

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mojca KOROŠEC

**DOLOŽITEV FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH PARAMETROV ZA  
UGOTAVLJANJE PRISTNOSTI MEDU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DETERMINATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS  
FOR VERIFYING THE HONEY AUTHENTICITY**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2012

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 14. septembra 2007 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Terezija Golob in za somentorico prof. dr. Nives Ogrinc.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, v laboratorijih Katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil in Katedre za tehnologijo rastlinskih živil, prehrano in vino, kjer so bile opravljene analize osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov in sestave ogljikovih hidratov. Analiza profila aminokislin je bila opravljena v laboratoriju Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke v Ljubljani. Analize vsebnosti ogljikovih in dušikovih stabilnih izotopov v medu so bile izvedene na Odseku za znanosti o okolju Instituta »Jožef Stefan«, na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij pa je bila analizirana vsebnost elementov z metodo rentgenske fluorescenčne spektrometrije s popolnim odbojem (TXRF). Statistična obdelava podatkov je bila opravljena na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: prof. dr. Nives Ogrinc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rajko Vidrih  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Ilan: prof. dr. Nives Ogrinc  
Institut »Jožef Stefan«, Odsek za znanosti o okolju

Ilan: prof. dr. Janko Božič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka:  
Mojca Korošec

## KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd  
DK UDK 638.165.8 (497.4):638.162:543.61:543.544(043)=163.6  
KG med / sladkorni sirupi / pristnost medu / botani ni izvor / Slovenija / sestava ogljikovih hidratov / HILIC / izotopsko razmerje /  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  / IRMS / sestava aminokislin / HPLC / kemijski elementi / rentgenska fluorescenca na spektroskopija s popolnim odbojem / TXRF / fizikalno-kemijske lastnosti / električna prevodnost / pH / proste in skupne kisline / hidroksimetilfurfural / HMF / prolin / beljakovine / diastazno število / rotacija / korelacije  
AV KOROŠEC, Mojca, univ. dipl. inž. živil. tehnol.  
SA GOLOB, Terezija (mentorica) / OGRINC, Nives (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva  
LI 2012  
IN DOLO ITEV FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH PARAMETROV ZA UGOTAVLJANJE PRISTNOSTI MEDU  
TD Doktorska disertacija s področja živilstva  
OP XVII, 148 str., 35 pregl., 44 sl., 11 pril., 174 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V raziskavo je bilo vključeno 379 vzorcev medu in 4 vzorci sladkornih sirupov: 230 vzorcev medu smo dobili neposredno od slovenskih čebelarjev, 70 vzorcev različnega porekla smo vzorili v trgovinah, in 79 modelnih potrjenih vzorcev, ki smo jim vmešali od 1 do 20 % delež sladkornih sirupov. Med je bil različnega botanika izvora in pridelan v Sloveniji oziroma v tujini. Vzorcem smo določili vrednosti osnovnih parametrov kakovosti medu: vsebnost vode, prostih in skupnih kislin, laktonov, HMF, prolina in beljakovin, električna prevodnost, pH, aktivnost diastaze in specifična rotacija. Z metodo tekoinske kromatografije z masno detekcijo (LC-MS) smo v vzorcih določili vsebnost fruktoze, glukoze, saharoze, turanoze, palatinoze, maltoze, gentibioze in melibioze, melicitoze, erloze, rafinoze, maltotrioze, panoze in izomaltotrioze. Vsebnost 14 aminokislin smo določili s tekoinsko kromatografijo visoke ločljivosti in UV detekcijo. Metoda določila izotopskega razmerja z masno spektroskopijo (IRMS) smo uporabili za določitev vrednosti  $\delta^{13}\text{C}$  v medu in v proteinih, izoliranih iz medu, v katerih smo določili tudi vrednost  $\delta^{15}\text{N}$ . Elementno sestavo vzorcev medu smo določili z rentgensko fluorescenca na spektroskopijo s popolnim odbojem (TXRF). Na osnovi definiranih mejnih vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov smo ovrednotili kakovost vzorcev in označili neustrezne oziroma tiste s sumom na potvorbo. Poleg uradno predpisanih parametrov smo za pomembne pokazatelje kakovosti medu določili še:  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , nekatere di- in tri-saharide, aminokislino in elemente, razmerja med saharidi in vsoto aminokislin. S statističnimi metodami smo ugotavljali, kako vrsta in količina dodanega sirupa vplivata na spremembo parametrov kakovosti medu. Razlike med vrstami slovenskega medu v sestavi aminokislin oziroma ogljikovih hidratov smo potrdili z ANOVO in s Kruskal-Wallisovim testom rangov. S *t*-testom smo potrdili nekaj statističnih razlik med slovenskim in tujim medom iste vrste. Multivariatni testi so pokazali, da se z izbranimi fizikalno-kemijskimi parametri in s statističnimi testi modelni potrjeni vzorci medu s 4 % dodanega sirupa in več, dobro ločijo od pristnih vzorcev iste vrste.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 638.165.8 (497.4):638.162:543.61:543.544(043)=163.6  
CX honeys / sugar syrups / authenticity of honey / botanical origin / Slovenia / carbohydrate composition / HILIC / isotope ratio /  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  / IRMS / amino acid composition / HPLC / chemical elements / total reflection X-ray spectroscopy / TXRF / physico-chemical properties / electrical conductivity / pH / free and total acids / hydroxymethylfurfural / HMF / proline / proteins / diastase number / rotation / correlations  
AU KOROŠEC, Mojca  
AA GOLOB, Terezija (supervisor) / OGRINC, Nives (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Food Science and Technology  
PY 2012  
TI DETERMINATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS FOR VERIFICATION OF HONEY AUTHENTICITY  
DT Doctoral dissertation  
NO XVII, 148 p., 35 tab., 44 fig., 11 ann., 174 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The study comprised 379 samples of honey and 4 samples of sugar syrup: 230 honey samples were obtained directly from the Slovenian beekeepers, 70 samples of different origins were sampled in stores, and 79 samples were adulterated with 1 to 20% addition of sugar syrup. Honey was of different botanical origin, and produced in Slovenia and abroad. In samples the basic parameters of honey quality were assessed: the content of water, free and total acids, lactones, HMF, proline and protein, the electrical conductivity, pH, diastase activity and specific optical rotation. The method of liquid chromatography with mass detection (LC-MS) was applied for examination of the content of fructose, glucose, sucrose, turanose, palatinose, maltose, gentiobiose and melibiose, melizitose, erlose, raffinose, maltotriose, panose and isomaltotriose in honey samples. The content of 14 amino acids was determined by high performance liquid chromatography and UV detection. The isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) method was used for determination of the value of  $\delta^{13}\text{C}$  in honey and proteins isolated from the honey, in which also the value of  $\delta^{15}\text{N}$  was determined. Elemental composition of honey was determined by X-ray fluorescence spectroscopy with total reflection (TXRF). The quality of analysed honey samples was evaluated with respect to the defined limit values and deficient or samples suspected of being adulterated were indicated.  $^{13}\text{C}_{\text{honey}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{protein}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , selected di- and tri-saccharides, amino acids and elements, saccharide ratios and sum of amino acids were identified as important parameters for honey quality control besides legally defined ones. With the statistical methods the effect of the type and amount of added syrup on honey quality parameters was studied. ANOVA test showed differences among the Slovenian honey types in the composition of amino acids and carbohydrates; more differences were confirmed with Kruskal-Wallis test. The *t*-test confirmed a statistically significant difference between the Slovenian and foreign honey of the same type. Multivariate tests showed that the selected physico-chemical parameters and applied statistical tests enable differentiation among adulterated model honey samples with 4% or more syrup addition and authentic honey of the same type.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJU NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>XI</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XIV</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE .....	1
1.2 NAMEN DELA .....	1
1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 MED .....	4
<b>2.1.1 Sestava medu in njegove lastnosti .....</b>	<b>6</b>
2.1.1.1 Fizikalno-kemijski parametri medu, določeni v Pravilniku o medu (2011).....	6
2.1.1.2 Drugi fizikalno-kemijski parametri medu, ki niso opredeljeni z zakonodajo ..	11
2.1.1.3 Fizikalne lastnosti medu .....	16
2.1.1.4 Senzorne lastnosti medu .....	17
2.1.1.5 Melisopolinološke lastnosti medu .....	18
2.2 PRISTNOST ŽIVIL .....	19
2.3 PRISTNOST MEDU .....	22
<b>2.3.1 Pristnost medu z vidika njegove proizvodnje .....</b>	<b>23</b>
2.3.1.1 Metode za preverjanje pristnosti medu zaradi vplivov med njegovo proizvodnjo.....	24
<b>2.3.2 Pristnost medu z ozirom na označbo .....</b>	<b>26</b>
2.3.2.1 Pristnost medu in označba botaničnega porekla.....	27
2.3.2.1.1 Metode za preverjanje pristnosti označbe botaničnega porekla.....	27
2.3.2.2 Pristnost medu in označba geografskega porekla.....	28
2.3.2.2.1 Metode za preverjanje ustreznosti označbe geografskega porekla.....	28
<b>2.3.3 Kemometrijske metode .....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>31</b>
3.1 VZORCI .....	31
<b>3.1.1 Med .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2 Sladkorni sirupi .....</b>	<b>34</b>
3.2 SENZORI NA ANALIZI MEDU .....	35
<b>3.2.1 Kvalitativna senzori na analizo .....</b>	<b>35</b>

<b>3.2.2</b>	<b>Kvantitativna deskriptivna analiza.....</b>	<b>35</b>
3.3	DOLO ANJE VSEBNOSTI OGLJIKOVIH HIDRATOV Z METODO LC-MS.....	36
3.4	DOLO ANJE RAZMERIJ IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA V MEDU IN NJEGOVIH FRAKCIJAH.....	38
<b>3.4.1</b>	<b>Določanje razmerja <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> v medu (SCIRA – Stable Isotope Ratio Analysis) (AOAC 998.12, 1999).....</b>	<b>38</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Določanje <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> v proteinih medu (ISCIRA – Internal Standard Isotope Ratio Analysis) (AOAC 998.12, 1999).....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Določanje razmerja <math>^{15}\text{N}/^{14}\text{N}</math> v proteinih medu.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Določanje razmerja <math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> v frakcijah fruktoze, glukoze, disaharidov in trisaharidov medu (Elflein in Ræzke, 2008).....</b>	<b>41</b>
3.5	DOLO ANJE VSEBNOSTI AMINOKISLIN V MEDU Z METODO HPLC (BERNAL IN SOD., 2005).....	42
3.6	DOLO ANJE IZBRANIH FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH PARAMETROV KAKOVOSTI V MEDU.....	46
<b>3.6.1</b>	<b>Vsebnost vode – refraktometrično določanje (AOAC 969.38, 1999).....</b>	<b>46</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Električna prevodnost ( ) – konduktometrično določanje.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Vrednost pH in skupne (titrabilne) kisline - titrimetrična metoda (AOAC 962.19, 1999).....</b>	<b>46</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Aktivnost diastaze – fotometrično določanje (AOAC 958.09, 2011).....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Vsebnost prolina – fotometrično določanje (po Oughu, modificirana metoda po Bogdanovu in sod., 2009).....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.6</b>	<b>Vsebnost beljakovin – posredno določanje prek dušika (po Kjeldahlu) (AOAC 962.18, 1999).....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.7</b>	<b>Vsebnost saharoze – polarimetrično določanje (AOAC 920.184, 1999)....</b>	<b>49</b>
<b>3.6.8</b>	<b>Specifična optična rotacija (Bogdanov in sod., 2009).....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.9</b>	<b>Določanje vsebnosti elementov z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo s totalnim odbojem (TXRF).....</b>	<b>50</b>
3.7	STATISTIČNA ANALIZA.....	52
<b>3.7.1</b>	<b>Opisna statistična analiza.....</b>	<b>52</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Bivariatna analiza.....</b>	<b>52</b>
3.7.2.1	Relacijska analiza (Košmelj, 2007).....	52
3.7.2.2	Analiza primerjav dveh ali več neodvisnih vzorcev.....	53
<b>3.7.3</b>	<b>Multivariatna analiza.....</b>	<b>54</b>
3.7.3.1	Razvrščanje v skupine.....	54
3.7.3.2	Faktorska analiza.....	55
3.7.3.3	Diskriminantna analiza.....	55
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>57</b>
4.1	REZULTATI OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV.....	57
<b>4.1.1</b>	<b>Rezultati analiz osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov v pristnem medu.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Rezultati analiz osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov v namerno potvorjenih vzorcih.....</b>	<b>61</b>

<b>4.1.3</b>	<b>Rezultati analiz osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov trgovinskih vzorcev .....</b>	<b>67</b>
4.2	VSEBNOST OGLJIKOVIH HIDRATOV DOLO ENA Z METODO LC-MS .....	71
4.2.1	Vsebnost ogljikovih hidratov v pristnih vzorcih medu .....	71
4.2.2	Razmerja med ogljikovimi hidrati v pristnih vzorcih medu in drugi izra unani parametri.....	77
4.2.3	Zveze med analiziranimi in izra unanimi parametri ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu .....	80
4.2.4	Vsebnost ogljikovih hidratov v namerno potvorjenih vzorcih medu .....	82
4.2.5	Rezultati multivariatne analize analitskih in izra unanih parametrov ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu .....	86
4.2.6	Rezultati multivariatne analize analitskih in izra unanih parametrov ogljikovih hidratov v vzorcih potvorjenega medu.....	87
4.3	REZULTATI ANALIZE IZOTOPSKIH PARAMETROV .....	88
4.3.1	Rezultati analize izotopskih parametrov ogljika in dušika v vzorcih pristnega medu.....	88
4.3.2	Rezultati analize izotopskih parametrov ogljika in dušika v vzorcih potvorjenega medu .....	91
4.3.3	Rezultati analize izotopskih parametrov ogljika in dušika v vzorcih medu iz trgovin .....	93
4.4	REZULTATI DOLO ANJA VSEBNOSTI BELJAKOVIN IN PROFILA AMINOKISLIN .....	95
4.4.1	Vsebnost beljakovin in profil aminokislin v vzorcih pristnega medu .....	95
4.4.2	Vsebnost beljakovin in profil aminokislin v vzorcih potvorjenega medu.....	100
4.5	REZULTATI DOLO ANJA ELEMENTOV Z METODO TXRF .....	102
4.5.1	Vsebnost elementov v vzorcih pristnega medu .....	103
4.5.2	Vsebnost elementov v vzorcih medu iz trgovin.....	106
4.6	REZULTATI MULTIVARIATNE ANALIZE VSEH ANALIZIRANIH PARAMETROV.....	108
4.6.1	Botani no poreklo.....	109
4.6.2	Geografsko poreklo .....	111
4.6.3	Pristnost.....	117
4.7	OPIS SENZORI NIH LASTNOSTI REŠELJIKOVEGA MEDU .....	124
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>126</b>
5.1	RAZPRAVA.....	126
5.2	SKLEPI.....	135
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>137</b>
6.1	SUMMARY .....	138
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>140</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Obmoja vrednosti pomembnejših fizikalno-kemijskih parametrov v slovenskem medu različnih letnikov (Korošec in sod., 2012).....	5
Preglednica 2. Fizikalno-kemijski parametri medu in njihove mejne vrednosti (Pravilnik o medu, 2011).....	7
Preglednica 3. Razpolovni čas aktivnosti* diastaze in invertaze v medu (Airborne..., 1999).....	9
Preglednica 4. Vzrok izotopske frakcionacije lahkih elementov v naravi in uporabnost razmerja izotopov lahkih elementov pri določanju izvora živila (Kelly in sod., 2005).....	14
Preglednica 5. Obmoja vrednosti $^{13}\text{C}$ (‰) v pristnem medu in nekaterih sladkornih sirupih in sladkorjih.....	26
Preglednica 6. Parametri medu, pomembni pri preverjanju njegove pristnosti (Korošec in sod., 2012) .....	29
Preglednica 7. Pregled analiziranih vzorcev medu po letnikih in vrstah medu .....	32
Preglednica 8. Delež in vrste sirupov v namerno potvorjenih vzorcih medu .....	33
Preglednica 9. Vrsta, izvor in sestava uporabljenih sladkornih sirupov, kot so navedli proizvajalci .....	34
Preglednica 10. Gradient mobilne faze pri LC-MS analizi ogljikovih hidratov v medu ..	37
Preglednica 11. Gradient mobilne faze pri določanju aminokislin v medu .....	45
Preglednica 12. Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti vode, električne prevodnosti, vsebnosti F + G in saharoze ter aktivnosti diastaze v različnih vrstah pristnega medu.....	58
Preglednica 13. Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti prostih kislin, laktonov in skupnih kislin, vrednosti pH in vsebnosti HMF v različnih vrstah pristnega medu.....	60
Preglednica 14. Enačba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in električno prevodnostjo akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetličnega in gozdnega medu .....	64
Preglednica 15. Enačba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in osnovnimi fizikalno-kemijskimi parametri, določeni v petih vrstah medu (akacijevem, lipovem, kostanjevem, cvetličnem in gozdnem medu) .....	66
Preglednica 16. Povprečne vrednosti in opisne statistike za vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost saharoze, HMF in aktivnost diastaze v trgovinskih vzorcih medu .....	68



Preglednica 17.	Povprečne vrednosti in opisne statistike za vsebnost prostih kislin, laktonov in skupnih kislin ter vrednost pH v trgovinskih vzorcih medu .....	70
Preglednica 18.	Povprečne vrednosti in osnovni statistični parametri vsebnosti fruktoze, glukoze, saharoze, turanoze, palatinoze in maltoze v vzorcih desetih vrst pristnega medu .....	72
Preglednica 19.	Povprečne vrednosti in osnovni statistični parametri vsebnosti gentibioze z melibiozo, melicitoze, erloze, rafinoze, maltotrioze, panoze in izomaltotrioze v vzorcih pristnega medu desetih vrst.....	75
Preglednica 20.	Povprečne vrednosti izraženih parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v akacijevem, cvetli nem, lipovem, ajdovem medu in medu oljne ogršice .....	78
Preglednica 21.	Povprečne vrednosti izraženih parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v kostanjevem, gozdnem, hojevem, smrekovem, rešeljikovem medu in medu divje češnje.....	79
Preglednica 22.	Povprečne vsebnosti mono-, di- in trisaharidov v štirih sirupih, uporabljenih pri pripravi namerno potvorjenih vzorcev medu .....	82
Preglednica 23.	Enačba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in vsebnostjo fruktoze, turanoze, maltotrioze ter razmerjem Palat/Di in F/G v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu .....	85
Preglednica 24.	Opisne statistike izotopskih parametrov $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ , $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ in $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , določene v vzorcih pristnega medu .....	89
Preglednica 25.	Vzorci z dokazano potvorbo: primerjava med dodano in izraženimi količinami dodanega sladkorja .....	93
Preglednica 26.	Opisne statistike vsebnosti asparagina, glutamina, asparaginske kisline, glutaminske kisline, histidina, serina in alanina v slovenskem medu .....	97
Preglednica 27.	Opisne statistike vsebnosti arginina, glicina, treonina, prolina, tirozina, valina in metionina v slovenskem medu .....	98
Preglednica 28.	Opisne statistike vsebnosti cisteina, triptofana, levcina, izolevcina, alo-izolevcina, fenilalanina in lizina v slovenskem medu.....	99
Preglednica 29.	Enačba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in vsebnostjo serina, valina, skupnih aminokislin in beljakovin v akacijevem, cvetli nem in gozdnem medu.....	101
Preglednica 30.	Povprečne vsebnosti prolina, alanina in beljakovin v štirih sirupih, uporabljenih pri pripravi namerno potvorjenih vzorcev medu .....	102
Preglednica 31.	Opisne statistike za vsebnost K, Ca, Fe, S, Cl, Mn in Zn v slovenskem medu, določene z metodo TXRF.....	103

