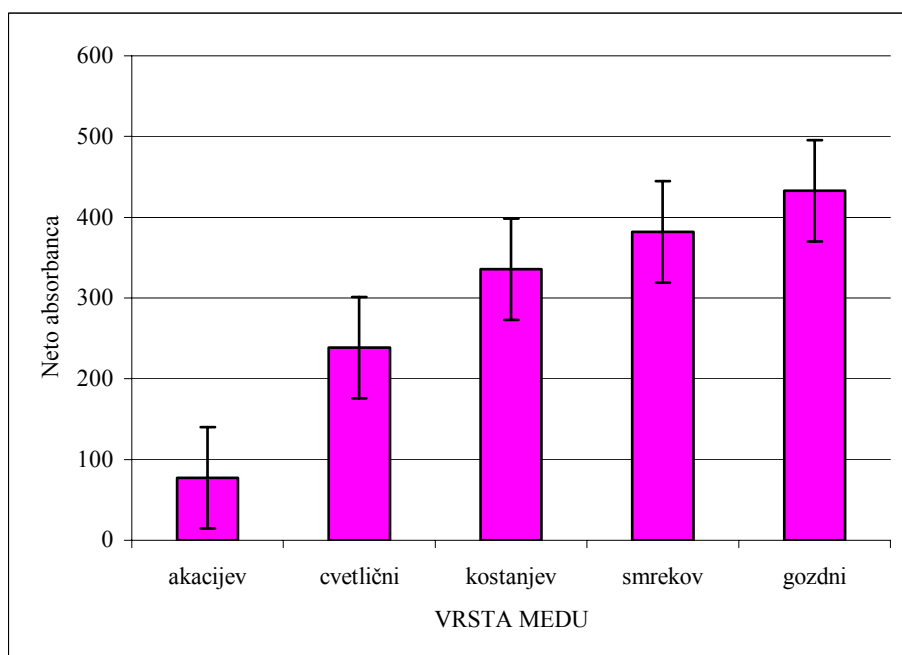
Preglednica 14. Vrednosti neto absorbanca za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	n	\bar{x}	x_{\min}	x_{\max}	SO	KV (%)
akacijev	17	77,4	26,0	133,0	28,9	37,3
cvetlični	15	238,5	141,0	326,0	57,3	24,0
gozdni	15	433,1	286,0	790,0	121,6	28,1
kostanjev	14	335,6	268,0	479,0	55,0	16,4
smrekov	11	381,7	305,0	478,0	58,2	15,2

N - število vzorcev, \bar{x} - povprečna vrednost, x_{\min} - minimalna vrednost, x_{\max} - maksimalna vrednost, SO - standardni odklon, KV - koeficient variabilnosti,

Najvišjo vrednost neto absorbanca dosežejo temnejše vrste medu, najnižjo pa svetlejše. Povprečna vrednost neto absorbanca 50 % (w/v) raztopine vzorcev medu znaša 77,4 za blede rumene vzorce akacijevga medu in 433,1 za rjave vzorce gozdnega medu. Razlike med vrednostmi absorbanca so pokazatelji različnih vsebnosti pigmentov (klorofili, karotenoidi, antocianini).

Beretta in sod. (2005) navajajo za kostanjev med vrednost neto absorbanca 610,0, za cvetlični vrednost 415,0 in akacijev med 25,0. Rezultati barve, določeni z merjenjem neto absorbanca italijanskega kostanjevega in cvetličnega medu, so v primerjavi s slovenskimi skoraj dvakrat višji. Iz tega lahko sklepamo, da gre za vrsti, ki vsebujeta večjo vsebnost pigmentov. Poleg tega so v italijanski raziskavi vse vrednosti rezultat merjenja samo enega vzorca za posamezno vrsto medu, kar lahko posledično vpliva na višje vrednosti.

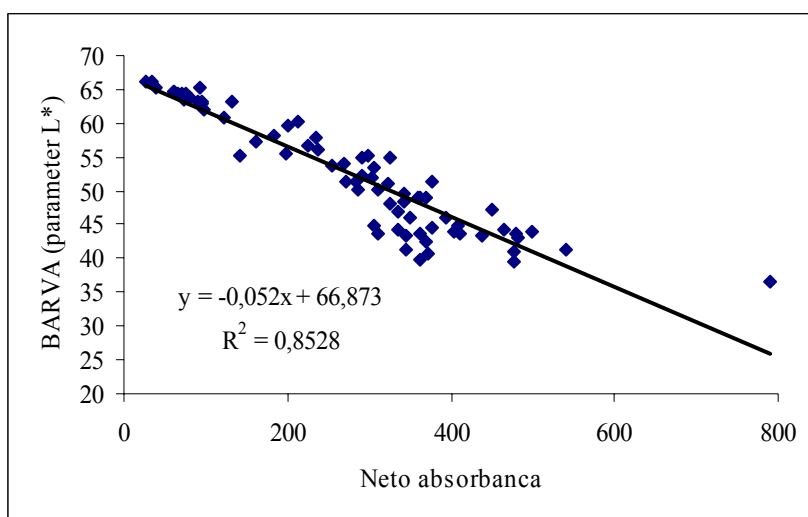


Slika 12. Povprečne vrednosti neto absorbanca za posamezne vrste medu

Slika 12 prikazuje, da imajo vzorci gozdnega medu najvišjo neto absorbanco in so najtemnejši, sledijo smrekovi, kostanjevi, cvetlični in najsvetlejši vzorci akacijevega medu, ki imajo najnižje vrednosti neto absorbancc.

4.1.2.1 Zveza med vrednostmi parametra L* in neto absorbancami posameznih vrst medu

Slika 13 prikazuje odvisnost parametra L* od neto absorbancc v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto. Odnos med spremenljivkama vseh v raziskavo vključenih vzorcev medu, ne glede na vrsto, opisuje linearni regresijski model $y = -0,052x + 66,873$. Koefficient določitve (R^2) znaša 0,8528, kar pomeni da neodvisna spremenljivka neto absorbanca pojasnjuje 85 % variance parametra L*. Vrednost korelacijskega koeficienta (R) v primeru linearne regresije izračunamo kot kvadratni koren regresijskega koeficienta in znaša 0,92, kar kaže na močno povezanost med obema metodama določanja barve posameznih vrst medu.



Slika 13. Zveza med parametrom L* in neto absorbanco v analiziranih vzorcih medu

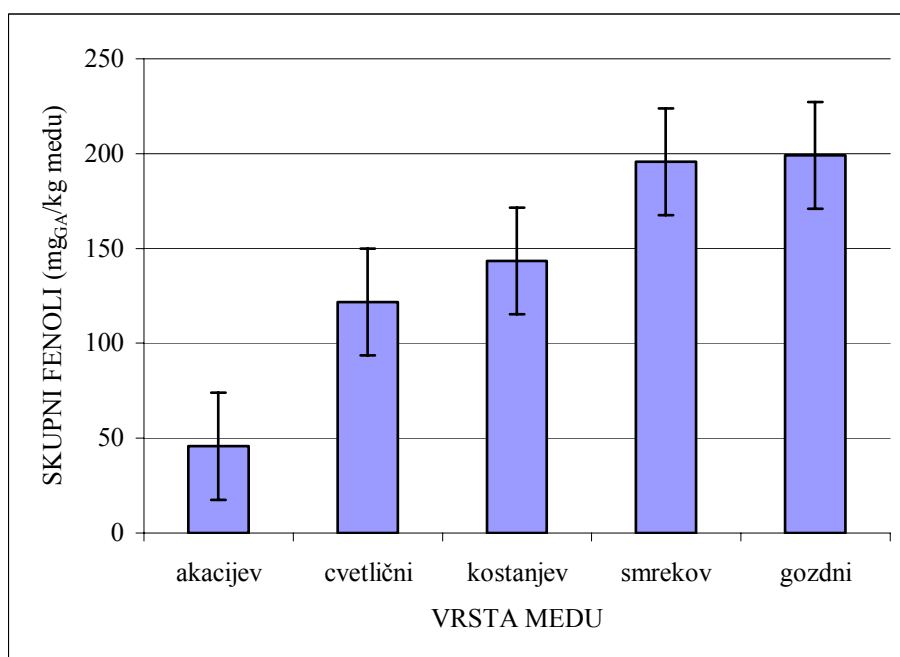
4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV

Vsebnosti skupnih fenolov, izražene v mg galne kisline na kg medu ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu) v posameznih vrstah slovenskega medu določene s pomočjo modificirane Folin-Ciocalteujeve metode, so podane v preglednici 15.

Preglednica 15. Vsebnost skupnih fenolov za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	n	\bar{x} ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$)	X_{\min} ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$)	X_{\max} ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$)	SO	KV (%)
akacijev	17	45,7	25,7	75,7	14,3	31,3
cvetlični	15	121,7	82,3	159,0	24,5	20,1
gozdni	15	199,0	139,0	312,3	38,7	19,4
kostanjev	14	143,5	112,3	219,0	25,0	17,4
smrekov	11	195,8	172,3	239,0	18,2	9,3

n - število vzorcev, \bar{x} - povprečna vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SO - standardni odklon, KV - koeficient variabilnosti



Slika 14. Povprečne vsebnosti skupnih fenolov za posamezne vrste medu s standardnimi odkloni

Iz rezultatov na sliki 14 lahko vidimo, da največ skupnih fenolov vsebujeta gozdni in smrekov med. Njuna povprečna vrednost znaša 199,0 oz. 195,8 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu. Sledita kostanjev in cvetlični med, najmanj skupnih fenolov pa vsebuje akacijev med, le 45,7 mg, izraženih kot mg galne kisline na kg medu.

Tudi v tuji literaturi navajajo podobne vrednosti za posamezne vrste medu. Gheldof in Engeseth (2002) sta določila vsebnost skupnih fenolov za akacijev med 46,0 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu. Podobno vrednost smo izmerili tudi v slovenskem akacijevem medu, in sicer 45,7

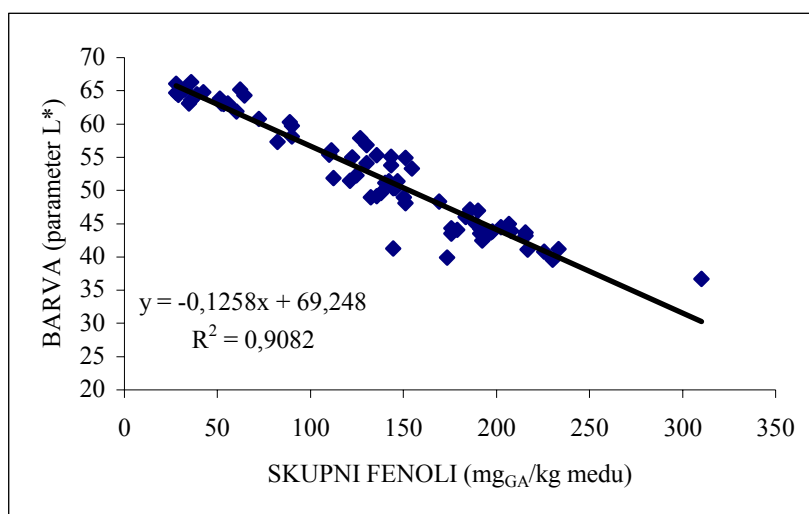
$\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu. Beretta in sod. (2005) so izmerili nekoliko višje vsebnosti fenolov v italijanskih vrstah medu v primerjavi z našimi, in sicer za gozdni med znaša povprečna vrednost 255,6, za kostanjev med 211,2, cvetlični 170,4 in za akacijev med 55,2 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu.