Preglednica 32. Opisne statistike za vsebnost Cu, Ni, Pb, Br in Rb v slovenskem medu, določene z metodo TXRF.....	104
Preglednica 33. Opisne statistike za vsebnost K, Ca, Fe, S, Cl, Mn in Zn v trgovinskih vzorcih medu, določene z metodo TXRF.....	106
Preglednica 34. Opisne statistike za vsebnost Cu, Ni, Pb, Br, Rb in Sr v komercialnih vzorcih medu, določene z metodo TXRF.....	107
Preglednica 35. Opis senzorijnih lastnosti rešeljikovega medu.....	124

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Razmerje stabilnih izotopov ogljika v okolju (Kelly, 2010) .....	15
Slika 2. Raz lenitev goljufij in nepravilnosti po vrsti blaga v letu 2010 v milijon € (EC, 2011) .....	20
Slika 3. Reakcija aminokislina z derivatizacijskim reagentom DEMM (Alaiz in sod., 1992) .....	44
Slika 4. Vsebnosti vode, prostih kislin in laktonov, fruktoze in glukoze ter saharoze v sirupih in izbranih vrstah medu z razli no koli ino dodanega sirupa .....	62
Slika 5. Vpliv deleža in vrste sirupa na elektri no prevodnost vzorcev akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetli nega in gozdnega medu .....	63
Slika 6. Vpliv deleža in vrste sirupa na vsebnost vode, aktivnost diastaze in vsebnost HMF in saharoze v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu ...	65
Slika 7. Vpliv deleža in vrste sirupa na vsebnost prostih kislin in vrednost pH v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu .....	67
Slika 8. Vsebnost fruktoze in glukoze v razli nih vrstah medu, prikazana kot okvir z ro aji .....	71
Slika 9. Vsebnost disaharidov v razli nih vrstah medu, prikazana kot okvir z ro aji ...	73
Slika 10. Vsebnost trisaharidov v razli nih vrstah medu, prikazana kot okvir z ro aji ...	76
Slika 11. Regresijske premice zveze med rafinozo in trisaharidi ter Tri/OH in saharozo in razmerjem Sah/Malt ter Sah/Tur v medu slovenskih ebelarjev ...	80
Slika 12. Korelacija med vsebnostjo erloze in rafinoze ter med vsebnostjo fruktoze in rafinoze v vzorcih pristnega medu slovenskih ebelarjev .....	81
Slika 13. Korelacija med razmerjema Mono/Di in Di/OH ter Sah/Malt in Sah/Tur .....	81
Slika 14. Korelacija med vsebnostjo erloze in razmerjem Gent/Malt ter med vsebnostjo trisaharidov in razmerjem Gent/Malt v vzorcih pristnega medu slovenskih ebelarjev .....	82
Slika 15. Vpliv deleža in vrste sirupa na vsebnost fruktoze, turanoze in maltotrioze v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu (akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetli nega in gozdnega) .....	83
Slika 16. Vpliv deleža in vrste sirupa na razmerje F/G in Palat/Di v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu .....	84
Slika 17. Porazdelitev vzorcev razli nih vrst medu po obravnavi parametrov ogljikovih hidratov z analizo glavnih osi (PCA) in z linearno diskriminantno analizo (LDA) .....	86
Slika 18. Porazdelitev vzorcev potvorjenega medu po obravnavi parametrov ogljikovih hidratov z analizo glavnih osi (PCA) in linearno diskriminantno analizo (LDA) .....	87
Slika 19. Porazdelitev potvorjenih vzorcev medu glede na koli ino dodanega sirupa ...	88

Slika 20.	Obmo je vrednosti in povpre ja razmerja izotopov C in N v razli nih vrstah medu .....	90
Slika 21.	Povpre ja in obmo ja vrednosti razmerja izotopov C in N v potvorjenih vzorcih medu .....	92
Slika 22.	Povpre ja in obmo ja vrednosti razmerja iztopov C v trgovinskih vzorcih.....	94
Slika 23.	Vsebnost beljakovin, skupnih aminokislin in prolina v vzorcih slovenskega medu .....	95
Slika 24.	Odvisna zveza med deležem sirupa in vsebnostjo serina, valina, skupnih aminokislin in beljakovin v vzorcih potvorjenega medu.....	102
Slika 25.	Razlikovanje med 11 vrstami medu slovenskih ebelarjev z metodama PCA in LDA .....	109
Slika 26.	Razlikovanje med vrstami medu iz nektarja z uporabo metod PCA in LDA.	110
Slika 27.	Razlikovanje med vzorci hojevega in smrekovega medu na osnovi testov PCA in LDA .....	111
Slika 28.	Razdelitev vzorcev akacijevega medu glede na geografsko podro je pridelave .....	112
Slika 29.	Razporeditev vzorcev cvetli nega medu glede na geografsko podro je pridelave .....	113
Slika 30.	Razporeditev vzorcev lipovega medu glede na geografsko podro je pridelave .....	114
Slika 31.	Razporeditev vzorcev kostanjevega medu glede na geografsko podro je pridelave .....	115
Slika 32.	Razporeditev vzorcev gozdnega medu glede na geografsko podro je pridelave .....	116
Slika 33.	Porazdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev medu razli nih vrst z metodo PCA in LDA .....	118
Slika 34.	Razdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev akacijevega medu z metodo PCA in LDA .....	119
Slika 35.	Razdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev cvetli nega medu z metodo PCA in LDA .....	120
Slika 36.	Razdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev lipovega medu z metodo PCA in LDA.....	121
Slika 37.	Razporeditev pristnih in potvorjenih vzorcev kostanjevega medu z metodo PCA in LDA .....	122
Slika 38.	Razporeditev pristnih in potvorjenih vzorcev gozdnega medu z metodo PCA .....	123
Slika 39.	Razporeditev pristnih in potvorjenih vzorcev gozdnega medu z metodo LDA.....	123
Slika 40.	Razporeditev vzorcev gozdnega medu na prvi osi PCA in LDA.....	124

Slika 41.	Prikaz značilnosti vonja, okusa in arome rešeljikovega medu, ovrednotenih s kvantitativno opisno analizo .....	125
Slika 42.	Predlog protokola analiz za preverjanje botanike in porekla slovenskega medu .....	130
Slika 43.	Predlog protokola analiz za preverjanje geografskega porekla medu v Sloveniji.....	131
Slika 44.	Predlog protokola analiz za preverjanje pristnosti medu, pridelanega v Sloveniji.....	132

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Referen ni standardi za dolo anje aminokislinske sestave in njihove karakteristike
- PRILOGA B: Ustreznost kromatografskega sistema za dolo anje aminokislinske sestave medu (SST-test)
- PRILOGA C: Pregled parametrov validacije metode
- PRILOGA D: Povpre ne vrednosti in opisne statistike osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu razli nih vrst in treh letnikov
- PRILOGA E: Vrednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov, dolo enih v trgovinskih vzorcih medu.
- PRILOGA F: Pearsonov korelacijski koeficient za zveze med analiziranimi in izra unanimi parametri ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu
- PRILOGA G: Elementi multivariatne analize parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu
- PRILOGA H: Elementi multivariatne analize parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v vzorcih namerno potvorjenega medu
- PRILOGA I: Specifi na opti na rotacija vzorcev medu slovenskih ebelarjev in Pearsonovi koeficienti korelacije za zveze med SR in nekaterimi saharidi.
- PRILOGA J: Primeri kromatogramov analize ogljikovih hidratov z metodo LC-MS v vzorcih pristnega in potvorjenega medu
- PRILOGA K: Razmerja stabilnih izotopov ogljika v medu ter ogljika in dušika v proteinih, izoliranih iz medu ter izra unani delež potvorbe

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$[\alpha]_D^{20}$	specifična rotacija – kot zasuka polarizirane svetlobe pri 20 °C in D-rti natrijeve svetlobe
ANOVA	analiza variance (angl. <i>Analysis of Variance</i> )
CAM rastline	rastline, ki uporabljajo metabolizem kislin, kot ga imajo Crasulacee (angl. <i>Crassulacean Acid Metabolism</i> )
C3 rastline	rastline, ki imajo Calvinov metabolni cikel
C4 rastline	rastline, ki imajo Hatch-Slackov metabolni cikel
DN	diastazno število
FT-Raman	ramanska spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (angl. <i>Fourier Transform Raman spectroscopy</i> )
FTIR-HATR	infra rdeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo s horizontalnim ATR (angl. <i>Fourier Transform Infra Red spectroscopy - Horizontal Attenuated Total Reflectance</i> )
$H_0$	nielna hipoteza
HFCS	koruzni sirup z visokim deležem fruktoze (angl. <i>High Fructose Corn Syrup</i> )
HMF	hidroksimetilfurfural
HPLC	tekoinska kromatografija visoke loljivosti (angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HILIC	tekoinska kromatografija visoke loljivosti s hidrofilno interakcijo (angl. <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i> )
IRMS	masna spektrometrija za določanje izotopskega razmerja lahkih elementov (angl. <i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> )
ISCIRA	analiza razmerja stabilnih ogljikovih izotopov z internim standardom (angl. <i>Internal Standard Carbon Isotope Ratio Analysis</i> )
KV	koeficient variabilnosti
KW test	Kruskal-Wallisov test
LDA	linearna diskriminantna analiza (angl. <i>Linear Discriminant Analysis</i> )
mid-IR	spektroskopija v srednjevalovnem infra rdečem območju (angl. <i>Mid wavelength Infra Red Spectroscopy</i> )
$n$	število statističnih enot
NIR	spektroskopija v bližnjem infra rdečem območju (angl. <i>Near Infra Red Spectroscopy</i> )
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
OH	ogljikovi hidrati
$p$	stopnje tveganja pri statističnem sklepanju
PCA	analiza glavnih osi (angl. <i>Principal Component Analysis</i> )

PCR	regresija glavnih osi (angl. <i>Principal Component Regression</i> )
PDO	ozna ba geografskega porekla (angl. <i>Protected Designation of Origin</i> )
PIXE	rentgenska emisija vzbujena z nabitimi delci ali protoni (angl. <i>Particle/Proton Induced X-Ray Emission</i> )
PLS	metoda najmanjših kvadratov (angl. <i>Partial Least Square</i> )
QDA	kvadratna diskriminantna analiza (angl. <i>Quadratic Discriminant Analysis</i> )
$r$	Pearsonov koeficient korelacije
$r^2$	koeficient determinacije
$r_s$	Spearmanov koeficient korelacije rangov
$s$	standardni odklon
SCIRA	analiza razmerja stabilnih ogljikovih izotopov (angl. <i>Stable Carbon Isotope Ratio Analysis</i> )
SD	standardna deviacija
SNIF-NMR	SNIF nuklearna magnetna resonanca (angl. <i>Site Specific Natural Isotope Fraction Measured by Nuclear Magnetic Resonance</i> )
SR	specifi na rotacija
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. <i>Thin Layer Chromatography</i> )
TXRF	rentgenska fluorescen na spektrometrija s popolnim odbojem (angl. <i>Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry</i> )
$\bar{x}$	aritmeti na sredina
$x_{max}$	najve ja vrednost
$x_{min}$	najmanjša vrednost
XRF	rentgenska fluorescen na spektrometrija (angl. <i>X-Ray Fluorescence Spectrometry</i> )
ZGO	Zaš itena geografska ozna ba (angl. <i>PGI – Protected geographical Indication</i> )
ZOP	Zaš itena ozna ba porekla (angl. <i>PDO – Protected Designation of Origin</i> )
ZTP	Zajam ena tradicionalna posebnost (angl. <i>TSG – Traditional Speciality guaranteed</i> )
	elektri na prevodnost



### OKRAJŠAVE AMINOKISLIN

ALA	alanin	LEU	levcin
ALO-ILE	alo-izolevcin	LYS	lizin
ARG	arginin	MET	metionin
ASP	asparagin	PHE	fenilalanin
ASK	asparaginska kislina	PRO	prolin
CYS	cistein	SER	serin
GLU	glutamin	THR	treonin
GLK	glutaminska kislina	TRP	triptofan
GLY	glicin	TYR	tirozin
HIS	histidin	VAL	valin
ILE	izolevcin		

### OKRAJŠAVE OGLJIKOVIH HIDRATOV

Di	vsebnost disaharidov
Di/OH	razmerje med vsebnostjo disaharidov in vsoto vseh dolo enih OH
Di/Tri	razmerje med vsebnostjo di- in trisaharidov
F/G	razmerje med vsebnostjo fruktoze in glukoze
Gent/Malt	razmerje med vsebnostjo gentibioze z melibiozo in maltoze
Malt/Di	razmerje med vsebnostjo maltoze in disaharidov
Malto3/Melic	razmerje med vsebnostjo maltotrioze in melicitoze
Malto3/Tri	razmerje med vsebnostjo maltotrioze in trisaharidov
Malto3/Tur	razmerje med vsebnostjo maltotrioze in turanoze
Melic/Erloz	razmerje med vsebnostjo melicitoze in erloze
Mono	vsebnost monosaharidov
Mono/Di	razmerje med vsebnostjo mono- in disaharidov
Mono/Tri	razmerje med vsebnostjo mono- in trisaharidov
Palat/Di	razmerje med vsebnostjo palatinoze in disaharidov
Palat/Malt	razmerje med vsebnostjo palatinoze in maltoze
Sah/Malt	razmerje med vsebnostjo saharoze in maltoze
Sah/Tur	razmerje med vsebnostjo saharoze in turanoze
Tri	vsebnost trisaharidov
Tri/OH	razmerje med vsebnostjo trisaharidov in vsoto vseh dolo enih OH

## 1 UVOD

### 1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Kakovost medu, ki je na prodaj v Sloveniji, ureja Pravilnik o medu (2011), ki je usklajen z evropsko zakonodajo ((Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu, 2002) in (Popravek Direktive Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu, 2007)). Ker v Evropski uniji pridelamo le približno pol toliko medu, kot ga porabimo, se na trgovinskih policah vse pogosteje pojavlja tuj med, ki je velikokrat tudi cenovno ugodnejši. Povprečen potrošnik med enakimi izdelki pogosto izbira ravno na osnovi cene, zato je potrebno zagotoviti, da so vsi ti izdelki pristni in varni za njegovo zdravje. Posamezne vrste medu in med z označbo (npr. geografskega porekla) so bolj cenjeni in dosegajo višjo ceno, ki pa je lahko upravičena, če je med zares pristen.

Pristnost medu ugotavljamo z različnimi metodami in večinoma plastno. Ugotavljamo, ali poreklo medu ustreza navedbam na etiketi (botanično in/ali geografsko poreklo, ekološka pridelava itd.) in ali je bila njegova pridelava v skladu s predpisi. Ravno slednja je namreč pogosto vzrok nepristnosti medu kot posledica dohranjevanja čebel s sladkorji ali sladkornimi sirupi, ali potvarjanja medu z dodatkom sladkornih sirupov ali vode.

Za ugotavljanje pristnosti medu na različnih nivojih je potrebno dobro poznavanje različnih vrst medu, to je obsežna baza podatkov o številnih parametrih v medu, in primerne analitske metode. Do sedaj je bilo največ dela opravljenega na področju ugotavljanja ustreznosti deklariranega botaničnega porekla. Pri tem se poslužujemo senzorične ocene s šolanim panelom, melisopalinološke analize in različnih fizikalno-kemijskih analiz. V preteklih letih so bile v svetu in tudi v Sloveniji opravljene številne raziskave, ki so zagotovile temelje za široko bazo podatkov za določanje in preverjanje geografskega porekla (Karabournioti in sod., 2006; Čačič in sod., 2009; Kropf, 2009; Kropf in sod., 2009). Namerne in nenamerne potvorbe medu pa je težko dokazati, saj se kot dodatki največkrat uporabljajo komercialno dostopni sladkorni sirupi, ki so po sestavi in razmerju sladkorjev podobni medu.

Za odkrivanje dodatkov sladkornih sirupov se v svetu preskuša več različnih metod. Pri tem so uporabne analize sestave ogljikovih hidratov (Swallow in Low, 1994) ali aminokislin v medu. Poleg ugotavljanja razmerja vsebnosti ogljikovih izotopov  $^{13}\text{C}$  in  $^{12}\text{C}$  v medu (White in Winters, 1989; White in sod., 1998) vodijo raziskave tudi v smer iskanja hitrih in nedestruktivnih metod ter v modifikacije obstoječih, s katerimi bi bilo mogoče kvalitativno in kvantitativno dokazati nižji delež umetno dodanega sladkorja (Cabañero in sod., 2006; Morales in sod., 2008). Avtorji raziskav poudarjajo, da ugotavljanje avtentičnosti medu ni mogoče le z eno samo metodo, za delo pa je nujno potrebna baza podatkov o sestavi pristnega medu (Kukurova in sod., 2008).

### 1.2 NAMEN DELA

V okviru raziskovalnega dela smo analizirali sistematsko zbrane vzorce medu različnega botaničnega in geografskega porekla ter letnikov in na osnovi analitskih podatkov dopolnili široko bazo podatkov o slovenskem medu s podatki o vsebnosti beljakovin, aminokislin in posameznih sladkorjev ter o sestavi stabilnih izotopov ogljika in dušika (izotopska sestava celokupnega ogljika v medu,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ , ter izotopska sestava ogljika v

proteinih medu kot internega standarda,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ , in dušika v proteinih medu,  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ ). Obenem so bile opravljene tudi osnovne fizikalno-kemijske analize medu in senzori na analiza s šolanim panelom. Med zbranimi vzorci medu smo izbrali tipi ne predstavnike vrst medu, ki jih slovenski potrošniki pogosto kupujejo, in jim dodali različne znane deleže sladkornih sirupov, ki so dostopni na našem trgu. Na tako pripravljenih vzorcih so bile opravljene vse že naštetje analize. Enake analize smo ponovili tudi na vzorcih slovenskega in tujega medu, kupljenih v slovenskih trgovinah. Rezultate analiz smo obdelali z ustreznimi statističnimi metodami in na ta način dopolnili eksperimentalne metode pri ugotavljanju pristnosti medu.

Analize smo opravili na vzorcih medu iz vse Slovenije, ki smo jih pridobili v obdobju treh let. Zbrali smo približno 230 vzorcev različnih, v Sloveniji prisotnih vrst medu (akacijev, lipov, kostanjev, hojev, smrekov, cvetli in gozdni med) ter njihovih mešanic. Beležili smo tudi geografsko poreklo vzorcev. S pomočjo senzoričnih analiz in z merjenjem električne prevodnosti smo izbrali tipične predstavnike petih vrst medu in jim dodali znane deleže sladkornih sirupov.

V istem obdobju smo zbrali tudi 70 vzorcev, predvsem cenovno ugodnejšega medu, slovenskega in tujega izvora, ki smo jih kupili v trgovinah. Opravili smo senzorično analizo, analizo osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov, analize kot na vzorcih medu, ki smo jih dobili neposredno od beljarjev.

V zbranih vzorcih medu so bile opravljene naslednje analize:

- senzorična ocena (videz, vonj, okus, aroma) vzorcev medu za potrditev vrste (Pravilnik o senzoričnem ocenjevanju medu, 2010) in opisna senzorična analiza rešljivega medu s šolanim panelom;
- določitev osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu (vsebnost vode, vsebnost skupnih in prostih kislin ter laktonov, vsebnost aminokislina prolina, električna prevodnost, vrednost pH in aktivnost encima diastaze) (Bogdanov in sod., 2009);
- določitev razmerja vsebnosti stabilnih ogljikovih izotopov  $^{13}\text{C}$  in  $^{12}\text{C}$  v medu in proteinih ter stabilnih izotopov dušika  $^{15}\text{N}$  in  $^{14}\text{N}$  v proteinih: masni spektrometer za analizo stabilnih izotopov lahkih elementov – IRMS (Europa Scientific) s preparativnim nastavkom za tekoče in trdne vzorce ANCA-SL (Košir in sod., 2001; Ogrinc in sod., 2001b; Ogrinc in sod., 2002; Ogrinc in sod., 2003);
- poskus določiti razmerja vsebnosti ogljikovih izotopov  $^{13}\text{C}$  in  $^{12}\text{C}$  v fruktozi, glukozi, di- in trisaharidih, izoliranih iz medu: HPLC sistem z RI detekcijo za frakcioniranje vzorcev ter masni spektrometer za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov – IRMS (Europa Scientific) s preparativnim nastavkom za tekoče in trdne vzorce ANCA-SL (Elflein in Ræzke, 2008). Frakcije sladkorjev medu so bile izolirane, vendar določitev izotopov ni bilo zanesljivo. Ugotovljeno je bilo, da je za tako analitiko nujen potreben sklopljen sistem HPLC-IRMS;
- določitev vsebnosti različnih mono-, di- in trisaharidov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti HILIC in z MS detektorjem (Bogdanov in sod., 2009; Cordella in sod., 2003);
- določitev vsebnosti beljakovin z metodo po Kjeldahlu (AOAC, 2000);
- določitev vsebnosti aminokislin (Bernal in sod., 2005);
- obdelava rezultatov z različnimi statističnimi metodami z namenom poiskati zveze med obravnavanimi parametri.

### 1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Med je naravno živilo, zato njegova sestava niha glede na botanični izvor, geografsko poreklo in letino. Ob začetku raziskave smo predpostavili, da se v primeru umetno dodanega sladkorja ali sirupa razmerje naravno prisotnih komponent spremeni, in sicer:

- zmanjša se vsebnost dušika in posledično tudi vsebnost beljakovin,
- zmanjša se vsebnost prolina,
- spremeni se razmerje med sladkorji, predvsem na račun zmanjšanja vsebnosti oligosaharidov,
- spremeni se izotopska sestava celokupnega ogljika, ogljika v proteinih medu in izotopska sestava v posameznih sladkorjih.

Predvideli smo, da bomo z uporabljenimi metodami določili ali nizke deleže dodanega sladkornega sirupa, 2 % v primeru sirupa iz rastlin C<sub>4</sub> in 5 %, ali bo izviral iz rastlin C<sub>3</sub>.

Pri akciji smo, da bodo glavni prispevki raziskave, ki je bila v Sloveniji prvič izpeljana, naslednji:

- določitev najpomembnejših parametrov v kontroli pristnosti medu;
- predlog primerne protokola analiz za kontrolo pristnosti medu;
- primerjava primernosti in uporabnosti metod za določitev beljakovin, mono- in oligosaharidov v medu;
- preveriti, ali analiza izotopske sestave ogljika v medu in proteinih medu in izotopske sestave ogljika v treh sladkorjih, izoliranih iz medu omogoča v kombinaciji z drugimi analizami določitev dodatka sladkorja ali sladkornega sirupa iz rastlin C<sub>3</sub>;
- dopolnitev podatkovne baze o sestavi slovenskega medu s podatki o vsebnosti mono- in oligosaharidov, beljakovin, aminokislinski prolina in z določitvijo osnovnih izotopskih parametrov (<sup>13</sup>C v medu ter <sup>13</sup>C in <sup>15</sup>N proteinov v medu);
- omogočiti certificiranje in preverjanje pravilnosti certificiranja botaničnega in geografskega porekla medu ter s tem krepitev konkurenčne sposobnosti Slovenije glede na določitev kriterijev za razlikovanje medu določene vrste iz različnih pokrajin. Na ta način bomo podprli razvoj metod za izvajanje uradne kontrole živil in sistema za zagotavljanje sledljivosti surovin oziroma kmetijskih proizvodov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MED

Med je naravno, sladko živilo, ki ga proizvajajo medonosne ebele (*Apis mellifera*) iz nektarja ali mane. Evropska in nacionalna zakonodaja (Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu, 2002; Pravilnik o medu, 2011) definirata med kot »naravno sladko snov, ki jo izdelajo ebele *Apis mellifera* iz nektarja cvetov ali izlokov iz živih delov rastlin ali izlokov žuželk, ki sesajo rastlinski sok na živih delih rastlin, ki jih ebele zberejo, predelajo z doloženimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju«.

Bogdanov in Martin (2002) navajata, da je med edino sladilo, ki velja za zdravo tako za mlade kot za stare. Izjema so otroci, mlajši od enega leta, saj imajo še preslabo razvit imunski sistem, da bi bili odporni na spore bakterije *Clostridium botulinum*, ki so lahko prisotne v medu. O zadnjem primeru botulizma zaradi uživanja medu, zastrupitve s toksinom botulinom, ki ga izločajo spore omenjene bakterije, so v letošnjem letu poročali s Portugalske (Saraiva in sod., 2012).

Glavna sestavina medu so sladkorji, med katerimi prevladujeta monosaharida fruktoza in glukoza. Poleg njiju je v različnih vrstah medu tudi več različnih oligosaharidov – disaharidov, trisaharidov in tetrasaharidov (Anklam, 1998). Vsebnost posameznih sladkorjev je močno povezana z botaničnim izvorom medu. Med iz mane vsebuje več oligosaharidov, predvsem nekaterih trisaharidov, kot sta melicitoza in rafinoza, ki za nektarne vrste medu niso značilni (Bogdanov in sod., 2004). Poleg sladkorjev vsebuje med še vodo, beljakovine, aminokisliline, organske kisline, encime, vitamine in fenolne spojine. V njem so tudi elementi iz okolja, kot so: cvetni prah, sledi voska, različna količina kvasovk tolerantnih na sladkor in kristali D-glukoze hidrata (Wang in Li, 2011). Ker je med naravno živilo, se lahko vsebnosti sestavin in razmerja med njimi med letinami nekoliko spreminjajo, o čemer pri aju tudi obstojajo vrednosti pomembnejših fizikalno-kemijskih parametrov, določena v raziskavah slovenskega medu različnih letnikov in predstavljena v Preglednici 1.

Z ustreznimi tehnologijami to enja in konfekcioniranja medu, ki vključuje tudi segrevanje pri 35 – 40 °C oziroma kratkotrajno segrevanje pri 50 – 60 °C, se vsebnost sestavin v medu ne spremeni in posledično se ohrani tudi kakovost medu (Bogdanov in Gallmann, 2008).

Glede na izvor, torej glavno surovino, delimo med na dve veliki skupini:

- med iz nektarja, ki ga lahko pogosto imenujemo kar cvetli ni med, in je pridobljen iz nektarja cvetov medonosnih rastlin;
- med iz mane, za katerega velja tudi trivialno ime gozdni med, in ga ebele izdelajo večinoma iz sekretov žuželk, ki živijo na živih delih rastlin, ali iz izlokov rastlin samih.

Taka delitev je zapisana tudi v nacionalni regulativi (Pravilnik o medu, 2011), ki je usklajena z Direktivo Sveta EU o medu (2002), in deli med tudi po načinu pridobivanja in pakiranja, kot je na voljo končnemu uporabniku:

- »Med v satju« je med, ki ga ebele hranijo v novo zgrajenem satju brez zalege ali v tankih osnovnih ploščah satja iz ebeljega voska, in je v prodaji kot celi, pokriti satji ali kot del teh satov;

- »Med s satjem« ali »deli satja v medu« je med, ki vsebuje tudi enega ali več kosov satja;
- »Samotok« ali odtočni med se pridobiva z iztekanjem medu iz odkritih satov brez zalege;
- »Točni med« se pridobiva s centrifugiranjem odkritih satov brez zalege. Ta oblika pridobivanja medu je prevladujoča.
- »Prešani med« se pridobiva s stiskanjem satov brez zalege, pri čemer si čebelarji lahko pomagajo tudi s toploto, ki pa ne sme preseči 45 °C.
- »Filtrirani med«, ki se ga pridobiva s filtracijo, pri kateri se poleg neznanilnih primesi odstrani tudi znaten del cvetnega prahu. Ta oznaka mora biti na embalaži brezpogojno navedena, poleg tega pa filtriranega medu ni mogoče dodatno označiti z vrsto, ki se navezuje na botanični poreklo medu (na primer akacijev, lipov med ipd.).

**Preglednica 1. Območja vrednosti pomembnejših fizikalno-kemijskih parametrov v slovenskem medu različnih letnikov (Korošec in sod., 2012)**

**Table 1. Value ranges of the principal physico-chemical parameters in Slovenian honey types from different harvest years (Korošec in sod., 2012)**

Parameter (enota)	Vrsta medu						
	akacijev	lipov	kostanjev	hojev	smrekov	cvetlični	gozdni
<b>voda (g/100 g)</b>	13,5–17,5	14,5–17,8	13,7–18,2	13,8–17,7	14,3–18,5	14,4–18,0	13,5–17,0
<b>električna prevodnost (mS/cm)</b>	0,11–0,27	0,55–1,07	0,96–2,25	0,89–1,57	0,92–1,63	0,24–0,84	0,81–1,68
<b>pH</b>	3,6–4,4	4,1–6,1	4,8–6,2	4,7–5,8	4,3–5,5	3,9–5,2	4,4–5,2
<b>proste kisline (meq/kg)</b>	6,5–23,1	6,1–21,4	7,3–26,0	14,1–27,5	17,7–45,1	8,7–42,7	14,7–43,1
<b>diastazno število</b>	5,9–13,7	9,6–21,2	16,3–28,4	11,3–24,4	12,7–24,2	10,8–24,7	13,3–30,0
<b>beljakovine (g/100 g)</b>	0,13–0,21	0,13–0,24	0,31–0,40	0,18–0,36	0,18–0,38	0,18–0,42	0,20–0,49
<b>prolin (mg/kg)</b>	197–447	225–398	457–776	323–506	231–495	309–534	322–461
<b>fruktoza (g/100 g)</b>	33,6–45,1	33,0–43,0	17,7–24,9	28,1–35,0	28,1–42,8	33,2–39,2	24,9–36,4
<b>glukoza (g/100 g)</b>	21,9–31,3	29,5–39,3	17,4–32,7	23,6–29,6	23,1–30,9	28,5–35,5	22,9–31,6
<b>saharoza (g/100 g)</b>	2,12–8,28	0,09–3,51	2,02–3,29	1,00–4,89	1,23–3,75	1,32–4,35	1,72–4,61
<b>razmerje F/G</b>	1,31–1,67	0,91–1,32	1,40–1,64	1,19–1,31	1,04–1,41	0,95–1,32	1,01–1,36

V živilski industriji se uporablja tudi tako imenovani »pekovski med«, ki pa ni primeren za neposredno uživanje, marveč le za industrijsko uporabo ali kot sestavina v drugih živilih, ki so v nadaljevanju podvržena predelavi. Za pekovski med se namreč dovoljuje, da ima neznanilen okus ali vonj, da je že za fermentirati ali pa je bil pregret (Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu, 2002).

### 2.1.1 Sestava medu in njegove lastnosti

Kemijsko gledano je med visoko koncentrirana raztopina sladkorjev, predvsem monosaharidov fruktoze in glukoze, v vodi. Poleg tega vsebuje v manjših količinah še različne disaharide in trisaharide (Low in Sporns, 1988; Swallow in Low, 1994; de la Fuente in sod., 2007; Korošec in sod., 2009; Kaškonien in sod., 2010), beljakovine, aminokisliline in encime (Azeredo in sod., 2003; Hermosin in sod., 2003), elemente (Golob in sod., 2005), fenolne spojine (Bertoncelj in sod., 2007), organske kisline in pelodna zrna (Wang in Li, 2011). Vse te snovi vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti (npr. električna prevodnost, pH, viskoznost, hitrost kristalizacije), senzorične lastnosti (barva, vonj, okus in aroma) in pelodno sliko medu. Navkljub raznolikosti v vsebnostih posameznih sestavin in razmerjih med njimi, ki največkrat odražajo izvor medu, pa je pristnemu medu različnih vrst skupno to, da ne vsebuje dodanih sestavin ali neznačilnih primesi, nima tujega okusa ali vonja, ni zafermentiran in nima spremenjene stopnje kislosti. Poleg tega se z uporabljenim tehnološkim postopkom aktivnost encimov v medu ni zmanjšala ali uničila. Le za takšen pristen med lahko trdimo, da ustreza zahtevam zakonodaje (Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu, 2002).

#### 2.1.1.1 Fizikalno-kemijski parametri medu, določeni v Pravilniku o medu (2011)

Med, ki je dozorel v satju, vsebuje običajno manj kot 20 % vode. Zato je ta vrednost tudi zakonsko postavljena kot najvišja dovoljena. Izjema so nekatere vrste medu, npr. med iz rese (*Calluna*), ki lahko vsebuje do 23 % vode. Količina vode vpliva na hitrost kristalizacije, viskoznost in specifično težo medu. Odvisna je od klimatskih pogojev, v katerih je bil med pridelan, pasme čebelarstva in moč čebelje družine, pogojev pridelave in skladiščenja medu in lahko tudi od botaničnega porekla medu (Molan, 1996; Anklam, 1998). Zadnje ne velja za med, pridelan v Sloveniji (Kropf in sod., 2010b). Območja vsebnosti vode v značilnih vrstah slovenskega medu so predstavljena v Preglednici 1. Podobno so ugotovili tudi Bentabol in sodelavci (2011), ki so v vzorcih cvetličnega medu s Tenerifov določili med 15,5 in 18,9 %, v vzorcih maninega medu pa od 15,7 do 18,6 % vode. V srbskem akacijevem medu so avtorji določili povprečno 16,1 % vode, v lipovem 17,4 % in v sončničnem 18,0 % vode (Lazarevi in sod., 2012). Francoski sivkin med je vseboval povprečno 16,7 % vode, hojev med 17,6 %, sončnični 18,2 %, akacijev in repični 18,5 % ter kostanjev 18,8 % vode (Devillers in sod., 2004).

Vsebnost vode je pomemben parameter kakovosti medu, saj je od nje odvisna stabilnost medu in odpornost na fermentacijo v skladišču (Bogdanov in Martin, 2002). Na splošno velja, da večja vsebnost vode povečuje verjetnost, da bodo osmofilne kvasovke pri ele s fermentacijo medu, kar vpliva na spremembo okusa medu (med fermentacijo nastaja etanol, ki v prisotnosti kisika lahko oksidira do očetne kisline in vode, zaradi katere je med bolj kisel) in poslabšanje njegove kakovosti. Do fermentacije ne bo prišlo v medu, ki vsebuje manj kot 18 % vode, vendar tudi ta meja ni povsem zanesljiva, saj je za etek fermentacije odvisen tudi od števila kvasovk v medu, temperature skladiščanja in vsebnosti proste vode (v kristaliziranem medu je več proste vode) (Sabatini in sod., 2008).

Poleg vsebnosti vode so v Direktivi Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu (2002) in v Pravilniku o medu (2011) definirani še nekateri drugi fizikalno-kemijski parametri, ki odražajo kakovost in pristnost medu (električna prevodnost, vsebnost

fruktoze in glukoze, vsebnost prostih kislin itd.). Ti parametri in njihove mejne vrednosti so predstavljeni v preglednici 2.

**Preglednica 2. Fizikalno-kemijski parametri medu in njihove mejne vrednosti (Pravilnik o medu, 2011)**

**Table 2. Physico-chemical parameters of honey and limit values (Pravilnik o medu, 2011)**

<b>Merilo</b>	<b>Mejna vrednost</b>
vsebnost vode	najve 20 %
- med iz rese ( <i>Calluna</i> )	najve 23 %
vsebnost fruktoze in glukoze	
- med iz nektarja	najmanj 60 g/100 g
- med iz mane, mešanica medu iz mane in nektarja	najmanj 45 g/100 g
vsebnost saharoze	najve 5 g/100 g
- med iz akacije, lucerne, citrusov, rdelega gumija, Menzies Banksie, medenice, evkrifije	najve 10 g/100 g
- med iz sivke in borea	najve 15 g/100 g
vsebnost v vodi netopnih snovi	najve 0,1 g/100 g
- prešani med	najve 0,5 g/100 g
proste kisline	najve 50 mekv/kg
diastazno število (lestvica po Schadeju)	najmanj 8
- vrste medu z majhno naravno vsebnostjo encimov (citrusov, akacijev med) in z največ 15 mg HMF/kg	najmanj 3
vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF)	najve 40 mg/kg (razen <sup>1)</sup> )
- med z deklariranim poreklom iz tropskih območij in mešanica teh vrst medu	najve 80 mg/kg
električna prevodnost	
- vrste medu, ki niso navedene spodaj	najve 0,8 mS/cm
- manin in kostanjev med in mešanice obeh vrst, razen tistih, ki so navedene med izjemami	najmanj 0,8 mS/cm
- izjeme: med jagodičnice, lipe, spomladanske in jesenske rese, manuke, ajevca	

**Ogljikovi hidrati** predstavljajo med 73 in 83 % mase medu. V večini vrst medu prevladuje fruktoza, 23-39 g/100 g, sledi ji glukoza, povprečno 19-30 g/100 g. Nasprotno pa med oljne ogršice (*Brassica napus*), regrata (*Taraxacum officinalis*) in rastline *Trichostema lanceolatum* iz družine ustnatic vsebuje več glukoze kot fruktoze (Cotte in sod., 2003; Bentabol Manzanares in sod., 2011). Ta dva monosaharida najbolj vplivata na fizikalne lastnosti medu, kot so gostota, viskoznost, hitrost kristalizacije in higroskopnost, na mikrobiološko aktivnost in na senzorične lastnosti medu, predvsem na sladkost. Poleg tega prispevata velik del k energijski vrednosti medu (Molan, 1996; Mar Cavia in sod., 2009; Wang in Li, 2011). Ker so v medu iz mane prisotne večje količine oligosaharidov (Bogdanov in sod., 2004), je skupna količina fruktoze in glukoze manjša kot v nektarnih vrstah medu. Pravilnik o medu (Pravilnik o medu, 2011) zahteva, da je v slednjih vsaj 60 g fruktoze in glukoze na 100 g medu, v maninem medu pa vsaj 45 g/100 g. Poleg tega omejuje tudi količino saharoze na 5 g na 100 g medu, oziroma v nekaterih vrstah medu na 10 ali 15 g/100 g. Večje količine saharoze v medu so lahko znak potvorbe medu kot



posledica intenzivnega hranjenja ebel s saharozo ali neposrednega dodajanja tega sladkorja v med.

Devillers in sodelavci (2004) poročajo, da je bila skupna vsebnost fruktoze in glukoze v francoskem medu sledeča: 78,6 g/100 g – repi ni med, 76,4 g/100 g – son ni ni, 69,0 g/100 g – kostanjev med, 66,9 g/100 g – med sivke, 66,8 g/100 g – akacijev med in 59,0 g/100 g – hojev med. Vsebnost saharoze se je gibala med 0,23 g/100 g v repi ni medu in 2,69 g/100 g v medu sivke. Tudi v vzorcih cvetličnega (0,95 g/100 g) in maninega (0,50 g/100 g) medu, ki so ga analizirali Bentabol in sodelavci (2011) vsebnost saharoze ni presežala najvišje dovoljene vrednosti. Poleg tega so ugotovili, da se ta dva tipa medu značilno razlikujeta v skupni količini fruktoze in glukoze (povprečno 72,8 g/100 g v cvetličnem oziroma 70,8 g/100 g v maninem medu). Podobno so za vsebnost saharoze (3,8 g/100 g) v turškem cvetličnem medu iz različnih regij ugotovili tudi Kahraman in sodelavci (2010), ki so v teh vzorcih določili ali tudi povprečno 71,9 g/100 g fruktoze in glukoze.

**V vodi netopne snovi** predstavljajo cvetni prah, ostanki satja, ebel, delci prahu in drugih nečistoč. Vsebnost v vodi netopnih snovi je tako kriterij čistosti medu (Bogdanov in sod., 1999). Skupna masa teh snovi sme predstavljati največ 0,1 % mase medu, oziroma 0,5 % v pekovskem medu.