Blasa in sod. (2005) so primerjali vsebnost skupnih fenolov v nepredelanem in industrijsko obdelanem medu, in sicer v cvetličnem in akacijevem medu italijanskega porekla. Rezultati kažejo, da vsebnost skupnih fenolov za cvetlični med variira med 125,0 in 175,0 $\text{mg}_{\text{CAE}}/\text{kg}$ medu in za akacijev od 30,0 do 110,0 $\text{mg}_{\text{CAE}}/\text{kg}$ medu. Cvetlični med ima dvakrat večjo vsebnost fenolov v primerjavi z akacijevim. Zaključek raziskave navaja tudi podatek, da imajo industrijsko neobdelani in temnejši medovi višje vsebnosti fenolov od obdelanih in svetlejših vrst medu.

V turški pokrajini Anatoliji so skupne fenole določali v kostanjevem, cvetličnem in rododendronovem medu. Küçük in sod. (2007) so ugotovili, da je vsebnost skupnih fenolov v kostanjevem medu znatno večja kot v ostalih dveh vrstah medu. Rezultati omenjene študije z našimi analizami niso najboljše primerljivi. Zaradi slabe sezone (neprimerne vremenske razmere: količina padavin, veter in temperatura) kostanjev med slovenskega porekla letnika 2005 ni bil tipičen. Bil je svetlejši barve in manj izrazitega grenkega okusa, kot je zanj sicer značilno. Posledično je bila manjša tudi vsebnost skupnih fenolov.

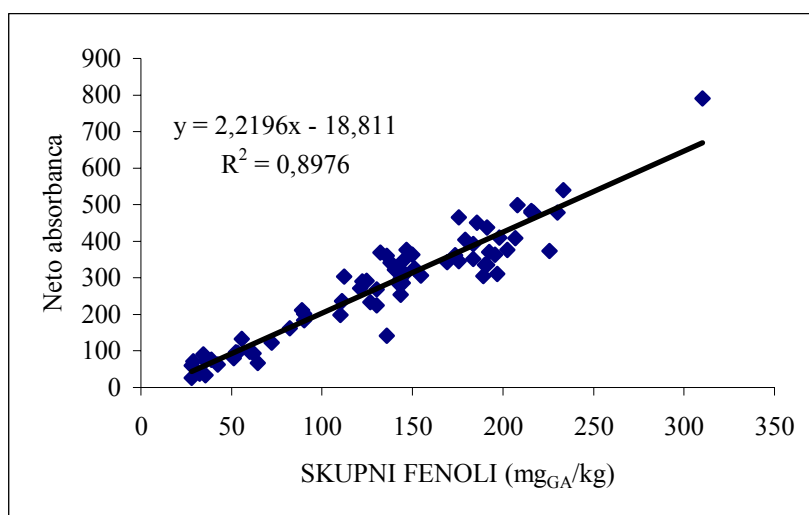
4.2.1 Zveza med barvo in vsebnostjo skupnih fenolov v medu

Slika 15 prikazuje odvisnost barve (parameter L^*) od vsebnosti skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto. Odnos med spremenljivkama opisuje linearni regresijski model $y = -0,1258x + 69,248$. Koeficient določitve (R^2) znaša 0,9082, kar pomeni da neodvisna spremenljivka vsebnost skupnih fenolov pojasnjuje 91 % variance parametra L^* . Vrednost korelacijskega koeficienta (R) v primeru linearne regresije znaša 0,95, kar kaže na močno povezanost med skupnimi fenoli in barvo medu oziroma parametra L^* .



Slika 15. Zveza med barvo in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu

Slika 16 prikazuje odvisnost neto absorbanca od vsebnosti skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto. Odnos med spremenljivkama vseh v raziskavo vključenih vzorcev opisuje linearni regresijski model $y = 2,2196x - 18,811$. Koeficient določitve (R^2) znaša 0,8976, kar pomeni da neodvisna spremenljivka vsebnost skupnih fenolov pojasnjuje 90 % variance neto absorbanca. Vrednost korelacijskega koeficienta (R) je 0,95, kar ponovno kaže na močno povezanost med skupnimi fenoli in barvo medu oziroma neto absorbanca.



Slika 16. Zveza med neto absorbanco in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu

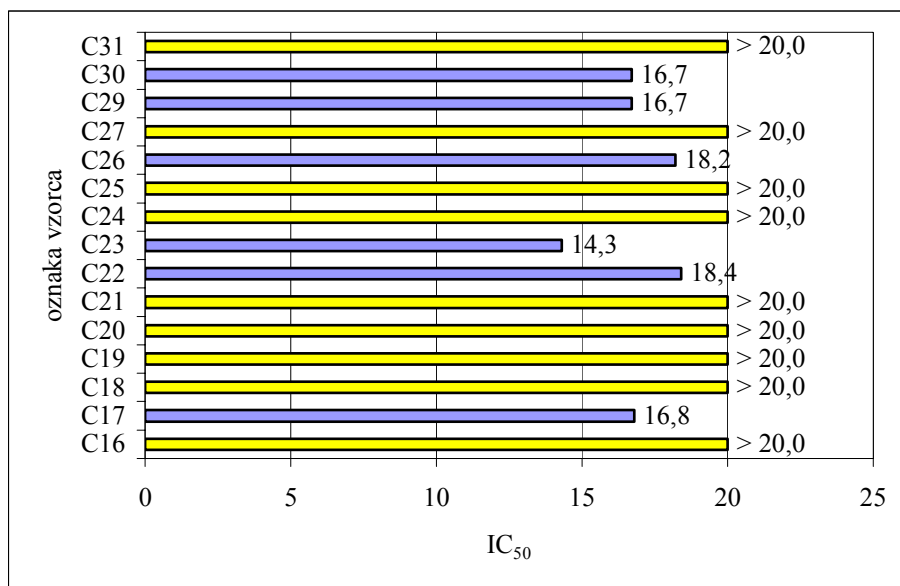
4.3 REZULTATI MERJENJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

4.3.1 Rezultati DPPH metode

Rezultati DPPH metode so za posamezne vrste medu grafično prikazani na slikah od 17 do 20. Sposobnost lovljenja radikala DPPH[•] je izražena kot IC₅₀. To je koncentracija antioksidanta, ki povzroči 50 % redukcijo radikala DPPH[•].

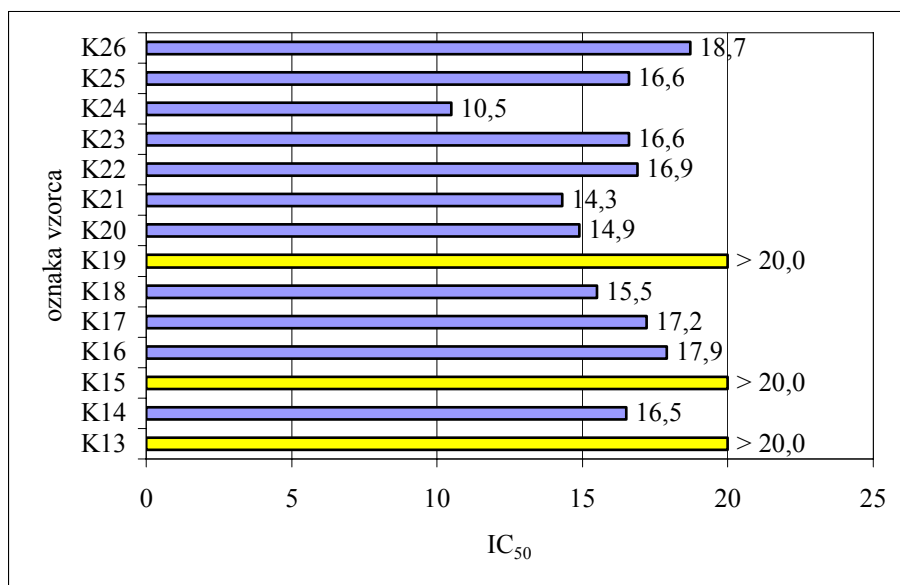
Vsi vzorci akacijevega medu dosežejo IC₅₀ šele pri koncentracijah večjih od 20,0 mg/ml, kar pomeni, da v okviru analize zgoraj navedenih vzorcev nismo mogli določiti točne koncentracije, ki povzroči 50 % redukcijo radikala DPPH[•]. To nam pove, da je antioksidativna aktivnost akacijevega medu najnižja v primerjavi z ostalimi štirimi vrstami medu, ki smo jih analizirali. Zaradi tega rezultati DPPH metode za akacijev med niso grafično prikazani.

Na sliki 17 je razvidno, da pri devetih vzorcih cvetličnega medu koncentracija 20 mg/ml ne zadošča za dosego 50 % inhibicijo radikala DPPH^{*}. Iz tega sledi, da imajo le-ti nizko AA. Najnižjo koncentracijo, ki je potrebna za 50 % inhibicijo radikala DPPH^{*} smo določili v vzorcu C23 in sicer 14,3 mg/ml, kar pomeni, da ima najvišjo AA med analiziranimi vzorci cvetličnega medu.



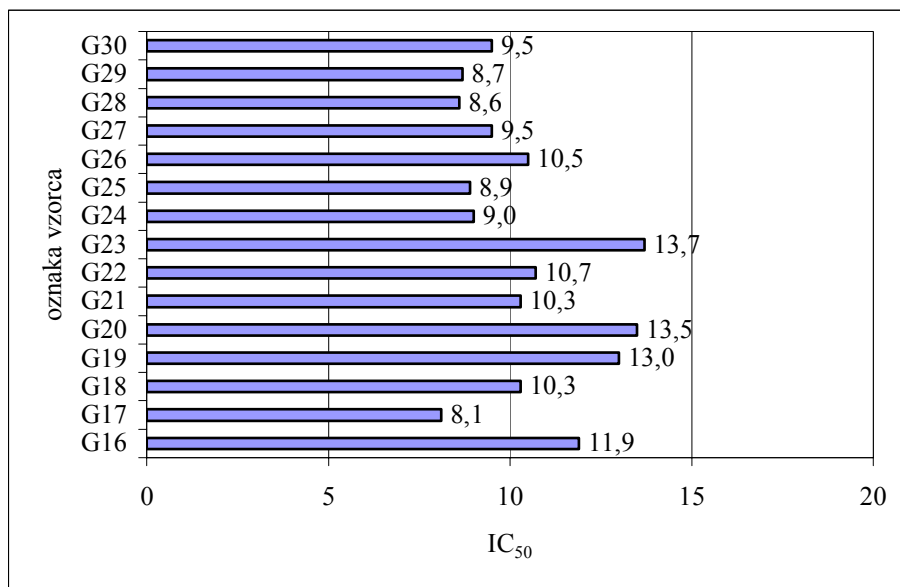
Slika 17. IC₅₀ vzorcev cvetličnega medu

Pri treh vzorcih kostanjevega medu (K13, K15 in K16) je IC₅₀ večja od 20,0 mg/ml. Najnižjo vrednost IC₅₀ smo izračunali vzorcu K24 in sicer 10,5 mg/ml. Iz tega sledi, da ima le-ta najvišjo AA med vzorci kostanjevega medu, izraženo kot sposobnost lovljenja radikalov.