Med ima kislo pH, z vrednostmi med 3,5 in 5,5. Kislost je posledica organskih kislin, ki prispevajo tudi k okusu in barvi medu ter k odpornosti pred mikrobiološkim kvarom. Sprva je dolgo veljalo prepričanje, da med vsebuje predvsem mravlji no kislino, je bilo kasneje dokazano, da v njem prevladuje glukonska kislina, ki je prisotna v spremenljivem ravnotežju z glukono laktonom (White, 1978). Nastaja iz glukoze kot produkt delovanja encima glukoza oksidaze. Nožal in sodelavci (2003) so najvišjo glukonske kisline določili v medu jesenske (*Calluna vulgaris*, 133 mg/kg) in spomladanske (*Erica* sp., 128 mg/kg) rese, najmanj pa v cvetličnem medu (28,8 mg/kg) in medu sivke (*Lavandula latifolia*, 24,9 mg/kg). Poleg omenjenih kislin so v medu v relativno višjem deležu prisotne še piruvinska, jabolna, citronska, jantarna, oksalna, maslena, očetna, vinska, mlečna, benzojska, piroglutaminska, valerijanska, -ketoglutarinska, glikolna, in 2,3-fosfoglicerinska kislina. Skupna vsebnost kisline je običajno manjša od 0,5 g/100 g medu (Mato in sod., 2003). Vir nekaterih kislin sta nektar in mana, druge pa nastajajo med zorenjem in skladiščenjem medu. **Vsebnost prostih in skupnih kislin** ter vrednost pH so parametri, ki omogočajo razlikovanje med vrstami medu glede na botanični izvor, medtem ko vsebnosti laktonov zaradi velike variabilnosti ne moremo upoštevati (Anklam, 1998; Tuberoso in sod., 2010). Vsebnost prostih in skupnih kislin določimo s titrimetrično in izražamo v miliekvivalentih na kilogram medu. Dovoljeno je največ 50 miliekvivalentov oziroma v medu iz tropskih področij največ 80 miliekvivalentov prostih kislin na kilogram medu ("Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu," 2002). Za nektarne vrste medu – regratov, repi ni, akacijev, rododendronov in lipov – je značilna vsebnost prostih kislin v območju med 3 in 23 mekv/kg, kostanjev med jih vsebuje med 4 in 30 mekv/kg, medtem ko jih je v medu iz mane in škrdatovem (*Metcalfa pruinosa*) medu med 17 in 46 mekv/kg (Ruoff in sod., 2006).

**Diastaza** v medu je encim, ki je sestavljen iz  $\alpha$ -amilaze in  $\beta$ -amilaze. Prva cepi škrob na dekstrine, druga pa ga razgradi do maltoze. V medu škroba ali njegovih prekursorjev skorajda ni, encim pa naj bi v med dodale  $\alpha$ -glukozidaze (Bogdanov in sod., 1999). Kljub temu se vrste medu lahko razlikujejo v aktivnosti diastaze, kar je predvsem posledica količine nektarja in fiziološkega stanja  $\alpha$ -glukozidaznih žlez v pašni sezoni (Bogdanov in sod., 2004). Za svetlejšje vrste medu – akacijev, repi ni, regratov, resin – je značilna nižja aktivnost diastaze, ki jo podajamo kot diastazno število, DN (običajno  $DN < 15$ ), medtem ko znaša aktivnost v sonnem, lipovem, hojevem, gozdnem, kostanjevem medu med 15 in 35 (Oddo in sod., 1999; Persano Oddo in sod., 2004). Aktivnost diastaze se s časom skladiščenja in s segrevanjem zmanjšuje, zato je ta parameter uporaben za razvrstitev po botaničnem izvoru le pri svežem medu. Pravilnik o medu (2001) zahteva, da je diastazno število medu vsaj 8 oziroma 3 za vrste medu z nizko encimsko aktivnostjo.

**Preglednica 3. Razpolovni čas aktivnosti\* diastaze in invertaze v medu (Airborne..., 1999)**

**Table 3. Half life of diastase and invertase activity in honey (Airborne..., 1999)**

Temperatura	Razpolovni čas aktivnosti encima	
	diastaza	invertaza
20 °C	1480 dni	820 dni
30 °C	200 dni	83 dni
40 °C	31 dni	9,6 dni
50 °C	5,38 dni	1,28 dni
60 °C	1,05 dni	4,7 ur
70 °C	5,3 ure	47 minut
80 °C	1,2 ure	8,6 minut

\* Razpolovni čas aktivnosti encima je čas, ki je potreben, da se aktivnost encima zmanjša za polovico

Ker je encim občutljiv na toploto, je njegova aktivnost eden glavnih parametrov za ugotavljanje intenzivnosti segrevanja medu med predelavo in skladiščenjem (Oddo in sod., 1999; Serrano in sod., 2007). Različni avtorji predlagajo, da je poleg aktivnosti diastaze potrebno določiti tudi aktivnost invertaze, ki je še bolj občutljiva na toplotne spremembe (Bogdanov in sod., 1999; Oddo in sod., 1999). Primerjava razpolovnih časov aktivnosti diastaze in invertaze je prikazana v preglednici 3. Poleg omenjenih dveh encimov so v medu prisotni tudi drugi: glukoza oksidaza, katalaza, kislota fosfataza, peroksidaza, polifenoloksidaza, esteraza, inulaza in proteolitični encimi. Večina encimov v medu prispeva  $\alpha$ -glukozidaze, nekateri pa izvirajo tudi iz nektarja ali peloda. Skupaj z drugimi proteini prispevajo v medu k različnim, ki jih ni mogoče doseči ali nadomestiti naravno (Molan, 1996).

Svež med skorajda ne vsebuje **hidroksimetilfurfurala** (HMF). Ta ciklični aldehid nastaja z dehidracijo fruktoze in glukoze v kislem ali kot eden od produktov Maillardove reakcije. Hitrost reakcije se proporcionalno povečuje z naraščanjem temperature (Sabatini in sod., 2007). Vsebnost HMF v medu je sprva služila kot indikator potvorjenosti medu z invertnim sirupom, kmalu pa se je izkazalo, da je vsebnost lahko velika tudi v pregretem ali neprimerno skladiščnem naravnem medu (White in Siciliano, 1980; Nasiruddin Khan in sod., 2006). Količina HMF v svežem, nesegretem medu je zelo majhna, tudi manj kot 1 mg/kg medu. Bogdanov s sodelavci (2004) navajajo zgornjo mejo vsebnosti HMF v svežem, nesegretem medu 15 mg/kg. Ta meja pogosto velja tudi za med višje kakovosti (ZS, 2008; Združenje Koševski gozdni med, 2009). Vsebnost HMF v medu ni

neposredno povezana z botaničnim izvorom medu, marve z geografski področjem. Pravilnik o medu (2011) kot tudi mednarodni standard (Codex Alimentarius Commission, 2001) dovoljujeta v medu največ 40 mg HMF/kg. Izjema so vrste medu, ki izvirajo s področij s tropsko klimo, v katerih je lahko do 80 mg HMF/kg.

**Električna prevodnost** je fizikalna lastnost medu, odvisna predvsem od količine mineralnih snovi in kislin v medu. Med vsebnostjo pepela v medu in električno prevodnostjo obstaja linearna zveza. V slovenskem medu so Kropf in sodelavke (2008) določile naslednjo zvezo:  $\sigma = 2,11 \cdot m_{\text{pepel}} + 0,15$ . Ugotovile so zelo močno povezanost med spremenljivkama, saj je determinacijski koeficient znašal 0,98. IHC je pred tem za uporabo na področju Evrope priporočil model  $\sigma = 1,74 \cdot m_{\text{pepel}} + 0,14$  (Bogdanov in sod., 2009).

Zaradi hitrosti in enostavnosti je merjenje električne prevodnosti v rutinski analizi že povsem nadomestilo analizo pepela. Električna prevodnost je lahko pokazatelj botaničnega porekla medu. Na splošno velja, da ima med iz nektarja električno prevodnost nižjo od 0,8 mS/cm, med iz mane pa enako ali višjo od 0,8 mS/cm. Nekatere vrste medu iz nektarja so pri tem tudi izjeme, saj je zanje značilna ilna precejšnja naravna raznolikost vrednosti (Pravilnik o medu, 2011). Akacijev med spada med vrste z najnižjo, ki je običajno nižja od 0,2 mS/cm, med tem ko so vrednosti v kostanjevem medu (tudi do 1,8 mS/cm) med najvišjimi (Mateo in Bosch-Reig, 1998; Kropf in sod., 2008; Kukurova in sod., 2008).

Za spremljanje naštetih parametrov so na voljo standardizirane analitske metode (Harmonised methods of the International Honey Commission, 2009; Official methods of analysis of AOAC International, 2011), ki so v laboratorijih za spremljanje kakovosti medu rutinsko uporabljene. Vsebnost vode se običajno določa s refraktometrično prek lomnega količnika (Bogdanov in sod., 2009), pri čemer je bilo ugotovljeno, da so določene vrednosti vode nekoliko nižje kot pri titracijski metodi po Karl Fischerju. Kljub temu refrakcijska metoda zaradi dobre ponovljivosti in enostavnosti ne potrebuje alternative (Bogdanov in sod., 1999).

Vsebnost sladkorjev, med drugim tudi fruktoze, glukoze in saharoze dandanes najpogosteje določamo s kromatografskimi metodami, kot so: HPLC metoda z amino kolono in refraktometričnim detektorjem, HPLC metoda z ionsko izmenjevalno kolono in pulzno amperometričnim detektorjem ter plinska kromatografija z uporabo kapilarne kolone za ločbo siliranih sladkornih derivatov. Slednja metoda je primernejša za raziskave in manj za rutinsko kontrolo. Reducirajo se sladkorje in navidezno saharozo se lahko določa tudi s Fehlingovo metodo, ki pa je manj natančna in ima slabšo ponovljivost.

V vodi netopne snovi določamo gravimetrično s filtracijo raztopine medu prek steklenih filtrirnih lončkov. V medlaboratorijski primerjavi je bila ugotovljena velika variabilnost rezultatov (Bogdanov in sod., 1999).

Aktivnost diastaze najpogosteje določamo s Schadejevo ali Phadebas spektrofotometrično metodo, rezultat podajamo kot diastazno število (DN) (Bogdanov in sod., 2009).

V okviru dela Mednarodne komisije za med (IHC) so bile testirane in validirane tri različne metode za določanje vsebnosti HMF v medu (Bogdanov in sod., 2009): HPLC in spektrofotometrična po Whiteu ter po Winklerju. Slednjo Bogdanov in sodelavci (2004) odsvetujejo, saj je eden od reagentov, p-toluidin, rakotvoren.

Električno prevodnost medu določamo konduktometrično v 20 % raztopini medu pri temperaturi 25 °C (Bogdanov in sod., 2009).

#### 2.1.1.2 Drugi fizikalno-kemijski parametri medu, ki niso opredeljeni z zakonodajo

V medu je poleg fruktoze in glukoze še okrog 25 **oligosaharidov**: disaharidov, trisaharidov in tetrasaharidov (Anklam, 1998). Vsebnost oligosaharidov v različnih vrstah medu je zelo raznolika, kljub temu, da so večinoma vsi posledica aktivnosti invertaze (Bogdanov in sod., 2004). Nektarne in manine vrste medu se med seboj opazneje razlikujejo v sestavi ogljikovih hidratov (angl. carbohydrate profile), saj slednje vsebujejo več oligosaharidov, predvsem trisaharidov melcitoze in rafinoze, ki v nektarnem medu nista prisotni.

Disaharidi v medu so večinoma sestavljeni iz izomer  $\alpha$ -glukozil glukoze in  $\beta$ -glukozil fruktoze, zelo malo pa je disaharidov z  $\alpha$ -glikozidno vezjo, saj so fruktozil-fruktoze v medu redke. Med trisaharidi je največ derivatov saharoze (Doner in White, 1977; Low in Sporns, 1988; Ruiz-Matute in sod., 2008; Ruiz-Matute in sod., 2010).

Za določanje vsebnosti posameznih ogljikovih hidratov v medu se najpogosteje uporabljajo kromatografske metode. HPLC tehnika omogoča določanje tudi oligosaharidov z veliko molekulsko maso (Swallow in Low, 1994; Morales in sod., 2008), medtem ko je resolucija za številne disaharide in trisaharide, prisotne v nizkih deležih, boljša pri analizi z GC (Ruiz-Matute in sod., 2010; de la Fuente in sod., 2011). Slednja zahteva derivatizacijo vzorca, pri kateri nastanejo oksimi ogljikovih hidratov. Profil ogljikovih hidratov je povezan z botaničnim izvorom medu, vendar je za klasifikacijo potrebno analizirati veliko število vzorcev in rezultate obdelati s kemometrijskimi metodami. Običajno se razlikujeta profila ogljikovih hidratov medu iz nektarja in medu iz mane, klasifikacija posameznih vrst medu iz nektarja na osnovi ogljikohidratnega profila pa je običajno manj zanesljiva (Anklam, 1998; Mateo in Bosch-Reig, 1998; Kukurova in sod., 2008; Bentabol Manzanares in sod., 2011). V raziskavi slovenskega akacijevega, cvetličnega, smrekovega in gozdnega medu smo ugotovili, da se analizirane vrste medu značilno razlikujejo med seboj v vsebnosti fruktoze, maltoze in turanoze, medtem ko vsebovale podobno količino palatinoze, izomaltoze in gentibioze ter panoze (Korošec in sod., 2009).

Poleg profila ogljikovih hidratov so z botaničnim izvorom medu lahko povezana tudi razmerja med posameznimi sladkorji oziroma skupinami ogljikovih hidratov. Razmerje med vsebnostjo fruktoze in glukoze (F/G) je običajno večje od ena in znaša pri vrstah medu, ki imajo veliko fruktoze, npr. smrekov, kostanjev in akacijev med, od 1,4 do 1,7. Med oljne ogrščice (tudi repični med) in regratov med vsebujeta več glukoze kot fruktoze, zato je zanj značilen F/G okrog 0,9 (Golob in Plestenjak, 1999; Persano Oddo in sod., 2004). Različni avtorji so ugotovili, da se vrste medu med seboj razlikujejo tudi v razmerju med saharozo in maltozo (Sah/Malt), saharozo in turanozo (Sah/Tur), maltotriozo in trisaharidi (Malto3/Tri) ter maltotriozo in turanozo (Malto3/Tur) ter maltotriozo in melcitozo (Malto3/Melic) (Cotte in sod., 2004; Nozal in sod., 2005; Korošec in sod., 2009).

Med vsebuje tudi **beljakovine** in različne **aminokisliline**. V medu jih med predelovanjem nektarja in mane izločajo čebele ali zaidejo s pelodom. Vsebnost dušika v medu je majhna, povprečno 0,04 g/100 g in zelo variabilna. Količina beljakovin znaša okrog 0,2 g/100 g (White in Rudy, 1978). Med beljakovine v medu sodijo tudi encimi. Raziskave so pokazale, da je na osnovi karakterizacije glavnih proteinov v medu mogoče razlikovati med glede na vrsto čebel, ki so ga izdelale (Won in sod., 2008). V raziskavi vsebnosti dušika v medu in v medu z dodanimi ogljikovimi hidrati so venezuelski avtorji predlagali

vrednost 10 miligramov dušika na 100 gramov medu kot spodnjo mejo za pristen med. Med, v katerem je bilo manj dušika, so smatrali za ponarejenega (Vit, 2009).

Med vsebuje tudi proste aminokislino, med katerimi je najve prolina. Vsebnost prolina naj bi bila tudi pokazatelj zrelosti in pristnosti medu, dogovorjena spodnja meja je 180 mg prolina na 100 gramov medu (Bogdanov in sod., 1999). Poleg tega se vsebnost prolina in nekaterih drugih aminokislin, arginina, triptofana in cisteina, uporablja tudi za razlikovanje med vrstami medu glede na botani ni izvor. Aminokislinski profil medu je povezan tudi z njegovim geografskim poreklom. Razlike med isto vrsto medu iz različnih področij so bile ugotovljene tudi v razmerju med asparaginsko kislino in prolinom. Aminokislinski profil je bolj zanesljiv parameter za ugotavljanje botani nega ali geografskega medu kot vsebnost dušika oziroma beljakovin (Anklam, 1998).

Skupna vsebnost mineralnih snovi predstavlja med 0,1 in 0,2 % mase nektarnega medu oziroma do 1,5 % mase medu iz mane. Vsebnost posameznih **elementov** v medu je lahko znak obremenjenosti okolja, iz katerega izhaja med, in geografskega porekla medu. Sestava tal posamezne geografske regije je svojevrstna in vpliva na sestavo elementov v medu (Almeida-Silva in sod.; Pellerano in sod.; Anklam, 1998). Vsebnost elementov je povezana tudi z botani nim izvorom medu. Najve je razlike v sestavi in koli ini elementov so med obema tipoma medu – medom iz nektarja in medom iz mane, nekateri raziskovalci pa so z uporabo diskriminantnih statističnih metod uspeli lo iti tudi posamezne vrste medu med seboj (Pisani in sod., 2008; Kropf, 2009). Med elementi je v najvišjem deležu zastopan kalij, ki ga je po ugotovitvah Golobove in sodelavcev (2005) v slovenskem medu od 390 mg/kg v akacijevem medu do 5100 mg/kg v gozdnem medu. Pove ana vsebnost posameznih elementov, na primer cinka in kositra, je lahko znak kontaminacije medu s kovinsko opremo med predelavo (Bogdanov in sod., 2007).

Med vsebuje tudi manjši delež **vitaminov**, ki s prehranskega vidika nimajo posebnega pomena za zdravje loveka. Kot je bilo ugotovljeno, se vsebnost vitaminov zmanjša na ra un filtracije, s katero odstranimo del cvetnega prahu in zaradi oksidacije askorbinske kisline ob prisotnosti vodikovega peroksida, ki nastaja v medu zaradi delovanja glukoza oksidaze (Crane, 1980). Ciulu in sodelavci (2011) so v medu dolo ali v vodi topne vitamine riboflavin (vit. B<sub>2</sub>), nikotinsko kislino (vit. B<sub>3</sub>), pantotensko kislino (vit. B<sub>6</sub>), folno kislino (vit. B<sub>9</sub>) in askorbinsko kislino (vit. C). Najbolj bogat z vitamini je bil med citrusov (36 mg/kg), skoraj desetkrat manj pa jih je bilo v rožmarinovem medu. Vzorci različnih vrst medu so vsebovali najve nikotinske kisline (povpre no 0,75 – 26 mg/kg), razen vzorci medu poletnega zlatega korena (*Asphodelus aestivus*) in jagodi nice (*Arbutus unedo*), v katerih je bilo najve pantotenske kisline (povpre no 16 in 10 mg/kg). Poleg omenjenih vitaminov so bili v medu dolo eni tudi vitamini A, E in K (Crane, 1980).

**Flavonoidi** so del velike družine rastlinskih fenolnih pigmentov. So snovi z biološko aktivnim delovanjem. Število flavonoidov v rastlinskih vrstah je zelo raznoliko, obenem pa je za vsako rastlino zna ilen edinstven profil flavonoidov. Njihova vsebnost v ebeljih pridelkih je različna, od okrog 6 mg/kg v medu do 10 g/100 g v propolisu. Kot piše Anklamova (1998) so različni raziskovalci v različnih vrstah medu dolo ili najve pinocembrina. Podobno so ugotovili tudi Bertoničeva in sodelavci (2011) v raziskavi sedmih zna ilnih vrst slovenskega medu. Profil flavonoidov je lahko uporabno orodje za razlikovanje med vrstami medu glede na njihovo botani no poreklo, vendar je potrebno za

zanesljivejše razvrstitev uporabiti tudi kemometrijske metode (Ruoff, 2006; Bertonec in sod., 2011). V preglednem članku Anklamova (1998) tudi navaja, da so bili posamezni flavonoidi določeni samo v eni vrsti medu in bi lahko služili kot potencialni markerji za preverjanje ustreznosti botaničnega porekla npr. medu rese (miricetin), rožmarina (kamferol) ali citrusov (hesperitin). Uporaba miricetina kot markerja medu rese je vprašljiva, saj je bil v drugi raziskavi predlagan kot marker za sončni med. V raziskavi vzorcev slovenskega medu sedmih vrst flavonoidi, ki bi lahko služili kot markerske snovi, niso bili ugotovljeni (Bertonec, 2008).

Poleg flavonoidov se v medu pogosto določa tudi vsebnost fenolnih kislin, ki so povezane tako z botaniko kot tudi z geografskim izvorom medu. Tako kot flavonoidi so odgovorne za antioksidativno učinkovitost medu (Gheldof in sod., 2002). Za repi med je značilna ilna fenil-propanojska kislina, v medu ajde so ugotovili večjo vsebnost 4-hidroksibenzojske kisline in odsotnost fenil-ocetne kisline. Med iz mane se značilno razlikuje v vsebnosti protokatehinske kisline od medu iz nektarja (Anklam, 1998).

Vonj in aroma medu sta senzorični lastnosti, ki sta močno odvisni od **hlapnih spojin in spojin z višjim parnim tlakom**, ki so prisotne tako v matriksu medu kot tudi v plinski fazi nad vzorcem medu (angl. headspace). Hlapne aromatične komponente prispevajo k značilnim aromam posamezne vrste medu in na ta način omogočajo razlikovanje med vrstami medu glede na njihov botanični izvor. V primeru nepravilnega ravnanja z medom med predelavo in skladiščenjem, so napake prepoznavne kot tuji vonj in aroma, ki ju zaznavamo s pomočjo, in kot tuje hlapne aromatične snovi, ki jih določimo z instrumentalno analizo.

Aromatične organske snovi v medu predstavljajo različne ogljikovodikove, alkoholi, fenolne spojine, etri, aldehidi, ketoni, estri, furani in dušikove spojine. Analiza teh snovi je dokaj zahtevna predvsem zaradi ekstrakcije, med katero ne sme priti do sprememb aromatičnih snovi ali tvorbe novih (na primer furfurala in HMF, ki sta odgovorna za aromo po pregretem medu). Analiza profila aromatičnih komponent je uporabna za razlikovanje med vrstami medu različnega botaničnega izvora, vendar jo je priporočljivo kombinirati z analizami drugih parametrov (Anklam, 1998). Večina avtorjev je na osnovi izsledkov svojih raziskav predlagala različne hlapne komponente, ki bi lahko služile kot markerji določene vrste medu. V večini primerov gre za kombinacijo več komponent, ki so lahko odgovorne tudi za značilno aromo medu, ki jo vrednotimo s senzorično analizo (Bentivenga in sod., 2004; Bianchi in sod., 2005; Jerkovič in sod., 2007; Kaškonien in sod., 2008; Aliferis in sod., 2010).

**Izotopi** so atomi kemijskega elementa, ki imajo enako vrstno število, torej enako število protonov, a različno masno število, torej različno število nevtronov. Izotope razdelimo na **stabilne izotope**, ki ohranjajo nespremenjeno obliko za nedoločeno časovno obdobje, in nestabilne izotope (radioaktivni izotopi), ki so podvrženi radioaktivnemu razpadu. Prav zaradi svoje stabilnosti predstavljajo stabilni izotopi lahkih elementov H, C, N, O in S pomembno sledilo pri študiju kroženja biogenih prvin v okolju in posledično pristnosti živilskih proizvodov. Razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo  $\delta$ , ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st). Enota so promili (‰):

$$A = \frac{R_{vz.} - R_{st.}}{R_{st.}} * 1000 \quad \dots(1)$$

V ena bi 1 pomeni A težji izotop ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ), vrednost R pa je razmerje med izotopi ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) in jo vedno podajamo kot težji izotop/lažji izotop. Mednarodni standardi so to no dolo ene homogenizirane naravne spojine. Delta (  $\delta$  ) vrednost vsakega standarda pa je definirana z vrednostjo 0 ‰. Pozitivne vrednosti pomenijo, da vsebuje vzorec ve težkega izotopa kot standard, negativne pa, da ga vsebuje manj. Za ogljik je privzet standard V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite) z vrednostjo  $R_{\text{st}} = 0,0112372$  (Craig, 1957), za kisik in vodik uporabljamo standard povpre ne morske vode (SMOW – Standard Mean Ocean Water) na globini enega metra pri temperaturi 25 °C in za žveplo pirit iz meteorita Canon Diablo triloit (CDT). Za dušik je privzet standard atmosferski zrak (AIR) z vrednostjo  $R_{\text{st}} = 0,0036765$  (Ghidini in sod., 2006).

Naravne vsebnosti stabilnih izotopov so v principu konstantne (potemtakem tudi njihova razmerja) in so dolo ene z nastankom elementov oziroma s sestavo Zemlje ob njenem nastanku. Vendar pa so v naravi opazna dolo ena nihanja v vrednostih razmerij zaradi izotopske frakcionacije. Glavni vzroki za izotopsko frakcionacijo so:

- izotopske izmenjevalne reakcije (termodinamski izotopski efekt), ki obsegajo procese, v katerih ne prihaja do kemijskih sprememb, poteka pa izotopska izmenjava med različnimi kemijskimi snovmi, med različnimi fazami ali med posameznimi molekulami (npr. izparevanje vode) in
- kineti ni procesi (kineti ni izotopski efekt), ki so odvisni od razlik v reakcijski hitrosti molekul izotopov saj v kemijskih reakcijah molekule (»izotopologi«), ki vsebujejo lažje izotope imajo šibkejše vezi in na splošno reagirajo hitreje kot molekule, ki vsebujejo težje izotope (n.pr. biološki procesi). Razlika izvira predvsem iz vibracijskega gibanja izotopsko težje molekule, ki ima nižji ni elni energijski nivo kot lažja.

Pregled stabilnih izotopov lahkih elementov in možnosti uporabe podatka o razmerju stabilnih izotopov lahkih elementov so predstavljeni v preglednici 4.

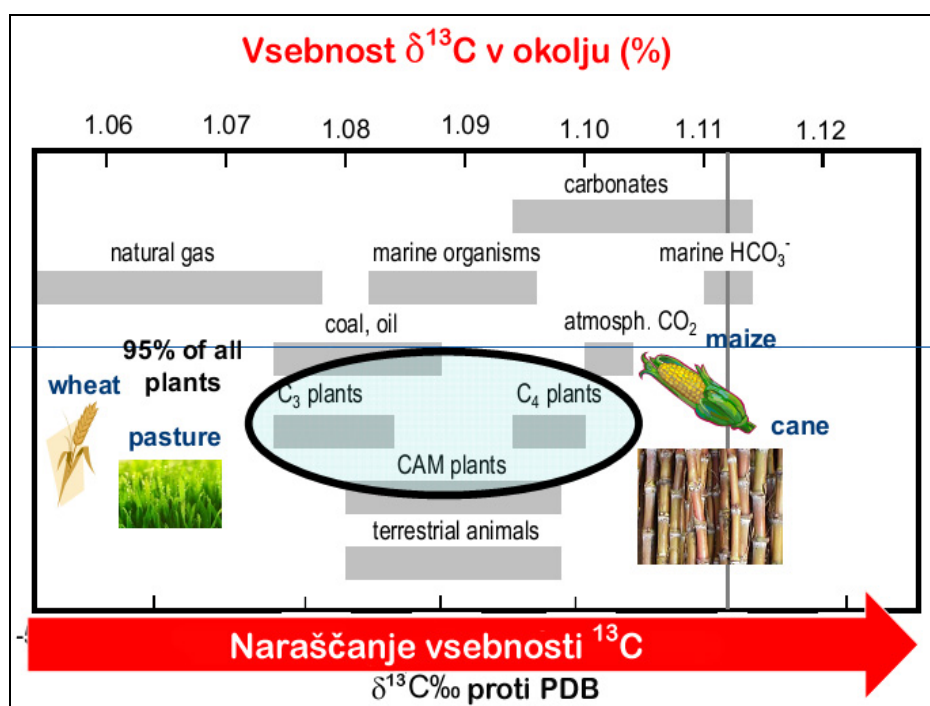
**Preglednica 4. Vzrok izotopske frakcionacije lahkih elementov v naravi in uporabnost razmerja izotopov lahkih elementov pri dolo anju izvora živila (Kelly in sod., 2005)**

**Table 4. Overview of the way in which the relative proportions of the natural abundance of isotope ratios are affected in the environment and how this can be exploited for food provenance determinations (Kelly in sod., 2005)**

Razmerje stabilnih izotopov	Vzrok frakcionacije	Informacija o izvoru
$^2\text{H}/^1\text{H}$	izhlapevanje, kondenzacija, precipitacija	geografski izvor
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	rastline $\text{C}_3$ in $\text{C}_4$	o prehrani (geografska bližina)
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	trofi ni nivo, morske in kopenske rastline, na in kmetovanja	o prehrani (geografska bližina)
$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	izhlapevanje, kondenzacija, precipitacija	geografski izvor
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	bakterijski	geografski izvor (morski)

Kot je razvidno iz preglednice 4, z merjenjem razmerja stabilnih izotopov dobimo v prvi vrsti informacijo o vrsti rastline ali vrsti krme (razmerja izotopov ogljika in vodika) in

o geografskem poreklu (razmerja izotopov vodika, kisika in žvepla). Določanje razmerja stabilnih izotopov vodika in kisika je uporabno pri označevanju geografskega porekla, saj so ta razmerja močno odvisna od zemljepisne širine. Na kmetovanju in prehrani živali vplivata na razmerja stabilnih izotopov dušika in ogljika v živilih s tega področja. Rastline C<sub>3</sub> uporabljajo za asimilacijo CO<sub>2</sub> Calvinovo pot fotosinteze, pri čemer diskriminirajo izotop <sup>13</sup>C. Razmerje izotopov <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C (<sup>13</sup>C) je v rastlinah C<sub>3</sub> manjše kot v rastlinah C<sub>4</sub>, ki za asimilacijo uporabljajo energijsko bolj učinkovit Hatch-Slackov cikel (prokaz v ošenem delu na sliki 1). Rastline C<sub>3</sub> prevladujejo predvsem na višjih zemljepisnih širinah, C<sub>4</sub> pa so značilne za toplejša področja bližje ekvatorju. Vrednost <sup>13</sup>C v rastlinah se tako znatno zmanjšuje z oddaljevanjem od ekvatorja proti polom; za večino sadja in žit je značilen Calvinov cikel in vrednosti <sup>13</sup>C blizu -25 ‰, za sladkorni trs in koruzo (C<sub>4</sub>) pa dokaj višje vrednosti <sup>13</sup>C, okrog -10 ‰. Poleg informacije o geografskem poreklu lahko to razmerje služi tudi pri preverjanju pristnosti živila v primeru prisotnosti rastlin C<sub>4</sub> (prisotnost fruktoznega sirupa HFCS v medu, kokoši krmljene s koruzo). Poleg odtisa dušikovega izotopa <sup>15</sup>N zagotavlja informacijo o geografskem izvoru tudi razmerje stabilnih izotopov žvepla. Le-to je v tesni zvezi s sestavo zemlje ali sulfatnega gnojila.



Slika 1. Razmerje stabilnih izotopov ogljika v okolju (Kelly, 2010)

Figure 1. Carbon stable isotope abundance in environment (Kelly, 2010)

Analiza stabilnih izotopov lahkih elementov se že več kot 20 let uporablja v kontroli pristnosti živil. Namen takih analiz je preverjanje, da npr. vino, sadni sokovi, med ali žganja niso bili razredeni z vodo in/ali s sladkorji (Antolovich in sod., 2001; Ogrinc in sod., 2001a; Padovan in sod., 2003; Simsek in sod., 2012) oziroma, da ekstra deviškemu olju ni bilo dodano olje iz tropin (Angerosa in sod., 1997). Rezultati analiz so pogosto zbrani v obsežnih podatkovnih bazah, ena od teh je Evropska podatkovna baza o stabilnih izotopih v vinu, ki obsega podatke za vsa vina, ki se pridelujejo na območju



Evropske skupnosti. Ena od najpogostejših potvorb medu je ravno mešanje medu s ceneniimi sladkornimi sirupi. Z analizo stabilnih izotopov ogljika (metoda SCIRA) lahko dokažemo prisotnost koruznega sirupa z visokim deležem fruktoze (HFCS) ali drugih sirupov pridobljenih iz rastlin  $C_4$ . V različnih vrstah medu so bile določene vrednosti  $^{13}C$  med  $-23,2\%$  in  $-24,6\%$  (Anklam, 1998). Ker same vrednosti  $^{13}C$  medu ne zagotavljajo vedno dokončne potrditve o prisotnosti sirupa iz rastlin  $C_4$  v medu, se določa tudi  $^{13}C$  proteinov, izoliranih iz medu. Proteini služijo kot interni standard (metoda ISCIRA). V pristnih vzorcih medu je bila določena ena razlika med  $^{13}C_{med}$  in  $^{13}C_{proteini}$  v območju med  $+1,1$  in  $-0,9\%$ . Velja, da je razlika med vrednostma, ki je večja ali enaka  $1,0\%$ , znak potvorbe medu (White in Winters, 1989; White in sod., 1998).

Določanje vrednosti  $^{13}C_{med}$  in  $^{13}C_{proteini}$  je uporabno pri odkrivanju potvorb s sirupi iz rastlin  $C_4$  ali CAM, ne pa tudi iz rastlin  $C_3$ , kot je na primer sirup iz sladkorne pese (González Martín in sod., 1998). Detekcijo sirupa iz rastlin  $C_3$  je omogočala nadgradnja metode v obliki povezave tekočinskega kromatografa z masnim spektrometrom za določanje stabilnih izotopov (LC-IRMS), s katero so Cabañero in sodelavci (2006) določili tudi vrednosti  $^{13}C$  fruktoze, glukoze in saharoze v medu. Elflein in Raetzke (2008) sta masni spektrometer združila tako s tekočinskim kromatografom kot tudi z analizatorjem elementov in dosegla še občutljivejšo detekcijo sirupov različnega izvora ter predlagala tudi nove standarde izotopskih vrednosti v pristnem medu. Predpostavila sta, da je med potvorjen, če je razlika v  $^{13}C$  vrednostih med posameznimi sladkorji večja od  $2,1\%$  in razlika v  $^{13}C$  vrednosti med fruktozo in glukozo večja od  $1,0\%$ .

### 2.1.1.3 Fizikalne lastnosti medu

Fizikalne lastnosti medu so tesno povezane z njegovo kemijsko sestavo. Posamezne komponente v medu lahko vplivajo na eno ali več fizikalnih lastnosti: količina soli vpliva na električno prevodnost, vsebnost in razmerje posameznih ogljikovih hidratov vpliva na specifični kot zasuka, vsebnost vode pa na viskoznost, hitrost kristalizacije in lomni količnik (White, 1978).

Vodna raztopina medu suše ravnino polarizirane svetlobe. Za to lastnost so odgovorni ogljikovi hidrati v medu. Znano je, da glukoza, disaharidi, trisaharidi in tetrasaharidi sukajo ravnino polarizirane svetlobe v desno, medtem ko jo fruktoza suše v levo. Levosustnost preberemo kot negativno vrednost **optične rotacije**. Ker imajo nektarne vrste medu več inoma več fruktoze kot glukoze, so zanje značilne negativne vrednosti optične rotacije. Med iz mane vsebuje več oligosaharidov, predvsem trisaharidov, zaradi česar ima pozitivno vrednost optične rotacije. Merjenje specifičnega kota zasuka se uporablja za razlikovanje med nektarnim in maninim medom, nekateri raziskovalci pa so uspeli s tem parametrom ločiti različne vrste medu iz nektarja (Bogdanov in sod., 2004; Lachman in sod., 2007).

Delež suhe snovi v medu določimo z merjenjem **lomnega količnika**. Meritev opravimo z refraktometrom, ki deluje na principu loma svetlobe ob prehodu skozi raztopino – med. Lomni količnik je odvisen od temperature, zato meritev opravljamo pri standardni temperaturi  $20\text{ }^{\circ}C$ , oziroma upoštevamo korekcijo, kadar temperatura odstopa od te vrednosti. Za izračun vode v medu iz optičnega lomnega količnika uporabljamo posebne

tabele ali pa meritev izvedemo z refraktometrom, ki je prilagojen za med (Bogdanov in sod., 1999).

Z **viskoznostjo** označujemo stopnjo tekočnosti medu. Od slednje so odvisni tudi postopki ravnanja z medom v procesu polnjenja in skladiščenja. Na viskoznost vpliva vsebnost vode v medu, botanični izvor nektarja, temperatura ter število in velikost kristalov (Nasiruddin Khan in sod., 2006). Viskoznost se zmanjšuje z večanjem vsebnosti vode in narašča s temperaturo.

**Kristalizacija** medu je naraven proces, do katerega pride zaradi spontanega izločanja glukoze iz nasičene raztopine sladkorjev. Pri tem se iz glukoze sprosti voda, nastali glukoza monohidrat pa kristalizira. Kristali glukoze monohidrata tvorijo mrežo, ki imobilizira tudi druge sestavine medu, prosta voda pa se nabira v vmesnih prostorih. Ker se količina proste vode poveča, je med bolj dovzeten za pojav fermentacije. Kristaliziran med je svetlejši, ima nekoliko drugačen okus in vpliva tudi na taktilne zaznave v ustih (Sabatini in sod., 2007).

Pojav in hitrost kristalizacije nista odvisna le od vsebnosti vode, marveč tudi od razmerja med fruktozo in glukozo in prisotnosti nekaterih drugih oligosaharidov, npr. melicitoze. Na kristalizacijo vplivajo tudi vsebnost elementov, organskih kislin, beljakovin, temperatura, zračenje in vlaga. Pospesujejo jo tudi delci, ki predstavljajo kristalizacijska jedra, to so cvetni prah, delci prahu ali voska. Ker je kristaliziran med med potrošniki manj zaželen, se za odstranitev začetka kristalizacije uporablja filtracija, s katero se odstranijo kristalizacijska jedra, ali kratkotrajno segrevanje medu na temperaturi med 60 in 70 °C (Sabatini in sod., 2007).

Velika količina sladkorjev v medu vpliva še na eno fizikalno lastnost, in sicer **higroskopskost**. Med, odvisno od relativne vlage v zraku in vsebovane vode, odpušča ali privlači vodo. Proces teče dokler se ne vzpostavi ravnotežje. Ker ima med veliko viskoznost, se absorbirana voda nabira predvsem na površini, zaradi česar je bolj podvržen kvaru. Na higroskopskost vpliva predvsem fruktoza, ki je bolj higroskopska kot ostali ogljikovi hidrati v medu (White, 1978).

#### 2.1.1.4 Senzorne lastnosti medu

Glavne senzorne lastnosti medu so videz, vonj, okus in aroma. V največji meri so odvisni od botaničnega izvora medu, nanje pa lahko vplivajo tudi pogoji predelave in skladiščenja medu. Senzorna analiza medu je nepogrešljiva pri vrednotenju kakovosti medu, saj velikokrat le na ta način lahko odkrijemo nekatere značilnosti medu, ki jih rutinske fizikalno-kemijske analize ne zaznajo. Prisotni tuji vonji in arome so lahko posledica neprimerne tehnologije čebelarjenja (uporaba sredstev proti varo – timol, uporaba dima), predelave (pregretje medu) ali sprememb medu (začetek fermentacije).

**Videz** medu predstavlja barva medu, ki je pri nekaterih vrstah lahko zelo svetla, skorajda brezbarvna, pri drugih pa temno rjavo- ali rjavo-rdeča. Drugi parameter videza je bistrost. Le-ta je odvisna predvsem od vrste nektarja oziroma mane. Po večini je med iz mane bolj moten kot med iz nektarja, vendar pa je smrekov med pri tem izjema.