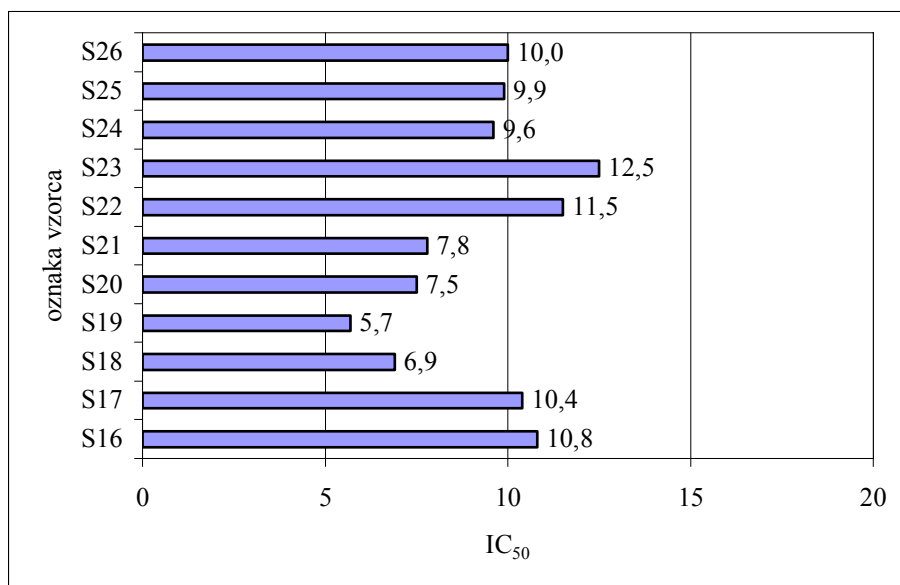
Slika 18. IC₅₀ vzorcev kostanjevega medu

Koncentracija vzorcev gozdnega medu, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH^{*} (slika 19), je med 8,1 in 13,7 mg/ml. Izračunana povprečna vrednost IC₅₀ znaša 10,4 mg/ml. To pomeni, da ima gozdni med večjo AA v primerjavi z akacijevim, cvetličnim in kostanjevim medom.



Slika 19. IC₅₀ vzorcev gozdnega medu

Vrednosti IC₅₀ za vzorce smrekovega medu (slika 20) se gibljejo med 5,7 in 12,5 mg/ml. Vrednosti koncentracij vzorcev smrekovega medu, ki povzročajo 50 % inhibicijo radikala DPPH^{*} oziroma IC₅₀, so najnižje med analiziranimi vrstami medu. Njihova povprečna vrednost znaša 9,3 mg/ml, kar pomeni, da ima smrekov med največjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z ostalimi štirimi vrstami medu.



Slika 20. IC₅₀ vzorcev smrekovega medu

Nadalje lahko povzamemo, da so vrednosti IC_{50} za posamezne analizirane vzorce pri vseh vrstah medu med seboj zelo različne. Najnižje vrednosti zasledimo pri smrekovem medu. To pomeni, da ima smrekov med največjo AA, izraženo kot sposobnost lovljenja radikalov. Sledijo gozdni, kostanjev, cvetlični in kot zadnji akacijev med z najnižjo AA, kateremu IC_{50} niti ne moremo določiti, saj so vse vrednosti IC_{50} večje od 20,0 mg/ml.

Rezultate AA slovenskih vrst medu lahko primerjamo s podatki o AA istih vrst medu iz tuje literature. Beretta in sod. (2005) navajajo najmanjšo AA, izraženo kot IC_{50} , za akacijev med, in sicer koncentracijo 45,45 mg/ml. Najnižjo IC_{50} , 4,0 mg/ml, ter s tem najvišjo AA pa ima ajdov med. Küçük in sod. (2007) so največjo AA ugotovili pri turškem kostanjevem medu, sledi cvetlični in kot zadnji rododendronov med. Nagai in sod. (2005) so pri japonskih medovih rezultate sposobnosti lovljenja radikalov izrazili v procentih. Izkazalo se je, da ima najvišjo AA ajdov med, najnižjo AA pa akacijev med.

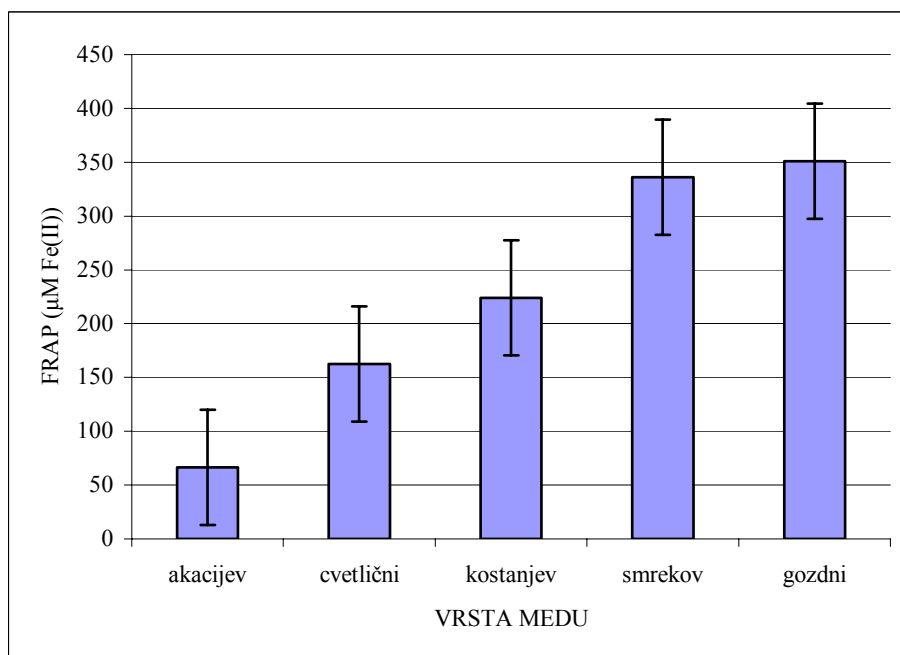
4.3.2 Rezultati določanja AA s FRAP metodo

V preglednici 16 in na sliki 21 so predstavljene FRAP vrednosti petih vrst slovenskega medu, izražene v $\mu\text{M Fe (II)}$ 10 % raztopine medu. Razvidno je, da najvišje FRAP vrednosti doseže gozdni med, in sicer znaša povprečna vrednost petnajstih vzorcev 350,9 $\mu\text{M Fe (II)}$, sledi smrekov med s 336,0, kostanjev s 223,8, cvetlični s 162,7 in akacijev med s samo 66,2 $\mu\text{M Fe (II)}$.

Preglednica 16. FRAP vrednosti za posamezne vrste medu z izračunanimi statističnimi parametri

VRSTA MEDU	n	\bar{x} $\mu\text{MFe(II)}$	X_{\min} $\mu\text{MFe(II)}$	X_{\max} $\mu\text{MFe(II)}$	SO	KV (%)
akacijev	17	66,2	34,6	106,5	17,1	25,8
cvetlični	15	162,7	118,4	218,9	31,8	19,5
gozdni	15	350,9	252,7	445,1	55,7	15,9
kostanjev	14	223,8	190,3	304,1	27,5	12,3
smrekov	11	336,0	276,5	400,8	39,0	11,6

n - število vzorcev, \bar{x} - povprečna vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SO - standardni odklon, KV - koeficient variabilnosti



Slika 21. Povprečne FRAP vrednosti za posamezne vrste medu s standardnimi odkloni

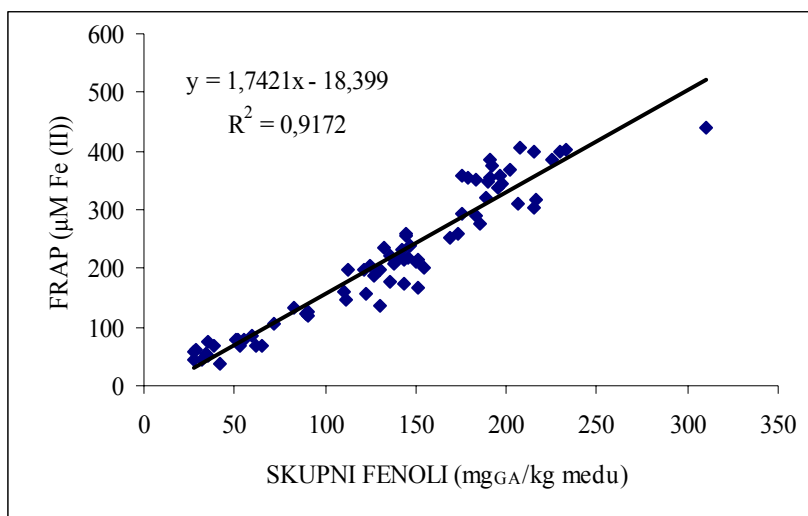
Beretta in sod. (2005) navajajo naslednje FRAP vrednosti: za gozdni med 772,0, kostanjev 388,6, cvetlični 361,9, in akacijev 79,5 $\mu\text{M Fe(II)}$. V primerjavi z analiziranimi vzorci slovenskega medu imajo vzorci italijanskega medu skoraj dvakrat višje FRAP vrednosti, vendar si posamezne vrste sledijo v enakem zaporedju kot slovenski med, z izjemo smrekovega medu, ki ga tuji avtorji niso analizirali. Najvišje FRAP vrednosti dosegajo vzorci gozdnega medu, sledijo kostanjev, cvetlični in z najnižjo FRAP vrednostjo vzorci

akacijevega medu. Blasa in sod. (2005) so primerjali rezultate med vzorci cvetličnega in akacijevega medu in prav tako prišli do zaključka, da imajo vzorci akacijevega medu nižje FRAP vrednosti. Küçük in sod. (2007) navajajo najvišjo antioksidativno moč redukcije železa pri turških kostanjevih medovih, sledijo cvetlični in rododendronovi.

4.3.2.1 Zveza med AA določeno s FRAP metodo in vsebnostjo skupnih fenolov

AA in vsebnost skupnih fenolov sta količini, ki smo ju določali neodvisno eno od druge in na nobeno od njiju nismo mogli vplivati. Hkrati vemo, da vsebnost fenolov neposredno vpliva na AA medu, zato smo določili skupne fenole za neodvisno spremenljivko (x), AA merjeno s FRAP metodo pa od skupnih fenolov odvisno spremenljivko (y).

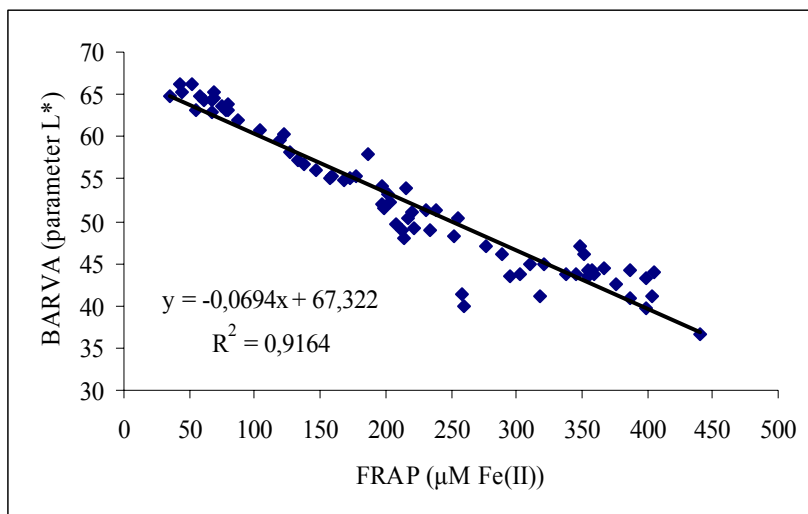
Slika 22 prikazuje zvezo med AA merjene s FRAP metodo in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto. Odnos med spremenljivkama vseh v raziskavo vključenih vzorcev medu, opisuje linearni regresijski model $y = 1,7421x - 18,399$. Koeficient določitve (R^2) znaša 0,9172, kar pomeni da neodvisna spremenljivka vsebnost skupnih fenolov pojasnjuje 92 % variance FRAP vrednosti. Vrednost korelacijskega koeficienta (R) znaša 0,96. To kaže na močno povezanost med vsebnostjo skupnih fenolov in antioksidativno močjo redukcije železovega iona.



Slika 22. Zveza med FRAP vrednostmi in vsebnostjo skupnih fenolov v analiziranih vzorcih medu

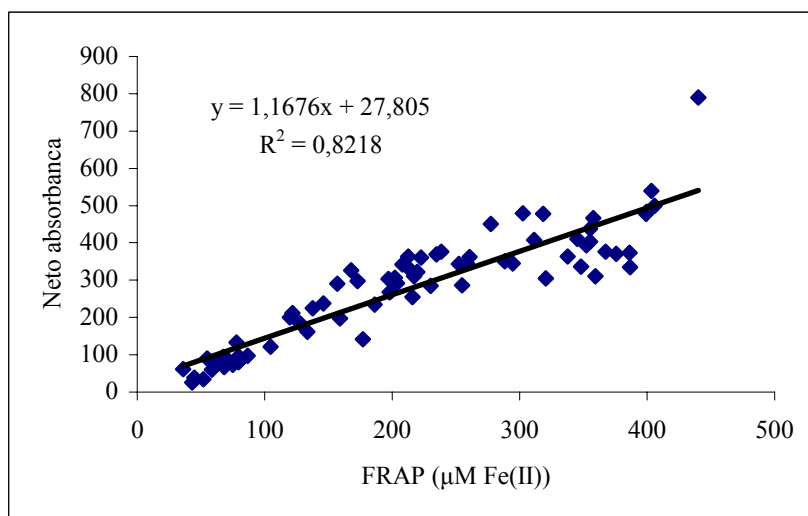
4.3.2.2 Zveza med barvo medu in AA določeno s FRAP metodo

Slika 23 prikazuje zvezo med barvo (parameter L*) in AA, določene s FRAP metodo v analiziranih vzorcih medu, ne glede na vrsto. Prikazan je linearni regresijski model $y = -0,0694x + 67,322$ z $R^2 = 0,9164$. Korelacijski koeficient (R) znaša 0,96 in pomeni močno povezavo med parametrom L* barve medu ter AA določeno s FRAP metodo.



Slika 23. Zveza med parametrom L* in AA, določeno s FRAP metodo v analiziranih vzorcih medu

Slika 24 podaja odnos med spremenljivkama vseh v raziskavo vključenih vrst medu in opisuje linearni regresijski model $y = 1,1676x + 27,805$. Koeficient določitve (R^2) znaša 0,8218, kar pomeni da neodvisna spremenljivka pojasnjuje 82 % variance AA. Vrednost korelacijskega koeficienta (R) v primeru linearne regresije znaša 0,91, kar kaže na tesno zvezo povezanost med neto absorbanco in AA določeno s FRAP metodo v posameznih vrstah medu.



Slika 24. Zveza med neto absorbanco in AA, določeno s FRAP metodo v analiziranih vzorcih medu

4.3.3 Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA

Na slikah od 25 do 29 so prikazane posamezne vrste medu s podanimi rezultati merjenja barve (parameter L^* in neto absorbanca), vsebnosti skupnih fenolov ter AA, določeno z DPPH in FRAP metodo.

4.3.3.1 Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za akacijev med



A32	A21	A22	A26	A27
$L^* = 66,1$	$L^* = 65,2$	$L^* = 64,7$	$L^* = 63,1$	$L^* = 63,1$
NetoA = 26,0	NetoA = 38,0	NetoA = 60,0	NetoA = 90,0	NetoA = 133,0
FC = 27,9 mg _{GA} /kg	FC = 32,3 mg _{GA} /kg	FC = 27,9 mg _{GA} /kg	FC = 34,6 mg _{GA} /kg	FC = 55,7 mg _{GA} /kg
IC ₅₀ = >20,0 mg/ml	IC ₅₀ = >20,0 mg/ml	IC ₅₀ = >20,0 mg/ml	IC ₅₀ = >20,0 mg/ml	IC ₅₀ = >20,0 mg/ml
FRAP = 43,2μMFe(II)	FRAP = 44,9μMFe(II)	FRAP = 58,6μMFe(II)	FRAP = 54,8μMFe(II)	FRAP = 77,8μMFe(II)

Slika 25. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA petih vzorcev akacijevga medu

Na sliki 25 so prikazani odtenki barv petih vzorcev akacijevga medu. Vrednosti parametra L^* se manjšajo od najsvetlejšega k najtemnejšemu vzorcu. Vrednosti neto absorbance se z naraščanjem intenzitete barve, ki je vidna na sliki, zvišujejo. A32, kot najsvetlejši vzorec, je imel vrednost 26,0, najtemnejši vzorec A27 pa 133,0. Vsebnost skupnih fenolov je bila v vzorcu A32 najmanjša, znašala je 27,9 mg_{GA}/kg, hkrati je bil ta vzorec najsvetlejši. Največ fenolov med ostalimi vzorci je imel najtemnejši vzorec A27, in sicer 55,7 mg_{GA}/kg. Koncentracija učinkovitosti v vseh petih vzorcih je presegala 20,0 mg/ml. Iz tega sledi, da je AA akacijevga medu zelo nizka, saj niti en vzorec ni dosegel 50 % inhibicije radikala DPPH^{*} pri tej koncentraciji. AA vzorcev določena s FRAP metodo pa je večinoma naraščala od najsvetlejšega do najtemnejšega vzorca. Iz navedenih podatkov lahko vidimo povezavo med barvo, vsebnostjo skupnih fenolov in AA, določeno z DPPH in FRAP

metodo. Svetlejši vzorci akacijevega medu imajo majhno vsebnost skupnih fenolov in hkrati nizko AA, temnejši imajo večjo vsebnost skupnih fenolov in posledično večjo AA.

4.3.3.2 Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za cvetlični med



Slika 26. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev cvetličnega medu

Slika 26 prikazuje barvne odtenke treh vzorcev cvetličnega medu. Najsvetlejši vzorec C31 ima najvišjo vrednost parametra L*, in sicer 59,7, sledi nekoliko temnejši vzorec C26 z vrednostjo 54,9 in najtemnejši vzorec C17, kateremu smo izmerili najnižjo vrednost parametra L*, 53,3. Najmanjšo vsebnost skupnih fenolov smo določili v vzorcu C31, 90,1 mg_{GA}/kg, ki je najsvetlejši, sledi vzorec C26 z 151,2 mg_{GA}/kg in vzorec C17 kot najtemnejši, doseže največjo vsebnost skupnih fenolov, 154,6 mg_{GA}/kg. IC₅₀ določena z DPPH metodo se zmanjšuje od najsvetlejšega do najtemnejšega vzorca, medtem ko AA določena s FRAP metodo narašča ob večanju intenzivnosti barve prikazanih vzorcev cvetličnega medu. Iz teh rezultatov lahko razberemo, da najsvetlejši vzorec vsebuje majhno vsebnost skupnih fenolov in ima najnižjo AA določeno s FRAP metodo. Vzorec C17, kot najtemnejši vzorec vsebuje največ skupnih fenolov, posledično je tudi AA tega vzorca najvišja.

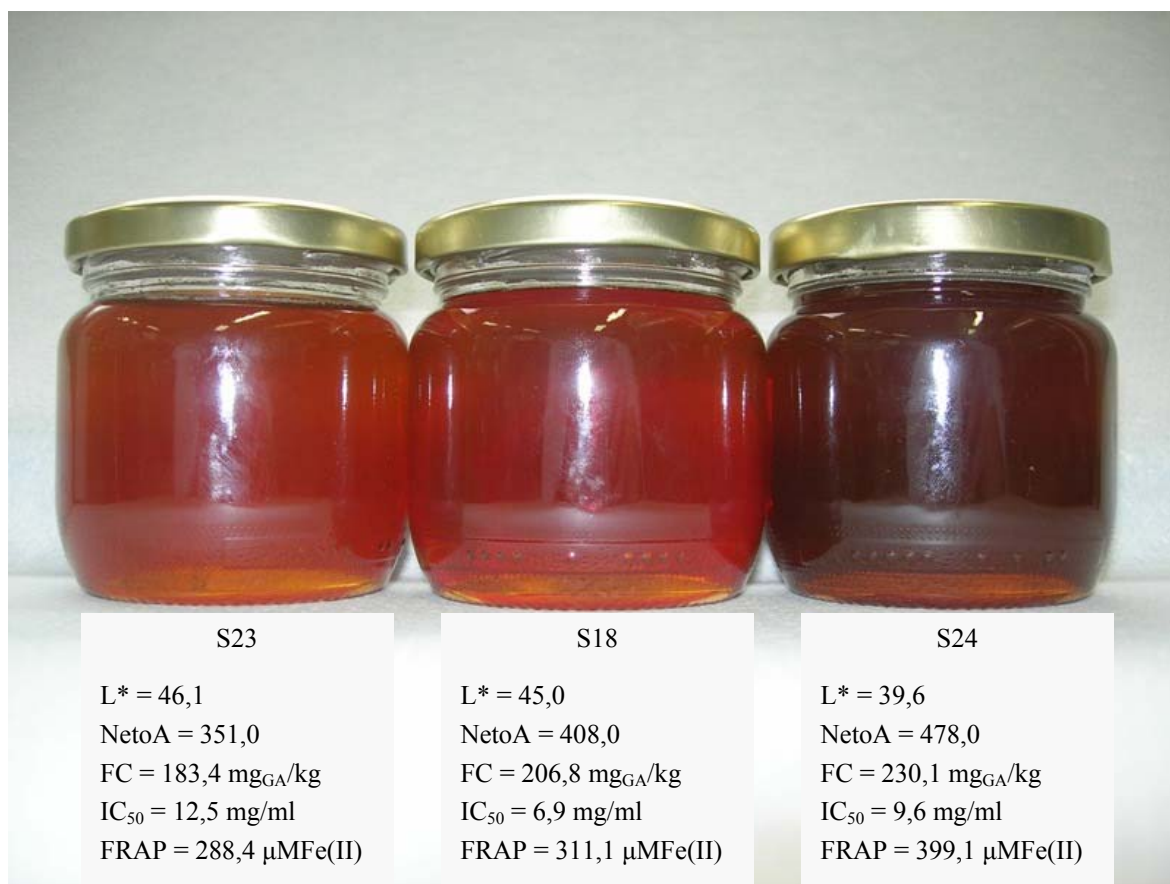
4.3.3.3 Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za kostanjev med



Slika 27. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev kostanjevega medu

Slika 27 prikazuje tri vzorce kostanjevega medu. Vrednosti parametra L* se znižujejo od najsvetlejšega vzorca K15 (51,9) k najtemnejšemu vzorcu K17 (48,3). Z naraščanjem intenzivnosti barve vzorcev, naraščajo tudi vrednosti neto absorbance. Najnižjo vsebnost skupnih fenolov je imel najsvetlejši vzorec K15, in sicer 112,3 mg_{GA}/kg, najvišjo, 169,0 mg_{GA}/kg pa najtemnejši vzorec K17. Sposobnost lovljenja prostih radikalov, izražena kot IC₅₀, se je zmanjšala z naraščanjem intenzivnosti barve. AA merjena po FRAP metodi je najnižja pri najsvetlejšem vzorcu K15, 197,0 μM Fe(II), nekoliko večja je bila v temnejšem vzorcu K22, 219,5 μM Fe(II), najtemnejši vzorec K17 pa je imel najvišjo AA, 252,1 μM Fe(II), kar je posledica največje vsebnosti skupnih fenolov v tem vzorcu.

4.3.3.4 Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za smrekov med



Slika 28. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev smrekovega medu

Slika 28 prikazuje tri vzorce smrekovega medu z različnimi odtenki barve. Vzorec S23 je najsvetlejši z največjo vrednostjo parametra L*, 46,1, sledi vzorec S18 z nekoliko nižjo vrednostjo parametra L*, 45,0. Najtemnejši vzorec smrekovega medu S24 je imel najnižjo vrednost parametra L*, 39,6. Vrednosti neto absorbanca spektrofotometričnega merjenja barve vzorcev smrekovega medu naraščajo od najsvetlejšega vzorca S23 z vrednostjo 351,0 do najtemnejšega vzorca S24, z neto absorbanco 478,0. Vsebnost skupnih fenolov, merjena po FC metodi, se prav tako povečuje od najsvetlejšega do najtemnejšega vzorca smrekovega medu. Najnižjo koncentracijo, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH[•] in se izraža kot IC₅₀, je imel vzorec S23, in sicer 12,5 mg/ml, vzorec S18 6,9 mg/ml ter vzorec S24 9,6 mg/ml. AA vzorcev, določena s FRAP metodo je naraščala z intenzivnostjo barve. Vzorec S23, kot najsvetlejši je imel najnižjo AA, in sicer 288,4, sledi vzorec S18 z 311,1 in najtemnejši vzorec S24, z najvišjo AA, 399,1 μM Fe(II).