Za **vonj** medu so odgovorne hlapne organske komponente, ki jih zaznavamo z vohanjem. **Aromo** medu zaznavamo retronazalno, med tem ko se med topi v ustih in se sprošajo tudi komponente, ki hlapijo pri telesni temperaturi. Vrste medu se med seboj razlikujejo v intenzivnosti vonja kot tudi notah vonja, podobno velja tudi za aromo. V okviru mednarodne komisije za med je bilo za poenotenje opisovanja vonja in arome medu sprejeto tako imenovano Kolo vonjev in arom, ki obsega sedem glavnih skupin: 1) tople note, 2) po cvetju in svežem sadju, 3) po svežem, 4) po kemikalijah, 5) lesne note, 6) rastlinske note in 7) po pokvarjenem (Piana in sod., 2004).

**Okus** vrednotimo z ocenjevanjem intenzivnosti štirih osnovnih okusov: sladkega, kislega, grenkega in slanega (Golob in sod., 2006). Eprav v medu prevladuje sladek okus, pa le-ta ni enako intenziven v različnih vrstah medu. Intenzivnost sladkega okusa je odvisna od sestave sladkorjev v medu. Fruktaza je na primer 1,7 krat bolj sladka kot saharoza, sladkost maltoza pa je le 1/3 sladkosti saharoze. Poleg sladkega je za med značilen tudi kisel okus, ki je lahko skoraj nezaznaven do srednje zaznaven, in za nekatere vrste medu še grenak (kostanjev med, med jagodičnice). Slan okus v večini vrst medu ni prisoten, značilen je le za posamezne vrste, na primer za med jagodičnice ali škrdžatov med. Poleg osnovnih okusov lahko v medu zaznavamo tudi snovi, ki dražijo trigeminalni sistem. Le-te zaznavamo kot trpko (lahko v kostanjevem medu), kovinsko (škrdžatov med) ali osvežilno, hladilno (lipov med).

Opisi senzoričnih lastnosti značilnih slovenskih vrst medu so zbrani v monografiji o značilnostih slovenskega medu (Golob in sod., 2008).

Za karakterizacijo senzoričnih lastnosti medu uporabljamo kvalitativno ali kvantitativno opisno analizo, ki jo izvajamo s šolanim panelom senzoričnih preskuševalcev. V rutinski oceni senzorične kakovosti medu se največkrat poslužujemo metod z lestvicami ali s to kovanjem (Sabatini in sod., 2007; Pravilnik o senzoričnem ocenjevanju medu, 2010).

#### 2.1.1.5 Melisopalinološke lastnosti medu

Podatke o vsebnosti peloda v medu in elementov mane, med katere spadajo spore alg in gliv, pridobimo z melisopalinološko analizo. S stališča vsebnosti in sestave peloda je vrstni med tisti, ki v netopnem sedimentu vsebuje najmanj 45 % pelodnih zrn iste botanične vrste. Ta vrednost je zelo splošna, saj je pregled pelodnih slik različnih vrst medu pokazal, da je za nekatere vrste medu značilen malo zastopan pelod (angl. under represented), za kostanjev med na primer pa so značilni zelo visoki deleži (angl. over represented) peloda kostanja. Tako se za vrstni kostanjev med zahteva, da vsebuje vsaj 90 % pelodnih zrn pravega kostanja (*Castanea sativa*). Zelo visoke deleže peloda imata tudi evkaliptusov (> 83 %) in repični med (> 60 %), malo zastopan pelod pa je značilen med drugim za akacijev (7 – 60 %), lipov (1 – 56 %), regratov (5 – 40 %) med in med rese (10 – 77 %) (Ohe in sod., 2004).

Melisopalinološka analiza je dolgotrajna in zahteva šolanega analitika, vendar nepogrešljiva v kombinaciji s senzoričnimi in fizikalno-kemijskimi analizami za kontrolo kakovosti medu.

## 2.2 PRISTNOST ŽIVIL

V Slovarju slovenskega knjižnega jezika (SAZU, 2000) je *pristnost* definirana kot lastnost oziroma značilnost pristnega. Pogosto se uporabljata tudi izraza avtentičnost in verodostojnost. Nasprotno pomeni *potvorba* ponaredbo, ponaredek, glagol *potvoriti* pa »natančno posneti kaj z namenom goljufanja; ponarediti«.

Spreminjanje živil z namenom povečanja dobička je v loveški družbi prisotno od samega začetka blagovnih menjav in trgovine. Z industrializacijo družbe je napredovala tudi tehnologija potvarjanja, potvorjena živila pa so z globalizacijo dobila še večjo razsežnost. Najnovejša definicija opredeljuje potvorbo živil kot skupni izraz za namerno zamenjavo, dodajanje, nedovoljeno spreminjanje ali napačno prikazovanje živila, sestavine živila ali embalaže živila, ali za lažne ali zavajajoče izjave o izdelku z namenom gospodarske koristi (Spink in Moyer, 2011).

Potvorbe živil tako obravnavamo z različnih vidikov (MoniQA, 2010; Moore in sod., 2012):

- ekonomski: potvorba živila višje vrednosti z namenom ekonomske pridobiti,
- zakonodajni: odstopanje od zakonsko predpisanih vrednosti oziroma veljavnih standardov kakovosti,
- tehnološki: uporaba nedovoljenih tehnik proizvodnje (npr. sevanja, zamrzovanja),
- izvor izdelka: napačen opis ali označba porekla (geografskega, botanike ipd.).

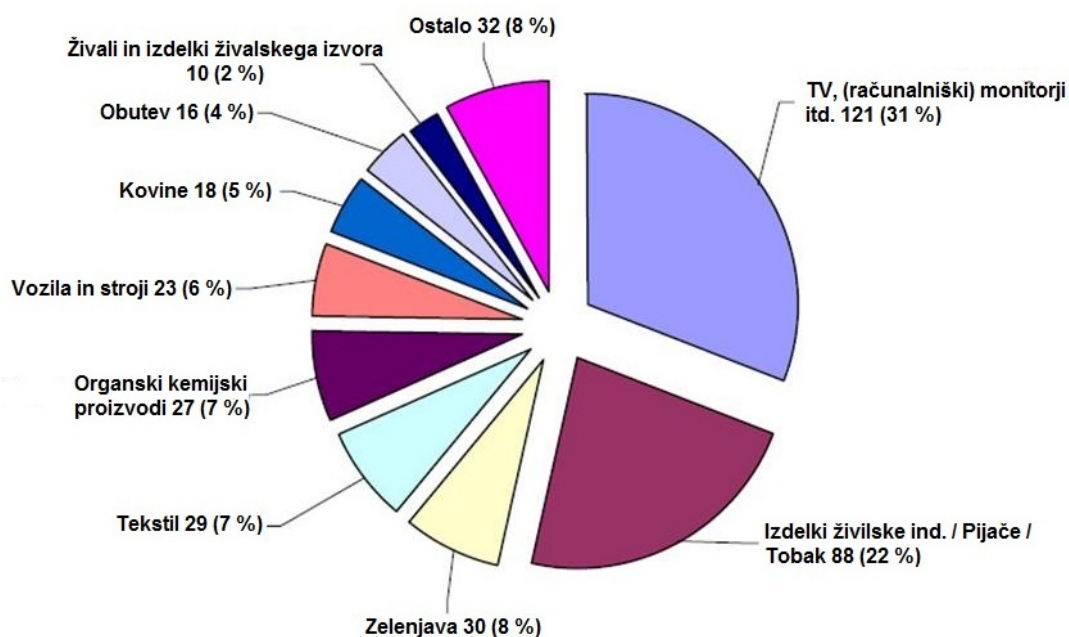
S preverjanjem pristnosti živil torej odkrivamo:

- živila, ki so napačno poimenovana in ne ustrezajo zahtevam za svoj naziv (meso, ki se prodaja kot pust, vendar vsebuje enako količino maščob kot običajno),
- prisotnost podobne, vendar cenejše sestavine v živilu (ponarejeni priznani alkoholni pijači),
- nedovoljen ali nedeklariran procesni postopek,
- potvorbo živila z dodatkom nedovoljene sestavine, ki vpliva na povečanje količine živila (dodatek cenejšega olja v olju, dodatek sirupa v med),
- neustreznost poimenovanja izvora živila (geografsko, botanike no poreklo ali proizvodna metoda, npr. ekološka proizvodnja) (TRACE, 2009; MoniQA, 2010).

Glavni motiv za potvarjanje živil je v prvi vrsti ekonomska pridobitev, vendar pa tako živilo nemalo kdaj (usodno) vpliva tudi na zdravje ljudi (Wiley, 1899; Spink in Moyer, 2011). Potvorbe živil lahko predstavljajo celo večjo nevarnost za zdravje ljudi kot tradicionalna tveganja pri varnosti hrane, saj so tuje snovi (adulteranti) pogosto nekonvencionalni in jih v klasičnih intervencijah največkrat ne iščemo in s klasičnimi analitskimi metodami ne zaznamo. O antičnih goljufijah s hrano pri ajo ponarejena tesnila za amfore, v katerih je bilo shranjeno potvorjeno olje ali vino iz Rimskega obdobja (Spink in Moyer, 2011). Ruska ortodoksna cerkev je leta 1890 prepovedala uvoz italijanskega olja, saj so ugotovili, da so bile predhodne pošiljke razredene z bombaževim oljem (neznani avtor, The Great Olive Oil Scandal, 2012). Laboratorij za javno zdravje iz bangladeške Dake je v analizi 76 naključno izbranih vzorcev živil ugotovil, da jih je bilo kar 76,3 % potvorjenih. Med drugim so odkrili škodljivo azo barvilo Sudan rdečo in prisotnost podobnih toksičnih barvil v melonah in paradižnikih, ter prisotnost cianida v gorčici (dodajajo ga za povečanje ostrine gorčice) in formalina na

ribjem mesu (Amin in sod., 2004). Na Kitajskem je zaradi melamina, ki je bil namesto beljakovin zamešan v mleko v prahu, umrlo več majhnih otrok (Tyan in sod., 2009). Veliko gospodarsko škodo so utrpeli avstrijski pridelovalci vina, ko je bil leta 1985 v avstrijskih vinih odkrit namerno dodan dietilen glikol. Afera je zajela še drugih 10 držav, kamor so Avstrijci vino izvažali (Barnes, 1996). Zaradi različnih afer s hrano na eni strani in boljše osveščenosti na drugi, so potrošniki pri izboru živil vse bolj previdni, vendar imajo, ob sodobni ponudbi izdelkov na policah, zahtevno delo.

Po podatkih Evropskega urada za boj proti goljufijam (OLAF) se je število nepravilnosti in prevar na področju hrane (natančneje izdelkov iz mesa, rib ali rakov, mehkužcev ali drugih vodnih nevreten arjev) v letu 2009 povečalo v primerjavi z letom prej in se je glede na vrednost, 12.747.858 € uvrstilo na lestvico 10 najpomembnejših vrst blaga (dobrin) (EC, 2010). Leto kasneje sta se na to neslavno lestvico uvrstila sladkor, predvsem zaradi nepravilnosti pri plačevanju davkov in zelenjava. Pri slednji je šlo v največjih primerih za naporno deklariranje esna, povezano s carinskimi dajatvami (EC, 2011).



Slika 2. Raz lenitev goljufij in nepravilnosti po vrsti blaga v letu 2010 v milijon €(EC, 2011)

Figure 2. Fraud and irregularities breakdown by goods in 2010 in Mio. €(EC, 2011)

Urad pridobiva informacije predvsem iz treh virov; to so splošna javnost, Evropska komisija in različni organi članic Evropske zveze. Preiskujejo tiste primere, ki so neposredno povezani z evropskimi sredstvi. Iz statističnih evidenc Urada je možno razbrati trende v nepravilnostih in goljufijah blaga, ki je na trgu v Evropi, vendar so ti zaradi obsežnosti informacij in skupin blaga zelo splošni. Kot primer lahko obravnavamo prikaz na sliki 2: velik del goljufij in nepravilnosti (22 %) odpade na tako imenovani Oddelek IV – Izdelki živilske ind. / Pijače / Tobak (TARIC, 2012) – pri čemer se moramo zavedati, da je ravno tobak največji vzrok za visoko številko. Velikosti tveganja, ki ga neko živilo predstavlja, najsi bo to tveganje z vidika ekonomske goljufije ali ogrožanja

zdravja, tako ni mogoče oceniti. Kot pišejo Moore in sodelavci (2012), je za oceno tveganja nekega živilskega izdelka, izdelanega v določeni regiji, potrebno dobro poznavanje proizvodnje živila, sestavin živila in vrst potvorb, ki jim je to živilo lahko podvrženo, kot tudi transportnih faz. Priložnost za potvorbo se namreč ponuja na vsakem koraku živilske verige. Lastnosti, čistost in pristnost živila lahko spremeni vsak prevoznik, veleprodajalec ali posrednik, ki to živilo zbira, meša in embalira. Da bi lahko bolje razumeli namen, obseg in nevarnost, ki jo predstavljajo potvorbe živil, ter na ta način omogočili oceno tveganja nekega živila, so avtorji iz javno dostopnih objav sestavili podatkovno bazo živilskih potvorb med leti 1980 in 2010. Z analizo podatkov so ugotovili, da je bilo v teh letih največ objav o potvorbah olj, mleka in medu.

Poleg osnovne zahteve, da je hrana visoke kakovosti in varna, ima vse večinoma tudi njen izvor oziroma poreklo. Večina informacij o izdelku potrošniki pridobijo z njegove embalaže, zato je to navedba izrednega pomena. Pristnost živila, ki ga je potrošnik kupil, se med drugim nanaša tudi skladnost lastnosti živila z navedbami na njegovi embalaži. Označevanje živil v Evropski uniji je opredeljeno v Direktivi 2000/13/ES (2000), ki velja za vsa živila. Predpisuje osnovne elemente označevanja živil, ki so: ime, pod katerim se živilo prodaja, seznam sestavin, količina posameznih sestavin ali kategorije sestavin, minimalni rok trajanja ali rok uporabe, po potrebi posebna navodila za hrambo ali uporabo izdelka ter podatki o proizvajalcu, polnilcu ali prodajalcu s sedežem v EU. Na primer, ime »med« je zakonsko predpisano ime za ves med, ki se prodaja v Evropski uniji. Dodatne zahteve za to živilo so opredeljene v Direktivi 2001/110/ES o medu (2002) in slovenskem Pravilniku o medu (2011).

Poreklo ali ime živila ali živilskega izdelka je lahko tudi dodatno zaščiteno, kadar izpolnjuje zahtevane pogoje. Pravila za zaščiteno označbo porekla (ZOP, angl. PDO – *Protected Designation of Origin*) ali geografske označbe (ZGO, angl. PGI – *Protected geographical Indication*) živil in kmetijskih proizvodov v Evropski zvezi so določena v Uredbi 510/2006 (Uredba Sveta (ES) št. 510/2006 z dne 20. marca 2006 o zaščitni geografski označbi in označbi porekla za kmetijske proizvode in živila, 2006), za proizvode z zaščitno Zajameno tradicionalno posebnostjo (ZTP, angl. TSG – *Traditional Speciality guaranteed*) pa v Uredbi 509/2006 (Uredba Sveta (ES) št. 509/2006 z dne 20. marca 2006 o zajamjenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil, 2006). Ti predpisi urejajo zlasti pristnost živil s certificiranim poreklom, geografsko označbo ali tradicijo. Glavni namen Uredbe 510/2006 je: zagotavljanje, da se pod zaščiteno označbo prodajajo le proizvodi, ki dejansko izvirajo iz določene regije; definiranje obvezne uporabe simbolov in omogočanje lažje prepoznavnosti zaščitnih proizvodov na trgu, da bi med drugim tudi olajšali nadzor. Uredba 509/2006 spodbuja raznolikost kmetijske proizvodnje in proizvodnje tradicionalnih kmetijskih proizvodov s posebnimi značilnostmi; zagotavlja ustrezne mehanizme, ki proizvajalcem takih izdelkov omogočajo povečanje tržne vrednosti, obenem pa potrošnike ščitijo pred nepravilnim ravnanjem; ter uvaja certificiranje ZTP, ki je skladno s priporočilom potrošnikov glede tradicionalnih živilskih izdelkov s posebnimi značilnostmi.

Sledljivost predstavlja temelj politike o varnosti živil v Evropski uniji, in mehanizem, ki omogoča umik tistih izdelkov s trga, za katere je ugotovljeno odstopanje ali neskladje. Zaradi vse večje kompleksnosti in podaljševanja živilske verige je sledljivost velikokrat

okrnjena. Splošna načela in zahteve živilske zakonodaje ter postopke, ki zadevajo varnost hrane, določa Uredba (ES) 178/2002 (2002), ki je bila tudi podlaga za ustanovitev Evropske agencije za varno hrano (EFSA). Namen te uredbe z vidika pristnosti živil je preprečiti evanjenje goljufij in zavajanj, ponarejanja živil in drugih ravnanj, ki bi lahko zavajala potrošnika. Na osnovi »načela previdnosti« uredba določa splošne zahteve za uvedbo sledljivosti živil in krme, s katerimi zavezuje vse, ki delajo z živi in krmo, da izvajajo sistem sledljivosti. To pomeni, da mora sistem sledljivosti zagotavljati tako informacije o tem, od kod njihov izdelek ali surovina prihaja, kod tudi kam je namenjena, podatke pa lahko hitro posreduje tudi pristojnim organom. Kljub temu, da uredba zahteva striktno sledljivost dokumentov oz. zapisov po načelu »eden gor in eden dol« (torej, od koga je proizvajalec kupil in komu je prodal), pa Uredba ne pokriva celotne prehranske verige »od vil do vilic«.

Inšpekcijske službe in analitski laboratoriji se v praksi pri preverjanju sledljivosti in pristnosti živila velikokrat srečujejo s težavami, ki so povezane z vzorčenjem živila, ustreznimi analiznimi metodami in metodami za obdelavo podatkov ter z interpretacijo vrednosti analiziranih parametrov. Pristnost živil preverjamo z robustnimi markerji, ki jih določamo s hitrimi in zanesljivimi validiranimi metodami, analitske podatke obdelamo z ustrežno statistično metodo, pri vrednotenju pa uporabljamo obsežne in ažurirane podatkovne baze s podatki za določene markerje (MoniQA, 2010).

Kljub temu, da je na voljo že precej hitrih kemijskih in biokemijskih tehnik, ki v kombinaciji s statistično obdelavo omogočajo dokaj uspešno odkrivanje nepristnih živil, sta pogosti neznanki delovno območje metode in merilna negotovost. V okviru mreže odločnosti MoniQA je bila zgrajena podatkovna baza, ki zajema analizne metode in informacije o sposobnostih metode, stopnji validacije, zakonskih zahtevah in omejitvah. Baza omogoča iskanje primerne metode glede na specifični marker ali onesnažilo (kontaminant), ki ga želimo v živilu določiti, in je povezana tudi z zakonodajnimi dokumenti Evropske zveze in s hitrim sistemom obveščanja RASFF (*Rapid Alert System on Food and Feed*). Eden glavnih namenov baze je harmonizacija in standardizacija metod, ki se uporabljajo za preverjanje pristnosti živil v Evropi (MoniQA, 2010).