4.3.3.5 Primerjava rezultatov merjenja barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA za gozdni med



Slika 29. Rezultati merjenja barve, skupnih fenolov in AA treh vzorcev gozdnega medu

Na sliki 29 so prikazani trije vzorci gozdnega medu, katerih intenzivnost barve narašča od leve proti desni. Vrednosti parametra L* se znižujejo od najsvetlejšega vzorca G19 z vrednostjo 50,3 k najtemnejšemu vzorcu G28 z vrednostjo 36,7, medtem ko vrednosti neto absorbance z naraščanjem intenzivnosti barve vzorcev naraščajo. Vsebnost skupnih fenolov je bila najmanjša v vzorcu G19 in je znašala 144,6 mg_{GA}/kg, sledita vzorca G17 z 207,9 mg_{GA}/kg in G18 z najvišjo vsebnostjo skupnih fenolov 310,1 mg_{GA}/kg. Pri vzorcu G19 je znašala IC₅₀, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH*, 13,0 mg/ml. Temnejša vzorca gozdnega medu sta imela nižjo IC₅₀, 8,1 oziroma 8,6 mg/ml. AA določena po FRAP metodi je bila najnižja pri najsvetlejšem vzorcu G19 in je znašala 254,8, sledi vzorec G17 z višjo AA, 405,9 in kot zadnji, najtemnejši vzorec G28, ki je imel najvišjo AA, 440,0 μM Fe(II).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Eksperimentalni del raziskave je obsegal vrednotenje barve medu ter kvantitativno določitev skupnih fenolov v medu in njegovo antioksidativno aktivnost. Vsi vzorci petih vrst medu (akacijev, cvetlični, kostanjev, smrekov in gozdni) so bili letnika 2005. Iz rezultatov podanih v preglednicah od 11 do 16 in na slikah od 9 do 24 lahko izpeljemo določene ugotovitve in potrdimo začetna predvidevanja o medsebojnih povezavah med analiziranimi parametri.

Barvo medu smo merili instrumentalno s pomočjo kromometra Minolta v CIE L^* , a^* in b^* sistemu, ki je splošno znan sistem za merjenje barve živil. Parameter L^* določa svetlost živila, parameter a^* intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem, parameter b^* pa intenziteto rumene barve v pozitivnem in modre v negativnem območju.

Povprečne vrednosti parametra L^* v vzorcih medu so se gibale od 64,0 pri akacijevem medu do 43,1 pri gozdnem medu. Najvišje vrednosti parametra L^* je imel akacijev med, ki je med vsemi vrstami tudi najsvetlejši, kar je razvidno že na pogled. Vzorci gozdnega medu so bili najtemnejši in imeli največji interval izmerjenih vrednosti in najvišji koeficient variabilnosti ($KV=7,0\%$), kar potrjuje raznolikost v svetlosti te vrste medu. Med analiziranimi vrstami medu je bila najvišja povprečna vrednost parametra a^* izmerjena v gozdnem medu (9,4), kar pomeni, da je bil med vsemi vrstami najintenzivneje rdeče obarvan. Negativno povprečno vrednost parametra a^* smo dobili pri akacijevem medu, in sicer -2,2, kar pomeni, da pri tej vrsti medu prevladuje zelena barva. Največjo intenzivnost rumene barve je imel cvetlični med, saj smo tej vrsti medu izmerili največjo povprečno vrednost parametra b^* , in sicer 40,9. Nektar cvetočih rastlin je poln karotenoidnih pigmentov, kar ima za posledico intenzivno rumeno obarvanje te vrste medu. Sledili so kostanjev (40,7), smrekov (35,6), gozdni (34,1) in akacijev (18,3) med. Pri nobeni vrsti medu nismo dobili negativnih vrednosti, kar smo tudi pričakovali, saj bi morebitne negativne vrednosti pomenile prisotnost modre barve, ki pa je za med neznačilna. Statistična obdelava rezultatov merjenja barve medu (parametri L^* , a^* in b^*) nam pove, da se posamezne vrste medu statistično značilno ne razlikujejo. Levenov test homogenosti varianc vseh vzorcev analiziranih vrst medu podaja signifikance, ki so manjše od izbrane meje tveganja (0,05), kar je onemogočalo nadaljnjo analizo variance, saj so vzorci nehomogeni.

Primerjava vrednosti parametrov L^* , a^* in b^* naših vrst medu s podatki iz tuje in slovenske literature je pokazala, da se le-te razlikujejo. Povprečne vrednosti parametra L^* so bile pri analiziranih vzorcih slovenskega cvetličnega medu letnikov 2000 in 2001, 44,97, nižje od vrednosti slovenskega cvetličnega medu letnika 2005, 55,9. V primerjavi z vzorci poljskega cvetličnega medu, Piotraszewska-Pajak in Ciszak (2001) navajajo višjo vrednost parametra L^* , in sicer 60,15. Pri akacijevem medu opazimo, da je bila naša izmerjena povprečna vrednost parametra L^* , 64,0 višja od vzorcev poljskega akacijevga medu, 53,10 ter slovenskih vzorcev letnikov 2000 in 2001 (61,26), kar pomeni, da je bil povprečen vzorec akacijevga medu letnika 2005 svetlejši. Poleg tega Zupančič (2002)

navaja nižje vrednosti za slovenski gozdni, kostanjev in smrekov med letnikov 2000 in 2001. Iz zgoraj navedenih podatkov razberemo, da so bili vzorci gozdnega, kostanjevega in smrekovega medu, letnika 2005, svetlejši. To je verjetno posledica spremenljivih sezonskih razmer (količina padavin, temperaturna nihanja) in vsebnosti pigmentov v samih rastlinah. Razlike so vidne tudi v vrednostih parametra a^* , ki določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem območju. Negativne vrednosti parametra a^* so izmerili Pietraszewska-Pajak in Ciszak (2001) v poljskem akacijevem in cvetličnem medu, in sicer -2,71 oz. -2,40. Vrednosti akacijevnega in cvetličnega medu letnika 2005 so bile v primerjavi s poljskimi za malenkost nižje, -2,2 oz. -0,07. Tudi v slovenskem akacijevem medu letnikov 2000 in 2001 so izmerili negativno vrednost parametra a^* , vrednost je znašala -2,83, pri cvetličnem pa pozitivno, in sicer 4,43. Vrednosti parametra a^* slovenskega gozdnega, kostanjevega in smrekovega medu letnika 2005 so bile v primerjavi z vzorci slovenskega medu letnikov 2000 in 2001, za malenkost višje (večja intenziteta rdeče barve). V primerjavi z vrednostjo parametra a^* kostanjevega medu letnikov 2000 in 2001 ter španskega kostanjevega medu, kjer vrednosti parametra a^* znašata 8,50 oziroma 23,76, je bila izmerjena vrednost parametra a^* kostanjevega medu letnika 2005 izredno nizka, le 4,3, kar lahko nakazuje na netipičnost te vrste za leto 2005. Vidne so tudi razlike v vrednostih parametra b^* , ki določa intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre barve v negativnem območju. V naših analiziranih vrstah medu negativnih vrednosti nismo izmerili, ravno tako jih ne zasledimo v tuji in domači literaturi. Negativne vrednosti bi pomenile prisotnost modre barve, kar je za med neznačilno. Primerjava slovenskih vrst medu letnika 2005 ter letnikov 2000 in 2001 (Zupančič, 2002) je pokazala, da so bile v vseh vrstah, razen pri akacijevih analiziranih vzorcih, vrednosti parametra b^* višje (vsebujejo več rumene barve).

S spektrofotometričnim merjenjem barve vzorcev analiziranih vrst medu smo dobili najvišjo povprečno vrednost neto absorbance za vzorce gozdnega (433,1) medu, sledili so smrekov (381,7), kostanjev (335,6), cvetlični (238,5) in akacijev med (77,4). Beretta in sod. (2005) so v italijanskem kostanjevem in cvetličnem medu izmerili skoraj dvakrat višje vrednosti neto absorbance od naših vrednosti, kar gre pripisati različnosti vzorcev in vplivom geoklimatskih dejavnikov, ki vplivajo na sam razvoj rastline in posledično na tvorbo pigmentov. Višje vrednosti neto absorbance imajo temnejše vrste medu, nižje pa dosežejo svetlejši medovi. Slednje je pogojeno z vsebnostjo pigmentov (karotenoidi, ksantofili, klorofili, antocinini) v medu.

Opravili smo tudi korelacijsko analizo med parametrom L^* in neto absorbanco, ki je pokazala tesno zvezo ($R = 0,92$) med metodama določanja barve posameznih vrst medu. To pomeni, da sta spremenljivki med seboj v obratnosorazmerni povezavi (višja ko je vrednost parametra L^* medu, nižjo vrednost neto absorbance ima – med je svetlejši ali obratno nižja ko je vrednost parametra L^* medu, višjo vrednost neto absorbance doseže, med je temnejši).

Vsebnost skupnih fenolov smo določali s pomočjo modificirane Folin-Ciocalteujeve metode. Rezultate podajamo v mg galne kisline na kg medu. Največ skupnih fenolov smo določili v gozdnem in smrekovem medu z vsebnostjo 199,0 oz. 195,8 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu, nato v kostanjevem, 143,5 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu, cvetličnem, 121,7 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu in akacijevem, ki je med vsemi vrstami medu vseboval najmanj fenolov, le 45,7 $\text{mg}_{\text{GA}}/\text{kg}$ medu.

V primerjavi z rezultati za ameriški akacijev med (Gheldof in Engeseth, 2002), kjer je vsebnost skupnih fenolov 46,0 mg_{GA}/kg medu, imajo slovenski vzorci iste vrste skoraj enako vsebnost skupnih fenolov. Naše rezultate smo najlažje primerjali z rezultati Berette in sod. (2005), saj smo po njih povzeli princip določanja vsebnosti skupnih fenolov. V italijanskih vrstah medov so izmerili nekoliko večje vsebnosti fenolov v primerjavi z našimi, in sicer italijani za gozdni med podajajo povprečno vrednost 255,6 mg_{GA}/kg medu, za kostanjev 211,2 mg_{GA}/kg medu, cvetlični 170,4 mg_{GA}/kg medu in akacijev med 55,2 mg_{GA}/kg medu. Primerjava z ostalimi študijami (Al-Mamary in sod., 2002; Küçük in sod., 2007) je manj primerna, ker avtorji uporabljajo različne metode določanja vsebnosti skupnih fenolov, poleg tega dobljene rezultate izražajo na več načinov npr. mg_{CE}/kg medu ali mg_{katehina}/kg medu. Obstoječe razlike lahko razložimo tudi z dejstvom, da je vsebnost skupnih fenolov v medu pogojena z vrsto rastline ter geoklimatskimi dejavniki, ki vplivajo na tvorbo sekundarnih metabolitov v rastlini in končno tudi na vsebnost teh antioksidativnih učinkovin v posamezni vrsti medu.

S korelacijsko analizo smo primerjali barvo medu (parameter L* in neto absorbanca) v odvisnosti od vsebnosti skupnih fenolov in prišli do zaključka, da sta tudi ti dve spremenljivki v močni povezavi. To je pokazal korelacijski koeficient (R = 0,95). Iz linearne povezave lahko razberemo, da svetlejšje vrste medu (visoke vrednosti parametra L*, nizke vrednosti neto absorbanc) vsebujejo manj skupnih fenolov ali obratno, temnejše vrste medu so bogatejše s skupnimi fenoli.

AA vzorcev slovenskih vrst medu smo določali z DPPH in FRAP metodo. Z DPPH metodo določamo AA kot sposobnost lovljenja radikalov. Rezultate posameznih meritev smo grafično prikazali in ugotovili, da imajo vzorci smrekovega medu najnižje vrednosti IC₅₀ (koncentracija učinkovitosti), kar pomeni, da najhitreje dosežejo 50 % inhibicijo radikala DPPH*. Iz tega sledi, da ima smrekov med najvišjo AA. Sledijo vzorci gozdnega, kostanjevega in cvetličnega medu. Najnižjo AA smo določili vzorcem akacijevga medu, pri katerih niti najvišja koncentracija, 20,0 mg/ml, ni zadostovala za dosego 50 % inhibicije radikala DPPH*. Tudi rezultati AA tujih vrst medu kažejo, da ima akacijev med najnižjo AA (Beretta in sod., 2005; Nagai in sod., 2005), kostanjev pa najvišjo AA (Küçük in sod., 2007).

Druga metoda merjenja AA nam na podlagi izmerjenih FRAP vrednosti, izraženih v μM Fe(II) 10 % raztopine medu, prikaže, da so imeli vzorci gozdnega medu, 350,9, najvišjo AA, za malenkost nižjo vzorci smrekovega, 336,0, sledili so kostanjevi, 223,8, cvetlični, 162,7 in kot zadnji vzorci akacijevga medu, z najnižjo AA. Naši rezultati so v primerjavi z vzorci istih vrst italijanskega medu nekoliko nižji (Beretta in sod., 2005). Posamezne vrste si sicer sledijo po padajoči AA v enakem vrstnem redu kot slovenske vrste medu, z izjemo smrekovega medu, ki ga italijanski avtorji niso analizirali. Küçük in sod. (2007) so za turški kostanjev med grafično prikazali najvišjo FRAP vrednost (visoka AA) v primerjavi s cvetličnim in rododendronovim, ki imata nižjo (nizka AA).

Tesne zveze med AA, določeno s FRAP metodo, in vsebnostjo skupnih fenolov ter barvo medu (parameter L* in neto absorbanca), lepo prikazujejo visoki korelacijski koeficienti (R = 0,96, R = 0,96, R = 0,91). Vsebnost skupnih fenolov v medu neposredno vpliva na njegovo AA. Linearni regresijski model je jasno pokazal, da višja ko je vsebnost skupnih fenolov v medu, večja je njegova AA. Zvezo med barvo in AA nam prikazujeta slika 23 (višja je vrednost parametra L*, svetlejši je med in manjša je njegova AA, nižja je FRAP

vrednost) in slika 24 (višja je neto absorbanca, temnejši je med in večja je njegova AA, višja je FRAP vrednost).

Na slikah od 25 do 29 so prikazani vzorci za posamezno vrsto analiziranega medu letnika 2005 s pripadajočimi rezultati metod določanja barve, skupnih fenolov in AA. Iz navedenih podatkov lahko izpeljemo določene ugotovitve in potrdimo začetna predvidevanja medsebojnih povezav. Iz vseh podatkov lahko vidimo, da ima najvišje vrednosti parametra L^* akacijev med, kar pomeni, da je med analiziranimi vrstami medu najsvetlejši. Sledijo vzorci z nižjimi vrednostmi parametra L^* , in sicer cvetlični, kostanjev, smrekov in gozdni med. Vrednosti parametra L^* so si pri smrekovem in gozdnem medu precej podobne, kar se opazi že na sam pogled. Intenzivnost barve vzorca S23 je večja od G19, kar se odraža na ostalih merjenih vrednostih, kot so skupni fenoli in AA. Neto absorbanca lepo narašča od najsvetlejših vzorcev akacijevega medu do najtemnejših vzorcev gozdnega medu. Najnižjo vsebnost skupnih fenolov imajo vzorci akacijevega medu. Višje vsebnosti skupnih fenolov imajo vzorci cvetličnega medu, sledijo kostanjev, smrekov in gozdni med. Naraščanje skupnih fenolov vzorcev sovпада z naraščanjem intenzivnosti barve po enakem vrstnem redu.

5.2 SKLEPI

Na podlagi eksperimentalnih meritev barve, vsebnosti skupnih fenolov in AA petih vrst medu (akacijevega, cvetličnega, gozdnega, kostanjevega in smrekovega) ter rezultatov regresijske in korelacijske analize, povzemamo naslednje sklepe:

- Izmed vseh analiziranih vrst medu je akacijev najsvetlejši, z najvišjo povprečno vrednostjo parametra L^* , 64,0, najtemnejši pa gozdni, z najnižjo povprečno vrednostjo parametra L^* , 43,1. Največjo vrednost parametra a^* imajo vzorci gozdnega medu, 9,4, najmanjšo pa vzorci kostanjevega s povprečno vrednostjo parametra a^* , 4,3. Pri akacijevem in cvetličnem medu smo izmerili negativno povprečno vrednost parametra a^* , in sicer -2,2 za akacijev med in -0,07 za cvetlični med. Cvetlični med ima največjo povprečno vrednost parametra b^* , 40,9, najmanjšo pa akacijev s povprečno vrednostjo 18,3.
- Spektrofotometrično določanje barve medu podaja najvišjo povprečno neto absorbanco, 433,1, za najtemnejši gozdni med, najnižjo, 77,4, pa za najsvetlejši akacijev med.
- Med parametrom L^* in neto absorbanco analiziranih vzorcev medu, obstaja linearni regresijski model $y = -0,052x + 66,873$ in korelacijski koeficient 0,92, ki nakazuje močno povezavo med obema spremenljivkama. Svetlejše vrste medu z visokimi vrednostmi parametra L^* imajo nižje vrednosti neto absorbance.
- Med posameznimi vrstami medu ni opaziti statistično značilnih razlik v vrednostih L^* , a^* , b^* parametrov, neto absorbanca, vsebnosti skupnih fenolov in FRAP vrednostmi. Levenov test homogenosti varianc podaja signifikance manjše od izbrane meje tveganja 0,05, kar kaže na nehomogenost izbranih vzorcev v merjenih parametrih.

- Največ skupnih fenolov, 199,0 mg_{GA}/kg medu, določenih z modificirano FC metodo, ima gozdni med, najmanj pa akacijev, 45,7 mg_{GA}/kg medu.
- Korelacijski analizi barve medu (parameter L* in neto absorbanca) v odvisnosti od vsebnosti skupnih fenolov prikazujeta linearna regresijska modela, in sicer za prvo odvisnost $y = -0,1258x + 69,248$ s korelacijskim koeficientom $R = 0,95$ ter za drugo odvisnost $y = 2,2196x - 18,811$ s korelacijskim koeficientom $R = 0,95$. Korelacijska koeficienta v obeh primerih kažeta močno zvezo med barvo in vsebnostjo skupnih fenolov v medu. V obeh primerih velja, da imajo svetlejšje vrste medu manjšo vsebnost skupnih fenolov.
- Pri vseh vzorcih akacijevga medu tudi najvišje koncentracije (20,0 mg/ml) ne zadoščajo za dosego 50 % inhibicije radikala DPPH[•], kar onemogoča določitev koncentracije učinkovitosti (IC₅₀). Iz tega sledi, da je AA akacijevga medu zelo nizka. Največjo sposobnost lovljenja radikalov ima smrekov med. IC₅₀ za vzorce smrekovega medu znašajo od 5,7 do 12,5 mg/ml.
- Najvišjo AA, določeno s FRAP metodo, ima gozdni med, 350,9, najnižjo pa akacijev med, 66,2 μM Fe(II) za 10 % raztopino medu.
- Vsebnost skupnih fenolov v medu neposredno vpliva na njegovo AA. Močno zvezo med AA, merjeno po FRAP metodi in vsebnostjo skupnih fenolov v medu, prikazuje linearna zveza $y = 1,7421x + 18,399$ s korelacijskim koeficientom $R = 0,96$, ki pove, da je z večjo vsebnostjo skupnih fenolov v medu, večja tudi njegova AA.
- Linearni regresijski model $y = -0,0694x + 67,322$ prikazuje odvisnost AA vseh analiziranih vzorcev medu od parametra L* s korelacijskim koeficientom $R = 0,96$. Ta kaže močno zvezo med omenjenima spremenljivkama. Ravno tako linearna zveza ($y = 1,1676x + 27,805$) med AA vzorcev posameznih vrst medu in neto absorbanco prikazuje močno zvezo ($R = 0,91$). Iz modelov razberemo, da je pri višji vrednosti parametra L* (svetle vrste medu) nižja AA medu (nizke FRAP vrednosti) ter pri višji neto absorbanci (temnejše vrste medu) višja AA medu (visoke FRAP vrednosti).

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil določiti barvo, vsebnost skupnih fenolov in antioksidativno aktivnost petim vrstam (akacijev, cvetlični, gozdni, kostanjev in smrekov) medu letnika 2005, ter poiskati povezave med obravnavanimi parametri.

Barvo medu smo instrumentalno določili s pomočjo kromometra Minolta v CIE L*, a* in b* sistemu. Najvišjo povprečno vrednost parametra L* ima najsvetlejši akacijev med in sicer 64,0. Izmerjena negativna vrednost parametra a* pri tej vrsti medu znaša -2,2 in pomeni prisotnost zelene barve. V primerjavi z ostalimi vrstami medu ima akacijev med najnižjo intenziteto rumene barve, kar nam kaže najnižja vrednost parametra b*, ki znaša 18,3. Najnižjo povprečno vrednost parametra L*, 43,1 ima najtemnejši gozdni med, ki je hkrati najintenzivneje rdeče obarvan. Njegova povprečna vrednost parametra a* je 9,4, parametra b* pa 34,1. Največjo intenzivnost rumene barve smo določili cvetličnemu in kostanjevem medu, kar lahko razložimo, da visoka vsebnost karotenoidnih pigmentov v teh dveh vrstah medu prispeva k visoki povprečni vrednosti parametra b*, 40,9. Spektrofotometrično določanje barve medu nam podaja najvišjo povprečno vrednost neto absorbance za najtemnejši gozdni med, sledijo smrekov, kostanjev, cvetlični in kot najsvetlejši akacijev med, z najnižjo povprečno vrednostjo neto absorbance.

Vsebnost skupnih fenolov smo določali s pomočjo modificirane Folin Ciocalteujeve metode. Rezultati kažejo, da največ skupnih fenolov vsebujeta gozdni in smrekov med. Vrednosti znašata 199,0 in 195,8 mg_{GA}/kg medu. Barva teh dveh vrst medu je najtemnejša. Sledijo kostanjev, cvetlični in akacijev, ki so svetlejša barva. Vse korelacijske analize pokažejo močno zvezo med parametri določanja barve in vsebnostjo skupnih fenolov. To pomeni, da temnejše vrste medu vsebujejo več skupnih fenolov, svetlejša vrsta pa so siromašnejša na vsebnosti fenolnih spojin.

AA smo izbranim vrstam medu določali z DPPH in FRAP metodo. Ugotovili smo, da ima smrekov med najvišjo AA, izraženo kot sposobnost lovljenja prostih radikalov. Sledijo gozdni, kostanjev, cvetlični in akacijev med. AA posameznih vrst medu je izražena z IC₅₀ (koncentracija učinkovitosti, ki je potrebna za 50 % inhibicijo radikala DPPH[•]). Na podlagi izmerjenih FRAP vrednosti, izraženih v μM Fe(II) 10 % raztopine medu, ima gozdni med najvišjo AA, sledi smrekov, kostanjev, cvetlični in akacijev med.