### 2.3 PRISTNOST MEDU

Zaradi svoje cene in omejene količine je med privlačen tudi za ponarejevalce, ki hlepijo po lahkemu zaslužku. Potvorbe živil niso izum industrijske dobe, saj so ponarejevalce odkrivali in lovili že v trinajstem stoletju. Vendar pa je zanesljivo in rutinsko preverjanje in potrjevanje pristnosti živil dolgo časa predstavljalo problem v živilski industriji (Cáceres in sod., 2000). Z razvojem industrije in novih izdelkov je težava naraščala, saj so tudi adulteranti oziroma nedovoljeni dodatki vse bolj kompleksni. Z uporabo sodobnih analitskih metod se je povečala sposobnost odkrivanja nedovoljenih dodatkov v živilih. Kljub temu pa je njihovo dokazovanje še vedno zelo zahtevno v živilih z naravno veliko vsebnostjo ogljikovih hidratov, kot na primer dokazovanje prisotnosti cenениh sladkornih sirupov v medu (Swallow in Low, 1994). Med najpogostejše potvorbe medu sodijo redčenje medu z vodo in dodajanje sladkorja oziroma sladkornih sirupov različnega izvora (koruzni sirup, koruzni sirup z visokim deležem fruktoze, sirup iz sladkorne pese). Med potvorbe prištevamo tudi proizvodnjo medu z intenzivnim dohranjevanjem čebel s

sladkorjem ali sladkornimi sirupi med pašno sezono z namenom pove ati koli ino pridelanega medu ter namerno napa no ozna evanje botani nega, topografskega ali proizvodnega (ekološko, biodinami no) porekla medu (White, 1980; Swallow in Low, 1994; Molan, 1996; Paradkar in Irudayaraj, 2002; Ruoff in sod., 2006; Bogdanov in Gallmann, 2008). Cotte in sodelavci (2003) so potvorbe medu glede na njihov vzrok razdelili v dve skupini:

- Potvorbe zaradi namernega dodatka sladkornega sirupa. Tega ponarejevalci obi ajno dodajo samemu medu ali pa z njim krmijo ebele in tako pove ajo koli ino pridobljenega medu. Poleg tradicionalnih sladkornih mešanic, kot sta invertni sirup in koruzni sirup, se vse pogosteje uporablja koruzni sirup z visokim deležem fruktoze (HFCS) in sirupi izdelani iz škroba drugih rastlinskih vrst (riža, sladkorne pese).
- Potvorbe zaradi neustrezno deklariranega imena in vrste medu kot posledica mešanja medu razli nih vrst (namernega ali nenamernega).

Vidik pristnosti medu je v resnici še nekoliko širši in obsega:

- pristnost medu z oziroma na proizvodnjo medu,
- pristnost medu z ozirom na ozna bo botani nega in geografskega porekla ter drugih ozna b (ekološki, višja kakovost) (Bogdanov in Martin, 2002; Wang in Li, 2011).

### **2.3.1 Pristnost medu z vidika njegove proizvodnje**

Proizvodni proces medu obsega postopke, ki lahko spremenijo sestavo medu in vlivajo na njegove lastnosti in pristnost. Pri to enju medu iz satja se uporablja centrifugiranje, ki se odvija pri temperaturah med 25 in 32 °C. Ozna ba na medu »pridobljen v hladnem« je tako nepravilna in zavajajo a. Ve je delce odstranimo iz medu s filtracijo ez 0,2 mm ali manj gosta sita. Dovoljeno ga je tudi filtrirati, vendar je to potrebno tudi navesti na deklaraciji. Postopek izdelave kremnega medu obi ajno poteka pri temperaturah nižjih od 20 °C, poleg tega gre le za mešanje fino kristaliziranega med s teko im medom, zato ne vpliva na pristnost medu (Bogdanov in Martin, 2002). Uporaba temperatur višjih od 45 °C in daljših asov za uteko injanje medu ali pasterizacijo povzro a izgubo hlapnih komponent in encimske aktivnosti medu ter pospešeno tvorbo HMF.

ebelarji z ustrezno ebelarsko prakso skrbijo, da sladkorne raztopine, s katerimi krmijo ebele, ne zahajajo neposredno v med. Zaradi tehnoloških zna ilnosti tradicionalnega na ina ebelarjenja z AŽ panji (metoda prevešanja) morajo biti pri tem še posebej pozorni slovenski ebelarji (No in Kandolf, 2012). Drug na in, da sladkor zaide v med, je namerno dodajanje sladkornega sirupa. Uporabljajo se sladkorni sirupi, pridobljeni s kislinsko hidrolizo, koruzni sirupi, naravni sirupi, kot so javorjev, trsni, pesni in melasa. V zadnjem obdobju so bili odkriti predvsem sirupi pridobljeni s hidrolizo koruznega škroba, trsnega in pesnega sladkorja (Bogdanov in Martin, 2002).

Med potvorjen med prištevamo tudi med, ki je za el fermentirati. Fermentacija je namre najve krat posledica prevelike vsebnosti vode v medu, do katere pride, e ebelar to i nedozorel med. V fermentiranem medu so prisotni tuji vonji in arome, veliko število mrtvih kvasnih celic, glicerol, butandiol in etanol (Ruoff in Bogdanov, 2004). Tako kot ni dovoljeno dodajanje vode v med, kljub temu, da je njena naravna vsebnost nizka, je prepovedan tudi vsak postopek, s katerim bi »sušili« nezrel med.



### 2.3.1.1 Metode za preverjanje pristnosti medu zaradi vplivov med njegovo proizvodnjo

Morebitne napake pri proizvodni medu lahko odkrivamo z analizo parametrov kakovosti medu, ki ji predpisuje Pravilnik o medu (2011) in so bili opisani v poglavju 2.1.1, za kar uporabimo rutinske metode (Bogdanov in sod., 2009; Piana in sod., 2004; Official methods of analysis of AOAC International, 2011).

Pri odkrivanju potvorb medu je uporabna tudi analiza peloda, s katero je mogoče ugotoviti dodatek sirupa prek mikroskopske detekcije celi nega tkiva sladkornega trsa ali škrobnih zrn (Kerkvliet in sod., 1995). Metoda daje dobre rezultate, vendar pa je njena učinkovitost zelo omejena v primeru medu, ki je bil podvržen ultrafiltraciji (Kerkvliet in Meijer, 2000).

Tudi sestava ogljikovih hidratov v medu lahko odraža njegovo pristnost. Za določanje vsebnosti sladkorjev so primerne različne fizikalno-kemijske in encimske metode, v zadnjem času pa predvsem različne kromatografske tehnike.

Prve analize sladkornega profila vzorcev medu so bile opravljene s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC – thin layer chromatography). Sledila je plinska kromatografija (GC – gas chromatography), za katero je potrebna derivatizacija sladkorjev. S slednjo je bilo mogoče razvrstiti med glede na botanično poreklo. Zaradi zapletenosti in dolgotrajnosti derivatizacije plinske kromatografije, je bila preskušena tekoinska kromatografija, ki je omogočila določitev številnih di- in trisaharidov in na ta način zanesljivo razvrstila medu glede na botanični izvor. Za ugotavljanje potvorb sta tekoinsko kromatografijo z anionsko izmenjevalno kolono (AELC-PAD) prva uporabila Swallow in Low (1994) in z njo odkrila dodatek koruznega sirupa HFCS v deležih 5 % in več. Določila sta oligosaharidno sestavo vzorcev medu, kemijsko in encimsko proizvedenega invertnega sirupa in koruznega sirupa HFCS. Ugotovila sta, da imajo sirupi značilno mešanico oligosaharidov, ki sicer niso prisotni ali pa so v znatno manjšem deležu prisotni v medu in so zato uporabni pri nedovoljeni rabi sirupov v proizvodnji in prodaji medu.

Skupaj s senzorno in pelodno analizo ter z analizo zakonsko določenih fizikalno-kemijskih parametrov lahko odkrijemo določene pomanjkljivosti vzorca medu in podvomimo v njegovo pristnost, lahko le-to potrdimo ali ovržemo le z analizo specifičnih parametrov. Razmerje izotopov  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v medu ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ) in razmerje izotopov  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v izolatu proteinov iz medu ( $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ) sta ob utljljiva pokazatelja prisotnosti sladkornega sirupa, ki izvira iz škroba/sladkorjev rastlin s tako imenovanim  $\text{C}_4$  tipom fotosinteze (sladkorni trs, koruza). Z uradno AOAC metodo SCIRA (angl. *Stable Carbon Isotope Ratio Analysis*) je mogoče ugotovili potvorbe medu z dodatkom približno 20 % sladkorja iz rastlin  $\text{C}_4$  (White in Doner, 1978), z izboljšano različico z uvedbo internega standarda – z metodo ISCIRA (angl. *Internal Standard Isotope Ratio Analysis*) – pa med 7 in 20 % dodanega sirupa. To ne količine dodatka z metodo ni mogoče ugotoviti, zanesljivo pa pokaže, da je potvorjen s sladkornim sirupom (White in Winters, 1989). Cotte in sod. (Cotte in sod., 2003) so metodama očiteli pomanjkljivosti pri odkrivanju dodanega sirupa sladkorne pese ( $\text{C}_3$ ), saj v slednji teče ravno tako Kalvinov cikel fotosinteze kot v medovitih rastlinah. Zato so predlagali metodo tekoinske kromatografije sklopljeno s pulzno amperometrično detekcijo (HPAEC-PAD) za analizo fruktoze in glukoze ter plinsko kromatografijo s plamenskim ionizacijskim detektorjem (GC-FID) za analizo profila di- in trisaharidov v različnih vrstah pristnih medov. Že v naslednji raziskavi so (Cotte in sod., 2007) primerjali uporabnost metod  $^2\text{H}$  SNIF-NMR (angl. *site specific natural isotopic fractionation-nuclear magnetic resonance*) in SCIRA-MS (*stable carbon*

isotopic ratio analysis-mass spectrometry) pri odkrivanju potvorb medu s sirupi C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub>. Metoda <sup>2</sup>H SNIF-NMR je uporabna za kontrolo pristnosti medu in naj bi bila primerna tudi za ugotavljanje dodanega sladkorja rastlin C<sub>3</sub>, kot poročajo Lindner in sodelavci (1996), ki so jo uporabili za ugotavljanje pristnosti medu iz citrusov. Giraudon in sodelavci (2000) so jo uporabili za potrditev izotopske metode. Cotte in sodelavci (2007) z njo niso dosegli zadovoljivih rezultatov, saj so z njo detektirali le vzorce z 20 % in več dodanega sirupa, med tem ko so z metodo SCIRA-MS dokazali laboratorijsko dodan sladkorni sirup iz rastlin C<sub>4</sub> v višini od 9 do 10 % skupne mase made. Španci (Cabañero in sod., 2006) so uradno izotopsko metodo dopolnili s predhodno lobo sladkorjev (saharoze, glukoze in fruktoze) na HPLC. Na osnovi razlik v razmerjih izotopske sestave ogljika treh sladkorjev (<sup>13</sup>C (fru.–glu.), (fru.–sah.), (glu.–sah.)) so določili ali tako dodan sladkor ali sirup rastlin C<sub>4</sub> kot tudi C<sub>3</sub> (sladkorna pesa). Dodatni napredek v analitiki predstavlja nadgradnja omenjenih analiz z določanjem <sup>13</sup>C v frakcijah fruktoze, glukoze, disaharidov in trisaharidov, s katero je mogoče dokazati tudi prisotnost sirupa rastlin C<sub>3</sub> v deležih od 8 % (Elflein in Ræzke, 2008), vendar pa avtorji raziskav opozarjajo tudi na veliko naravno variabilnost izotopskih parametrov posameznih vrst medu (Beckmann in sod., 2009). V preglednici 5 so za primerjavo zbrana območja vrednosti <sup>13</sup>C<sub>med</sub> v različnih vrstah medu in sladkornih frakcijah, ter v nekaterih sladkornih sirupih in sladkorjih.

Sladkorni sirupi, ki končajo kot adulteranti v medu, se pridobivajo s hidrolizo škroba, pri čemer sirup lahko vsebuje višje deleže maltoze in maltotrioze, ki jih lahko detektiramo z metodami tekoinske ali plinske kromatografije. V industriji sirupov se pogosto uporablja kombinacija hidrolize s kislino in encimom invertazo (-fruktofuranozidazo), ki saharozo pretvori v fruktozo in glukozo. Prisotnost tuje invertaze v medu ugotavljamo prek njene aktivnosti ob prisotnosti substrata rafinoze (Beckmann in sod., 2010).

Vsebnost dušika v medu je majhna. V predhodnih raziskavah slovenskega medu (Plestenjak, 2000) je bilo ugotovljeno, da je vsebnost skupnih beljakovin v različnih vrstah medu, določena s Kjeldahlovo metodo, med 0,13 in 0,49 %. Velik razpon (0,019 – 0,237 %) in koeficient variacije so ugotovili tudi Azeredo in sodelavci (2003) v brazilskih nektarnih medovih različnih vrst, ki so opravili analizo beljakovin s kolorimetrično Bradfordovo metodo, ter Küçük in sodelavci (2007), ki so za analizo turških medov (0,07 – 0,17 % beljakovin) uporabili spektrofotometrično metodo po Lowryju. Pri analizi venezuelskih medov so za ugotavljanje potvorb z dodanim sladkorjem uporabili vsebnost skupnega dušika in predlagali spodnjo mejo 10 mg skupnega dušika na 100 g medu (Anklam, 1998). Vzorce z manj skupnega dušika so sumili kot potvorjene. Abdel-Aal in sodelavci (1993) so ugotovili, da je vsebnost skupnega dušika v obratnem sorazmerju s količino dodanega sladkorja medu.

**Preglednica 5. Območja vrednosti  $^{13}\text{C}$  (‰) v pristnem medu in nekaterih sladkornih sirupih in sladkorjih**

**Table 5. Ranges of  $^{13}\text{C}$  (‰) in authentic honey, in some sugar syrups and sugars**

Vir	Območje $^{13}\text{C}$ (‰)	Avtor
akacijev med ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -23,9 do -25,8	1,2
cvetlični med ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -24,7 do -27,2	1
lipov med ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -24,9 do -25,7	1,2
kostanjev med ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -23,9 do -26,2	2,3
med oljne ogrščice ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -26,1 do -27,1	1,3
gozdni med ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -24,7 do -27,0	1
pristen med, splošno ( $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ )	od -23,0 do -27,3	1,4
fruktoza iz medu	od -22,7 do -27,5	1,4,5
glukoza iz medu	od -22,3 do -27,3	1,4,5
disaharidi iz medu	od -21,1 do -28,6	1,5
trisaharidi iz medu	od -22,1 do -27,6	1,5
rižev sirup (C3)	od -25,8 do -27,4	1,5
invertni sirup iz pesnega sladkorja (C3)	od -26,1 do -26,4	1,5
pesni sladkor	-23,95	7
saharoza iz sladkorne pese	od -24,3 do -26,4	1
HFS – sirup z visokim deležem fruktoze (C3)	od -25,4 do -25,9	1
sirup iz pšeninega škroba s C4 fruktozo (C3 in C4)	od -19,8 do -21,5	1,5
HFCS – koruzni sirup z visokim deležem fruktoze (C4)	od -9,5 do -9,8	6
trsní sladkor	-11,40	7
saharoza iz sladkornega trsa (C4)	od -10,3 do -12,2	1
fruktoza	-24,94	7
glukoza	-25,05	7
saharoza	-22,96	7

1 - (Elflein in Raetzke, 2008), 2 - (Kropf in sod., 2010a), 3 - (Cotte in sod., 2007), 4 - (Cabañero in sod., 2006), 5 - (Beckmann in sod., 2009), 6 - (White in Doner, 1978), 7 - (González Martín in sod., 1998)

Kot je razvidno iz pregleda, suma na potvorbo medu s sladkornim sirupom ne moremo zanesljivo potrditi ali ovreči le z analizo enega samega parametra. Določiti je treba vrednosti različnih parametrov kakovosti medu, kar pa je zamudno in tudi zahtevno. Rutinska kontrola pristnosti medu zahteva hitre, nedestruktivne in zanesljive metode. Glede na rezultate zadnjih raziskav veliko obetajo metode spektroskopije FT-Raman (Paradkar in Irudayaraj, 2002), mid-IR (Sivakesava in Irudayaraj, 2002) in FTIR-HATR (Gallardo-Velázquez in sod., 2009), s katerimi so dokazali tudi prisotnost invertnega sirupa iz sladkorne pese.

### 2.3.2 Pristnost medu z ozirom na označbo

Med je kompleksno živilo in podobno kompleksna oziroma veplastna je tudi njegova pristnost. V zadnjem času ob potvorbi medu najprej pomislimo na ponaredek medu, ki mu

je bil dodan sladkorni sirup. Vendar pa je nepristen med lahko tudi posledica neustreznega ebelarjenja in ebelarjevega nepoznavanja pridelka, ali pa namernega napačnega poimenovanja botaničnega porekla (vrste medu) ali geografskega izvora v želji po večji zasluži. Medonosne čebele *Apis mellifera* nabirajo nektar na cvetovih medonosnih rastlin ter izločajo iz živih delov rastlin ali izločajo žuželke, ki sesajo rastlinski sok na živih delih rastlin. Ti dve osnovni surovini za med nato zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, posušijo in pustijo dozoreti v satju (Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu, 2002; Pravilnik o medu, 2011). Vrsta osnovne surovine, ki jo čebele zberejo, značilno vpliva na vsebnost posameznih sestavin v medu in na razmerja med njimi, kot tudi na poreklo medu, ki ga kasneje definira ebelar oziroma proizvajalec. V nadaljevanju so predstavljeni različni vidiki pristnosti medu in izbrani parametri, ki opredeljujejo kakovost in pristnost medu v Evropski zvezi.

### 2.3.2.1 Pristnost medu in označba botaničnega porekla

Pravilnik o medu (Pravilnik o medu, 2011) dovoljuje dopolnitev imena »med« na etiketi z označbo, ki se nanaša na botanični izvor medu, kadar ima tak med značilne fizikalno-kemijske, senzorične in pelodne lastnosti. V tem primeru govorimo o vrstnem medu, ki ga poimenujemo po rastlini, prevladujoči v nektarju. Med, ki bi izviral izključno iz enega botaničnega izvora, je namreč izjemno redek. Naravni pogoji v Sloveniji omogočajo predvsem pridelavo akacijevga, lipovega, kostanjevega, hojevega in smrekovega medu, na Krasu pa tudi medu rešeljike. Poleg teh se v zadnjih letih povečuje količina pridelanega medu oljne ogrščice, na posameznih lokacijah, kjer obujajo sejanje ajde, pa ebelarji pridelajo tudi ajdov med. Vrstni med je med potrošniki bolj cenjen in dosega višje cene kot mešani – cvetlični ali gozdni – med, zato se pod oznako vrstnega medu lahko, namerno ali nenamerno, najde tudi tak, ki zahtevam za vrstni med ne ustreza.

#### 2.3.2.1.1 Metode za preverjanje pravilnosti označbe botaničnega porekla

Ustreznost deklarirane vrste medu preverjamo s senzorično analizo, ki jo izvaja šolan panel, z rutinsko analizo fizikalno-kemijskih parametrov in z melisopalinološko analizo, pri kateri moramo upoštevati, da je vsebnost peloda odvisna od botanične vrste nektarja. V kontroli ni dovolj le poznavanje zakonsko predpisanih parametrov, marveč je potrebna tudi podrobna karakterizacija posameznih vrst medu. Za primerjavo skladnosti so v pomoč podatki referenčnih vzorcev vrste medu, zbrani v podatkovnih bazah in obdelava s kemometrijskimi metodami (Mateo in Bosch-Reig, 1998; Kukurova in sod., 2008).

Od botaničnega porekla medu je odvisna tudi vsebnost številnih drugih, specifičnih snovi v medu, ki jih določamo:

- z metodami plinske ali tekočinske kromatografije: aminokisliline (Bernal in sod., 2005; Rebane in Herodes, 2010), ogljikovi hidrati, (Korošec in sod., 2009; Kaškonien in sod., 2010; Wang in Li, 2011), fenolne spojine (Bertoncelj in sod., 2011) in organske kisline (del Nozal in sod., 1998; Ruoff in sod., 2006);
- s plinsko kromatografijo: hlapne spojine (Bianchi in sod., 2005; Cuevas-Glory in sod., 2007; Aliferis in sod., 2010; Donarski in sod., 2010);
- s spektroskopskimi metodami: elementi (Golob in sod., 2005; Bogdanov in sod., 2007; Karoui in sod., 2007).