Korelacijske analize med AA, vsebnostjo skupnih fenolov in barvo medu kažejo močne zveze med obstoječimi spremenljivkami. AA medu je odvisna od vsebnosti skupnih fenolov. Z večjo vsebnostjo le-teh, se AA povečuje. Odvisna pa je tudi od intenzivnosti barve medu. Temnejši je med, večja je njegova AA.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da temnejše vrste medu vsebujejo več skupnih fenolov in imajo tako posledično višjo AA, svetlejša vrsta medu pa imajo manjšo vsebnost skupnih fenolov kar vodi do manjše AA medu.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-36
- Al-Mamary M., Al-Meerri A., Al-Habori M. 2002. Antioxidant activities and total phenolic of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 9: 1041-1047
- Aljadi A.M., Kamaruddin M.Y. 2004. Evaluation of phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 4: 513-518
- Anklam E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 4: 549-562
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198
- Anupama D., Bhat K.K., Sapna V.K. 2003. Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*, 36: 183-191
- Aparna A.R., Rajalakshmi D. 1999. Honey - its characteristics, sensory aspects, and applications. *Food Review International*, 15, 4: 455-471
- Baltrušaitytė V., Rimantas Venskutonis P., Čeksterytė V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101, 2: 502-514
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 292: 70-76
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 2: 185-191
- Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 7-12
- Božnar A., Senegačnik J. 1998. Med. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 376-413
- Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piera Piacentini M., Albertini M. C., Piatti E. 2005. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 2: 217-222

- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH^{*} free radical method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30, 6: 609-615
- Brücker F. 1984. Farb - Beurteilung von Flüssigkeiten. *Fette, Seifen. Anstrichmittel*, 89: 167-171
- Dobčnik D. 2000. Vaje iz instrumentalne kemijske analize. Ponatis. Maribor, Založništvo Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 45-48
- Ezdravje: Vitamini in minerali: Prosti radikali. 2006. Novo Mesto, Krka d.d. (maj 2005) <http://www.ezdravje.com/si/vitmin/vitamini/radikali/> (avgust 2006): 1 str.
- Extrasynthese: Products. 2006. Lyon Nord, Extrasynthese: pure chemical manufacturer extraction and synthesis of pure chemical – Green Label's (Januar 2002) <http://www.extrasynthese.com/codeart.asp> (September, 2006): 1-4
- 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
- Gamaley I.A., Klysubin I.V. 1999. Roles of reactive oxygen species signalig and regulation of cellular functions. *International Review of Cytology*: 188: 203-255
- 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
- Golob T., Bertoncej J., Škrabanja V. 2002. Sensory characteristics of Slovenian honey. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani: Kmetijstvo*, 79, 2: 381-389
- Gonzales-Miret M.L., Terrab A., Hernanz D., Fernandez-Recamales M.A., Heredia F.J. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7: 2574-2580
- Gutteridge J.M.C, Halliwell B. 1994. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford, Oxford University Press: 143-143
- HunterLab color scale: CIE L*a*b* color scale. 1996. Reston, HunterLab (July 1996) http://www.hunterlab.com/appnotes/an07_96a.pdf (September 2006): 1-4 str.
- Johnston J.E., Sepe H.A., Miano C.L., Brannan R.G., Alderton A.L. 2005. Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. *Meat Science*, 70: 627-631

- Kaur C., Kapoor H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables - the millenium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu Ş., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100,2: 526-534
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., Bacandritsos N., Sabatini A.G. 2004. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering*, 64: 9-21
- Logar N. 2002. Določanje rutina v vzorcih zrnja ajde, ajdove moke in testenin. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 4-4
- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 3: 571-577
- Merc: Products: DPPH, free radical. 2006. Darmstadt, Calbiochem. (May 2006)
<http://www.merckbiosciences.co.uk/Products/ProductDisplay.asp?catno=30267&>
(September 2006): 1 str.
- Molan P.C. 2001. Potencial of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2, 1: 13-19
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219
- Nagai T., Inoue R., Kanamori N., Suzuki N., Nagashima T. 2005. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry*, 97, 2: 256-262
- Pereyra Gonzales A., Burin L., Pilar Buera M. 1999. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, 32: 185-191
- Persano Oddo L., Piro R., Bruneau E., Guyot-Declerck C., Ivanov T., Piškulova J., Flamini C., Lheritier J., Morlot M., Russmann H., Von Der Ohe W., Von Der Ohe K., Gotsiou P., Karabournioti S., Kefalas P., Passaloglou-Katrali M., Thrasyvoulou A., Tsigouri A., Marcazzan G.L., Piana M.L., Piazza M.G., Sabatini A.G., Kerkvliet J., Godinho J., Bentabol A., Ortiz Valbuena A., Bogdanov S., Ruoff K. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35: 38-81

Piotraszewska-Pajak A., Ciszak S. 2001. The influence of botanical origin on sugar composition, acidity and colour of nectar honeys. V: Commodity science in global quality perspective: Products-Technology, Quality and Environment. Vol.1. 13th IGWT Symposium, 2nd-8th september 2001. Denac M., Musil V., Pregrad B. (eds.). Maribor, Ekonomsko-poslovna fakulteta: 705-710

Properties of honey: Honey color. 2005. Longmont, National Honey Board (May, 2005)
<http://www.nhb.org/download/factsht/color.pdf> (August, 2006): 2 str.

Roginsky V., Lissi E.A. 2004. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92, 2: 235-254

Stanojevič M. 2003. Fenolni in flavonoidni antioksidanti naravnega izvora. Ljubljana, Slovenski kemijski portal. (januar 1999)
http://www.fkkt.org/aktualno/2003_002.asp (avgust 2006): 1 str.

Taormina P.J., Niemira B.A., Beuchat L.R. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. International Journal of Food Microbiology, 69,3: 217-225

Terrab A., Escudero M.L., Gonzáles-Miret M.L., Heredia F.J. 2004. Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: a multivariate study. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 380-386

Terrab A., Díez M.J., Heredia F.J. 2002. Chromatic characterisation of moroccan honeys by diffuse reflectance and tristimulus colorimetry - non-uniform and uniform colour spaces. Food Science and Technology, 8, 4: 189-195

Tomás-Barberán F.A., Martos I., Ferreres F., Radovic B.S., Anklam E. 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 485-496

Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu Y.S. 2005. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. Food Chemistry, 95, 4: 653-657

United States Standards for grades of extracted honey. 5 iss. 1985. Washington, United States Department of Agriculture: 11 str.

Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114

Zupančič L. 2002. Barva, elektrolitska prevodnost in vsebnost pepela v medu. Diplomski naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3, 5, 31-37

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

ZAHVALA

Prva zahvala gre mojim dragim staršem, ki so me tekom študija spodbujali, znova in znova razumeli in me hkrati tudi materialno podpirali tekom celotnega študijskega obdobja.

Iskrena hvala mentorici prof. Tereziji Golob in recenzentki prof. Veroniki Abram za strokovno pomoč, neprecenljive nasvete ter njuno izredno prijaznost.

Hvala asistentki Jasni Bertoncelej za uvajanje v laboratorijsko delo ter usmerjanje v samem začetku nastajanja diplomske naloge. Hvala za njeno izredno potrpežljivost in skrb.

Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki Eleni Kenda Majerič ter mladima raziskovalkama Urški Doberšek in Mojci Jamnik za vso ustrežljivost, pomoč in prijetne klepete v času mojega eksperimentalnega dela.

Hvala Barbari Slemenik in Ivici Hočevar pri iskanju literature in urejanju virov.

Marjanu, Tomažu, Andreju in Blažu srčna hvala za iznajdljivost, posodabljanje programske opreme ter pomoč pri odpravljanju težav z mojim računalnikom.

Hvala tudi teti Doroteji, družini Hegedič, Janiju, Marini, Staši, Tanji, Sandri, cimrama Petri in Mateji.

Še enkrat iskrena hvala vsem, ki ste mi v teh letih na kakršenkoli način pomagali priti do cilja..

PRILOGE

Priloga. E. Povprečne vrednosti L*, a*, b* parametra, neto absorbance, vsebnosti skupnih fenolov ter vrednosti AA merjene po DPPH in FRAP metodi vzorcev petih vrst medu

VRSTA	VZOREC	L*	a*	b*	NetoA	FC (mg _{GA} /kg)	DPPH (IC ₅₀)	FRAP (μM Fe(II))
A	16	63,8	-1,7	14,7	80,0	51,2	> 20,0	79,7
A	17	65,2	-3,9	29,5	93,0	62,3	> 20,0	69,1
A	18	66,3	-0,8	7,3	34,0	35,7	> 20,0	51,8
A	19	64,3	-2,2	14,6	67,0	64,6	> 20,0	68,0
A	20	64,5	-3,4	20,7	76,0	39,0	> 20,0	68,9
A	21	65,2	-1,2	9,6	38,0	32,3	> 20,0	44,9
A	22	64,7	-1,6	14,6	60,0	27,9	> 20,0	58,6
A	23	64,4	-1,5	13,7	72,0	29,0	> 20,0	60,5
A	24	63,6	-1,9	17,6	73,0	35,7	> 20,0	74,9
A	25	64,8	-1,7	11,9	62,0	42,3	> 20,0	35,9
A	26	63,1	-3,6	23,4	90,0	34,6	> 20,0	54,8
A	27	63,1	-4,4	31,7	133,0	55,7	> 20,0	77,8
A	28	60,8	-2,1	25,9	122,0	72,3	> 20,0	104,6
A	29	63,1	-2,5	22,7	96,0	52,3	> 20,0	79,4
A	30	61,9	-3,1	24,1	98,0	60,1	> 20,0	86,5
A	31	63,0	-2,0	23,4	95,0	53,4	> 20,0	67,5
A	32	66,1	-0,5	6,2	26,0	27,9	> 20,0	43,2
C	16	60,3	-4,7	50,7	212,0	89,0	> 20,0	121,9
C	17	53,3	3,1	45,1	306,0	154,6	16,8	202,2
C	18	57,9	-0,7	43,1	234,0	126,8	> 20,0	186,2
C	19	55,1	-0,6	40,7	298,0	143,4	> 20,0	172,6
C	20	55,3	-1,1	34,3	141,0	135,7	> 20,0	177,0
C	21	58,1	-1,1	35,9	184,0	90,1	> 20,0	127,5
C	22	55,4	0,0	39,5	198,0	110,1	18,4	159,2
C	23	50,3	4,4	43,1	310,0	145,7	14,3	217,3
C	24	56,0	0,8	39,8	237,0	111,2	> 20,0	146,2
C	25	57,3	-0,3	34,6	162,0	82,3	> 20,0	133,3
C	26	54,9	0,8	44,8	326,0	151,2	18,2	167,8
C	27	55,0	-1,2	37,6	290,0	122,3	> 20,0	156,8
C	29	53,8	2,7	43,7	254,0	143,4	16,7	215,7
C	30	56,8	-0,3	41,9	225,0	130,1	16,7	137,8
C	31	59,7	-3,3	38,5	201,0	90,1	> 20,0	119,5
G	16	43,7	9,8	35,7	363,0	195,7	11,9	337,5
G	17	43,9	10,6	35,3	499,0	207,9	8,1	405,9
G	18	46,0	8,8	37,9	393,0	183,4	10,3	352,1
G	19	50,3	5,2	40,8	286,0	144,6	13,0	254,8
G	20	39,9	8,1	29,5	362,0	173,4	13,5	260,7
G	21	44,2	9,9	35,2	335,0	191,2	10,3	386,7
G	22	43,2	10,2	35,4	483,0	215,7	10,7	399,7
G	23	41,3	6,1	29,2	345,0	144,6	13,7	258,7
G	24	44,5	7,6	34,8	376,0	202,3	9,0	367,5

se nadaljuje...

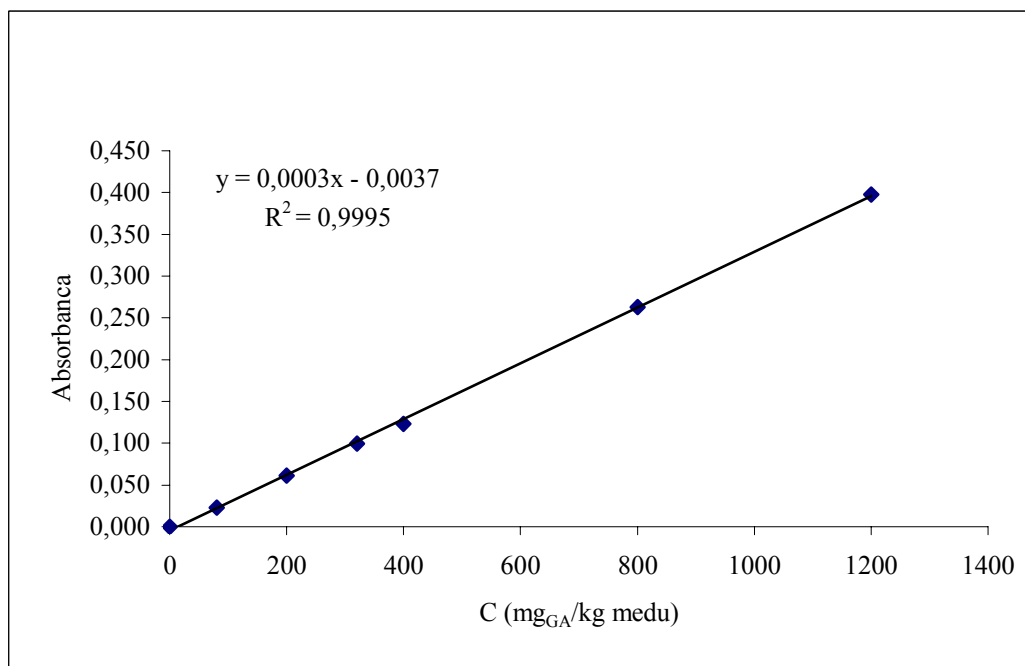
nadaljevanje priloge A. Povprečne vrednosti L*, a*, b* parametra, neto absorbance, vsebnosti skupnih fenolov ter vrednosti AA merjene po DPPH in FRAP metodi vzorcev petih vrst medu

VRSTA	VZOREC	L*	a*	b*	NetoA	FC (mg _{GA} /kg)	DPPH (IC ₅₀)	FRAP (μM Fe(II))
G	25	42,5	9,7	33,2	370,0	192,3	8,9	375,7
G	26	44,3	9,8	36,3	466,0	175,7	10,5	357,8
G	27	43,8	9,8	37,4	410,0	197,9	9,5	345,1
G	28	36,7	15,2	25,8	790,0	310,1	8,6	440,0
G	29	41,2	10,8	33,2	540,0	233,4	8,7	403,3
G	30	41,1	10,1	32,2	478,0	216,8	9,5	318,6
K	13	51,5	1,7	39,7	271,0	121,2	> 20,0	199,1
K	14	49,0	5,6	41,1	369,0	132,3	16,5	234,6
K	15	51,9	3,1	41,9	303,0	112,3	> 20,0	197,0
K	16	49,0	6,2	41,8	363,0	150,1	17,9	212,7
K	17	48,3	6,6	41,5	343,0	169,0	17,2	252,1
K	18	48,1	3,7	37,5	326,0	151,2	15,5	214,8
K	19	54,1	2,0	43,7	268,0	130,1	> 20,0	198,0
K	20	49,1	5,5	40,1	360,0	135,7	14,9	222,4
K	21	51,4	3,8	41,3	376,0	146,8	14,3	238,3
K	22	51,1	1,4	40,5	322,0	140,1	16,9	219,5
K	23	51,4	3,2	40,8	285,0	142,3	16,6	230,2
K	24	43,7	10,3	35,7	479,0	215,7	10,5	302,6
K	25	49,6	3,9	40,0	342,0	137,9	16,6	208,0
K	26	52,3	2,9	44,3	292,0	124,6	18,7	203,8
S	16	47,0	6,6	38,9	336,0	190,1	10,8	348,3
S	17	43,7	8,4	33,3	310,0	196,8	10,4	359,4
S	18	45,0	9,4	37,8	408,0	206,8	6,9	311,1
S	19	47,1	7,1	40,9	451,0	185,7	5,7	277,5
S	20	43,5	8,4	35,1	345,0	175,7	7,5	294,6
S	21	40,8	10,6	31,9	373,0	225,7	7,8	386,4
S	22	45,0	9,1	35,6	305,0	189,0	11,5	320,7
S	23	46,1	7,0	37,6	351,0	183,4	12,5	288,4
S	24	39,6	11,1	29,8	478,0	230,1	9,6	399,1
S	25	43,5	12,2	35,7	438,0	191,2	9,9	355,4
S	26	44,1	10,3	35,6	404,0	179,0	10,0	355,4

Priloga F. Podatki za umeritveno krivuljo določanja vsebnosti skupnih fenolov

C (mg _{GA} /kg medu)	A ₁	A ₂	\bar{A}
0	0,000	0,000	0,000
80	0,023	0,023	0,023
200	0,061	0,061	0,061
320	0,100	0,099	0,100
400	0,126	0,121	0,124
800	0,265	0,261	0,263
1200	0,398	0,397	0,398

\bar{A} - povprečna vrednost absorbc A_1 in A_2

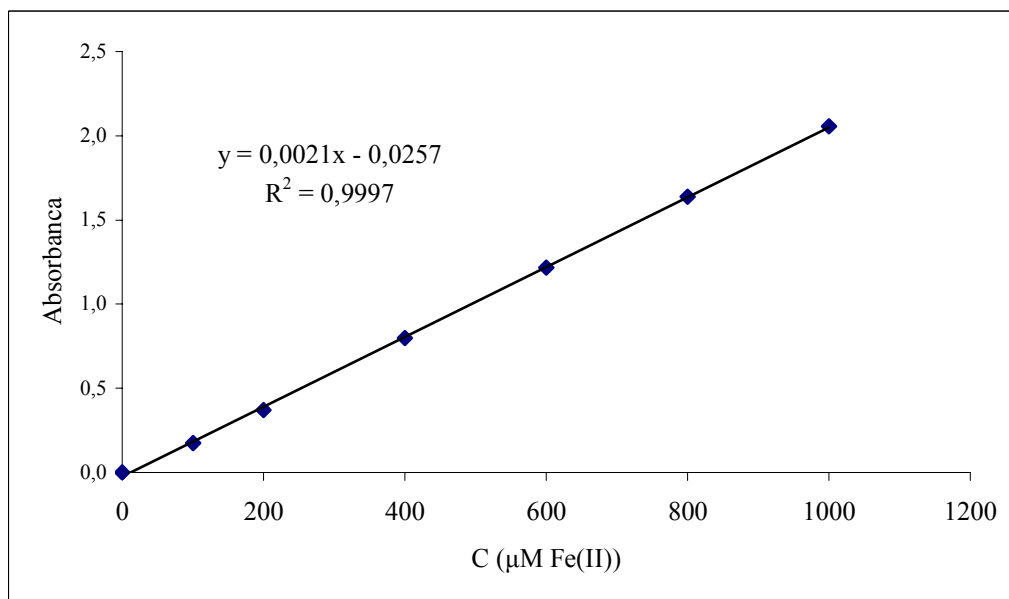


Priloga B1. Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolov (odvisnost absorbance od koncentracije, izražene kot mg galne kisline na kg medu)

Priloga G. Podatki za umeritveno krivuljo določanja AA po FRAP metodi

C ($\mu\text{M Fe(II)}$)	A_1	A_2	\bar{A}
0	0,000	0,000	0,000
100	0,181	0,169	0,175
200	0,369	0,372	0,371
400	0,787	0,812	0,800
600	1,224	1,210	1,217
800	1,616	1,662	1,639
1000	2,050	2,065	2,058

\bar{A} - povprečna vrednost absorbc A_1 in A_2



Priloga C1. Umeritvena krivulja za določanje AA po FRAP metodi (odvisnost absorbanca od koncentracije Fe(II))

Priloga H. Rezultati merjenja AA vzorca gozdnega medu G19 po metodi DPPH

C (mg/ml)	A ₁	A ₂	A _{POV.}	A _{SL}	preostali DPPH (%)
0	0,786	0,786	0,786	0,000	100,0
1	0,750	0,757	0,754	0,004	95,4
2	0,724	0,725	0,725	0,007	91,3
4	0,668	0,668	0,668	0,011	83,6
6	0,607	0,613	0,610	0,018	75,3
8	0,567	0,568	0,568	0,024	69,1
10	0,490	0,499	0,495	0,030	59,1
12	0,463	0,467	0,465	0,035	54,7
14	0,403	0,411	0,407	0,042	46,4
16	0,355	0,364	0,360	0,047	39,8
18	0,305	0,307	0,306	0,054	32,1
20	0,245	0,236	0,241	0,061	22,8

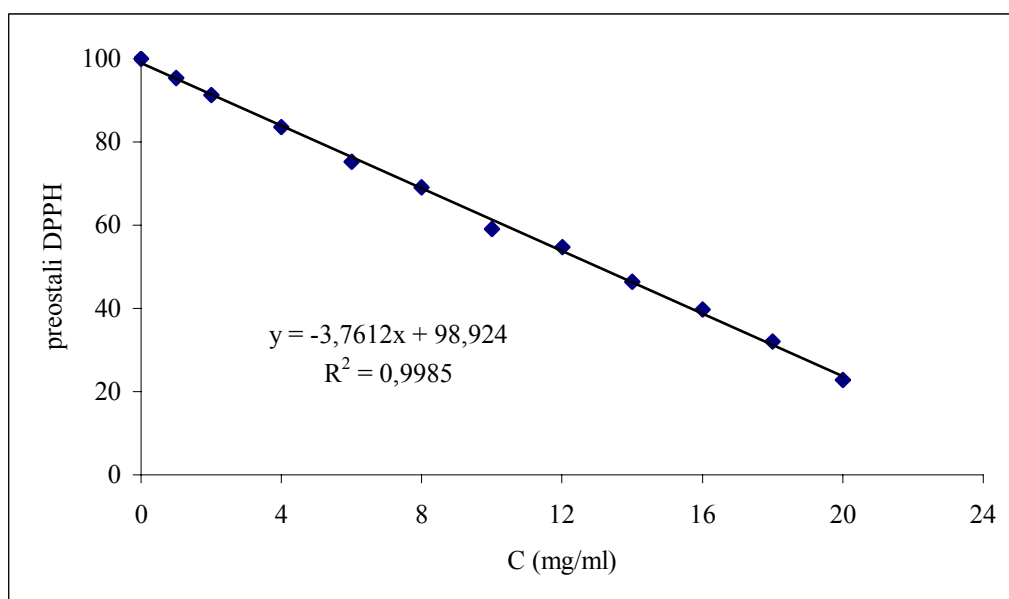
A_{POV.}... absorbanca povprečnega vzorca medu

A_K..... absorbanca kontrolnega vzorca

A_{SL}..... absorbanca slepega vzorca

Primer izračuna preostalega DPPH v % v vzorcu G19:

$$\text{preostali DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{POV}} - A_{\text{SL}}}{A_{\text{K}}} \times 100 = \frac{0,754 - 0,004}{0,786} \times 100 = 95,4$$



Priloga D1. Odvisnost preostalega DPPH (%) od koncentracije medu

Primer izračuna IC₅₀ za vzorec G19 iz enačbe premice:

$$y = -3,7612x + 98,924$$

$$y = 50,0$$

$$x = \text{IC}_{50} = 13,0 \text{ mg/ml}$$

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nataša ŠENK

**VREDNOTENJE MEDU: ZVEZA MED BARVO MEDU
IN ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOSTJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