Raziskovalci so preskušali tudi uporabnost nedestruktivnih spektroskopskih metod za rutinsko kontrolo botaničnega porekla medu, ki bi zamenjale zamudne klasične analize. Za uspešno se je izkazala spektroskopija NIR (Ruoff in sod., 2006; Chen in sod., 2011) in pri švicarskem medu tudi fluorescenca na spektroskopija (Karoui in sod., 2007), v korziškem medu pa so značilne botanične markerje ugotavljali s pomočjo jedrske magnetne (NMR) spektroskopije (Donarski in sod., 2010).

### 2.3.2.2 Pristnost medu in označba geografskega porekla

Med spada med živila, za katere zakonodaja predvideva obvezno označevanje države ali držav porekla. V slednjem primeru ni potrebno navajanje posamezne države, marveč se uporabljajo tri različne oznake glede na to, ali gre za med, pridelan v državah članicah Evropske zveze in državah, ki niso članice EU. Poleg tega se ime »med« lahko dopolni tudi z oznako, ki se nanaša na regionalno, teritorialno ali topografsko poreklo, če med v celoti izvira z navedenega območja (Pravilnik o medu, 2011). Poudarek tovrstnega izvora medu na etiketi ne pomeni le informacije potrošniku o tem, od kod med prihaja, marveč usmerja njegovo pozornost na (posebne) lastnosti izdelka. Kot so ugotovili Van der Lans in sodelavci (2001) na primeru ekstra deviškega oljčnega olja iz dveh italijanskih pokrajin, predstavlja informacija o geografskem izvoru izdelka potrošnikom neke vrste jamstvo za kakovost izdelka. Pomembnejšega vpliva znakov zaščitne evropske sheme (ZOP, ZGO) pri tem niso potrdili. Do podobnih zaključkov je prišla tudi Resano s sodelavci (2012), ki je ugotovila še, da na vsečnost in prednostno izbiro izdelka, v tem primeru španskega pršuta, bolj vpliva regionalno poreklo kot država izvora. V svoji raziskavi so odkrili še, da se potrošniki po namenu nakupa pršuta delijo v dve skupini, in sicer tisto, ki se za nakup odločijo na osnovi geografskega porekla, ki je označeno na izdelku, in drugo, v kateri so potrošniki z nekoliko višjimi prihodki, ki jim jamstvo za kakovost in pristnost predstavlja predvsem znak ZOP ali ZGO.

#### 2.3.2.2.1 Metode za preverjanje ustreznosti označbe geografskega porekla

Predmet namernega naprednega deklariranja geografskega izvora je pogosto cenejši med, ki prihaja iz neevropskih držav ali med, ki se ga označi z evropsko zaščitno in s simbolom kakovosti (ZOP in ZGO), čeprav do tega ni upravičen. Za določanje geografskega porekla medu se je uporabna pelodna analiza, vendar so njeni rezultati manj zanesljivi v primeru vzorcev medu iz bližnjih regij (Bogdanov in Martin, 2002).

Poleg pelodne se uporabljajo še analize rutinskih fizikalno-kemijskih parametrov, prolina, in ogljikovih hidratov v kombinaciji z multivariatno statistično analizo (Oliveri in Downey; Nozal in sod., 2005; Karabournioti in sod., 2006; Kropf in sod., 2009; Castro-Vázquez in sod., 2010).

Pri določanju geografskega porekla naj bi bila uporabna tudi razmerja med posameznimi aminokislinami, določeni z GC (Davies, 1976) vendar pa so taki rezultati uporabni le takrat, kadar gre za analizo iste botanične vrste medu iz različnih geografskih območij (Ruoff in Bogdanov, 2004). Med iste botanične vrste iz različnih področij se lahko razlikuje tudi v elementni sestavi, kar je za slovenske vrste medu dokazala Kropfova s sodelavci (2009; Kropf in sod., 2010a). Z analizo stabilnih izotopov H, C, N in S v

proteinih izoliranih iz vzorcev medu iz 20 evropskih regij je bilo ugotovljeno, da so vrednosti tesno povezane z geografskim področjem. K razlikovanju med enakimi vrstami medu iz različnih regij sta največ prispevala  $^{13}\text{C}$  in  $^{34}\text{S}$  v proteinih medu (Schellenberg in sod., 2010). Zvezo med geografskim področjem in  $^{13}\text{C}$  so pred tem potrdili tudi drugi raziskovalci (Anklam, 1998; Kropf in sod., 2010b; Wang in Li, 2011).

V preglednici 6 so zbrani parametri medu, ki se uporabljajo pri preverjanju pristnosti medu v zvezi s sestavo medu oziroma tehnološkim procesom proizvodnje medu, ter z označnim botanikom in/ali geografskim poreklom medu.

Tudi za preverjanje geografskega izvora medu se iščejo hitre in nedestruktivne metode, kot je na primer nuklearna magnetna resonanca (NMR), ki sta jo Consonni in Cagliani (2008) uporabila za karakterizacijo cvetličnega in akacijevga medu iz različnih regij, spektroskopija NIR (Woodcock in sod., 2007; Woodcock in sod., 2009), analiza proteinskega odtisa (angl. protein fingerprint) z metodo MALDI TOF MS (Wang in sod., 2009). Čižmariš in sodelavci (2009) je preverjal, ali je mogoče razlikovati med akacijevim oziroma kostanjevim medom različnega geografskega izvora s pomočjo analize z elektronskim nosom. Razlikovanje je bilo uspešno le med tistimi vzorci, ki so izvirali iz bolj oddaljenih regij.

**Preglednica 6. Parametri medu, pomembni pri preverjanju njegove pristnosti (Korošec in sod., 2012)**

**Table 6. Parameters of honey, important in verification of its authenticity (Korošec et al., 2012)**

Parameter	Vidiki pristnosti medu		
	proizvodni proces	botanično poreklo	geografsko poreklo
senzorične lastnosti	+	+	
melisopalinološke značilnosti	+	+	+
električna prevodnost	+	+	
vsebnost HMF	+		
aktivnost diastaze in invertaze	+	+	
vsebnost beljakovin		+	+
vsebnost aminokislin (prolin)		+	
sestava ogljikovih hidratov in razmerja med njimi		+	
vsebnost posameznih elementov		+	+
parametri barve ( $L^*a^*b^*$ )		+	
$^{13}\text{C}_{\text{med}}$	+		+
$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ in $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$	+		+
biomarkerji (nekateri hlapni in fenolne spojine)		+	

### 2.3.3 Kemometrijske metode

Sum o potvorbi medu lahko najve krat potrdimo ali ovržemo šele s celostnim pregledom vseh parametrov, ki smo jih analizirali. Pri tem upoštevamo obmoja vrednosti, ki so značilna za posamezno vrsto medu. Znatno odstopanje od značilnih vrednosti lahko kaže na prisotnost tujih sladkorjev v medu ali drugo nepravilnost, ki je povezana s sestavo ali označbo medu.

Za zanesljivo opredelitev vzorcev so potrebne analize več parametrov, zato je ovrednotenje rezultatov zahtevno in se zanje uporabljajo različne kemometrijske metode. Običajno se za določanje lastnosti živila uporabljajo različne multivariatne umeritvene in regresijske metode. Za razvrščanje vzorcev v skupine ali razrede s podobnimi lastnostmi uporabljamo metodo glavnih osi (Principal Component Analysis – PCA) in različne metode grupiranja. Podobnost neznanega vzorca s skupinami drugih poznanih vzorcev lahko ugotavljamo s pomočjo diskriminantnih analiznih metod, kot sta linearna in kvadratna diskriminantna analiza (Linear Discriminant Analysis – LDA, Quadratic Discriminant Analysis – QDA) ter Kohonenove nevrnske mreže (Kohonen Artificial Neural Networks – KANN). Uporaba multivariatnih statističnih metod je nepogrešljiva pri razvrščanju po podobnosti in klasifikaciji med različnih izvora. Prav se metode uporabljajo predvsem v raziskovalne namene in redkeje v rutinski kontroli, so primerne tako na področju botanike ali geografskega porekla medu kot tudi potrjevanja pristnosti (Arvanitoyannis in sod., 2005). Cotte in sod. (2003) so uporabili metodo glavnih osi (PCA), da so pojasnili dodatek sirupa različnim vzorcem medu. S to metodo so uspeli razlikovati med pristnimi in potvorjenimi vzorci. Cordella in sodelavci (2005) so uporabili linearno diskriminantno analizo (LDA) za razvrščanje in identifikacijo potvorbe, medtem ko so za opredelitev ravni potvorbe (koli in dodanega sladkornega sirupa) uporabili analizo delnih kvadratov (Partial Least Squares – PLS).

Zaradi variabilnosti medu kot naravnega materiala in zanesljivosti pri odkrivanju potvorb moramo med njim boljše poznati. To pomeni, da moramo poznati kar največ njegovih komponent in njihovo vsebnost (tako povprečno vrednost kot tudi obmoje vrednosti). Vse te podatke zbiramo v obširni podatkovni bazi (Korošec in sod., 2010). Z uporabo multivariatne analize podatkov, zajetih v bazi in podatkov neznanega vzorca, lahko preverimo ustreznost njegove označbe in do določene mere tudi pristnost.

Med se razlikuje tako v botaniki izvora kot tudi glede na geografsko poreklo, oba vira pa vplivata na njegove fizikalno-kemijske, senzorične in pelodne lastnosti. Raziskava in izmerjeni parametri bodo pripomogli k osnovanju baze, ki bo služila pri odkrivanju potvorbe medu, obenem pa bomo s parametri obogatili tudi obstoječo bazo, ki nam trenutno omogoča ugotavljanje razlik med vzorci medu iz različnih geografskih območij. Analize morajo biti zato kompleksne, število vzorcev pa veliko, z zastopanostjo vseh vrst, vrlet in iz vseh predelov Slovenije.

### 3 MATERIAL IN METODE

V raziskavi smo z različnimi fizikalno-kemijskimi analizami, ki so opisane v nadaljevanju, analizirali 379 vzorcev medu treh letnikov. Določili smo vrednosti do 70 različnih parametrov. Analitske podatke smo obdelali z različnimi statističnimi metodami, s katerimi smo iskali značilne zveze med različnimi parametri in vrstami medu.

#### 3.1 VZORCI

Analizo fizikalno-kemijskih parametrov in senzoričnih lastnosti smo opravili:

- na dveh skupinah vzorcev:
  - na vzorcih medu različnih vrst,
  - na vzorcih potvorjenega medu, ki smo jih pripravili z dodatki sirupa referenčnemu vzorcu medu.
- na sladkornih sirupih, ki smo jih uporabili za pripravo potvorjenega medu.

##### 3.1.1 Med

Predmet analize je bilo 379 vzorcev medu različnih vrst, letnikov 2008, 2009 in 2010. Vzorce medu smo pridobili na tri načine in sicer:

- neposredno pri čebelarjih, v nadaljevanju jih imenujemo pristni vzorci oziroma med slovenskih čebelarjev;
- z mešanjem pristnega medu in sladkornega sirupa: izbranim vzorcem pristnega medu smo dodali znane deleže fruktozno-glukoze, glukoze in invertnega sirupa. V nadaljevanju jih imenujemo potvorjeni oziroma med z dodanim sirupom;
- v trgovinah. Vzorce smo s skupnim imenom poimenovali trgovinski vzorci.

V preglednici 7 je predstavljen pregled vzorcev po vrstah, letniku in izvoru. Izvor medu v tem primeru pomeni, da je bil vzorec medu pridobljen ali neposredno pri slovenskih čebelarjih, vzorec v trgovini ali potvorjen z dodatkom sladkornega sirupa. Vzorec pri čebelarjih je potekalo selektivno z namenom pridobiti vzorce medu s čim bolj značilnimi lastnostmi za posamezno vrsto. Vzorce smo izbrali na osnovi senzorične ocene tričlanskega panela. Za Slovenijo je najbolj značilnih pet vrst medu, in sicer akacijev, lipov, kostanjev, hojev in smrekov med ter dva mešana tipa medu – cvetlični (nektarni) in gozdni (manin) med. Z vzorcem smo želeli zagotoviti skupno vsaj dvajset slovenskih vzorcev posamezne vrste, vendar nam to pri hojevem in smrekovem medu ni uspelo zaradi slabih letin v času vzorčenja.

Poleg uveljavljenih vrst medu smo se pri vzorčenju osredotočili še na dve vrsti, ki dobivata v zadnjih letih vse večji pomen. Zaradi obsežnejšega gojenja oljne ogrščice (*Brassica napus L. var. napus*), predvsem v severovzhodni Sloveniji, so v cvetličnem medu, ki ga tam pridobivajo, velikokrat zaznavne senzorične lastnosti medu oljne ogrščice. Pogosto so le-te tako izrazite in prevladujejo, da ga na osnovi senzorične ocene ne moremo več uvrstiti med mešan, t.j. cvetlični med, marveč govorimo o medu oljne ogrščice. Druga vrsta je rešeljikov med, ki je značilen za kraško področje. Čebele nabirajo medino na rešeljiki (*Prunus mahaleb*), ki med konca aprila in v maju. Med je vključen tudi v označbo »Kraški med z značilno označbo porekla«, ki jo je podelilo slovensko Ministrstvo za



kmetijstvo gozdarstvo in prehrano, ter v postopku pridobitve evropske zaščitne ZOP. Fizikalno-kemijske lastnosti medu oljne ogršice niso bile določene v celoti (npr. razmerje stabilnih izotopov ogljika), medtem ko karakterizacija rešljikovega medu do sedaj sploh še ni bila opravljena.

**Preglednica 7. Pregled analiziranih vzorcev medu po letnikih in vrstah medu**

**Table 7. Overview of analysed honey samples according to year of harvest and type of honey**

Vrsta medu	Izvor	Letnik			Skupaj vzorcev
		2008	2009	2010	
akacijev	pristni	3	19	7	29
	potvorjeni	-	-	7	7
	trgovinski	6	2	-	8
cvetli ni	pristni	16	18	7	41
	potvorjeni	8	21	-	29
	trgovinski	21	7	2	30
lipov	pristni	6	13	4	23
	potvorjeni	-	-	8	8
	trgovinski	3	2	-	5
kostanjev	pristni	11	15	5	31
	potvorjeni	7	-	7	14
	trgovinski	2	3	-	5
gozdni	pristni	27	11	1	39
	potvorjeni	-	21	-	21
	trgovinski	12	4	-	16
hojev	pristni	5	-	4	9
	trgovinski	-	1	-	1
smrekov	pristni	3	1	3	7
m. oljne ogršice	pristni	13	15	-	28
rešljikov	pristni	7	6	4	17
druge vrste:					
škržatov	pristni	-	1	-	1
m. divje ešnje	pristni	-	1	1	2
ajdov	pristni	2	-	1	3
žajbljev	trgovinski	1	-	-	1
timijanov	trgovinski	1	-	-	1
sivkin	trgovinski	1	-	-	1
m. pomaranče	trgovinski	1	-	-	1
rožmarinov	trgovinski	1	-	-	1
Skupaj vzorcev		157	161	61	379

Trgovinske vzorce smo vzorili v večjih trgovskih centrih v Ljubljani in trgovskih verigah s cenovno ugodnejšo ponudbo. Geografski izvor teh vzorcev so bile države članice EU (Španija) ter druge države izven EU, pri čemer njihovo ime ni bilo specificirano.

Med vzorci slovenskega akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetličnega in gozdnega medu smo izbrali reprezentativni vzorec in mu primešali znano količino sladkornega sirupa. Iz izbranih vzorcev medu smo pripravili serijo potvorjenih vzorcev z naslednjimi masnimi deleži sladkornega sirupa: 1, 2, 4, 8, 12, 16 in 20 g/100 g. Vrste sirupov in oznake potvorjenih vzorcev so predstavljeni v preglednici 8.

**Preglednica 8. Deleži in vrste sirupov v namerno potvorjenih vzorcih medu**

**Table 8. Types of sugar syrups and their ratios in intentionally adulterated honey samples**

Referen ni vzorec medu	Oznaka potvorjenega medu	Vrsta sirupa*	Delež sirupa v medu (g/100 g)	Referen ni vzorec medu	Oznaka potvorjenega medu	Vrsta sirupa*	Delež sirupa v medu (g/100 g)
C33	C33f1	GF1	1	G36	G36f1	GF1	1
	C33f2		2		G36f2		2
	C33f3		4		G36f3		4
	C33f4		8		G36f4		8
	C33f5		12		G36f5		12
	C33f6		16		G36f6		16
	C33f7		20		G36f7		20
	C33g1	GL	1		G36g1	GL	1
	C33g2		2		G36g2		2
	C33g3		4		G36g3		4
	C33g4		8		G36g4		8
	C33g5		12		G36g5		12
	C33g6		16		G36g6		16
	C33g7		20		G36g7		20
	C33i1	IN	1		G36i1	IN	1
	C33i2		2		G36i2		2
	C33i3		4		G36i3		4
C33i4	8		G36i4	8			
C33i5	12		G36i5	12			
C33i6	16		G36i6	16			
C33i7	20		G36i7	20			
C02	C02f01	F	1	A26	A26f1	GF2	1
	C02f05		5		A26f2		2
	C02f10		10		A26f3		4
	C02f20		20		A26f4		8
	C02g01	G	1		A26f5		12
	C02g05		5		A26f6		16
	C02g10		10		A26f7		20
	C02g20		20				
L20	L20f1	GF2	1	K29	K29f1	GF2	1
	L20f2		2		K29f2		2
	L20f4		8		K29f3		4
	L20f5		12		K29f4		8
	L20f6		16		K29f5		12
	L20f7		20		K29f6		16
					K29f7		20
L23	L23f2	GF2	2	K02	K02f02	F	2
	L23f3		4		K02f05		5
K01	K01g05	G	5		K02f10		10
	K01g10		10		K02f20		20
	K01g20		20				

\* Vrsta sirupa: GF1 – fruktozno-glukozni sirup C\*TruSweet 01750 (Cargill), leto 2009; GF2 – fruktozno-glukozni sirup C\*TruSweet 01730 (Cargill), leto 2010; GL – glukozni sirup C\*Sweet M 01277 (Cargill), leto 2009; IN – invertni sirup (Emba), leto 2009; F – fruktozno-glukozni sirup C\*TruSweet 01750 (Cargill), leto 2008; G – glukozni sirup C\*Sweet M 01277 (Cargill), leto 2008.

Vse vzorce smo hranili v steklenih kozarcih s pokrov ki, v temi, pri sobni temperaturi. Pred analizo smo jih homogenizirali z mehanskim mešanjem. e smo za analizo potrebovali teko med, smo del kristaliziranega vzorca prenesli v tehtni , ga tesno zaprli in segrevali pri 40 °C. Po segrevanju smo ga ohladili na sobno temperaturo in premešali.

### 3.1.2 Sladkorni sirupi

V prvem delu raziskave smo uporabili tri različne sladkorne sirupe: glukoznega (G in GL), fruktozno-glukoznega (F in GF1) in invertnega (IN), da smo ugotavljali njihov vpliv na izbrane fizikalno-kemijske lastnosti medu. V drugem delu raziskave smo uporabili le fruktozno-glukozni sirup (GF2), ki je najmanj vplival na spremembo analiziranih fizikalno-kemijskih lastnosti. Za izbrani sirup smo zasledili tudi oglase, v katerih so ga promovirali za dohranjevanje čebel kot ustrezno zamenjavo za dražjo saharozo.

Uporabili smo naslednje sladkorne sirupe:

- fruktozno-glukozni sirup C\*TruSweet 01730 (Cargill), prispevalo podjetje s čebelarsko opremo Sonlen. Oznaka sirupa: GF2;
- fruktozno-glukozni sirup C\*TruSweet 01750 (Cargill), prispevalo podjetje Dana d.d., Mirna. Oznaka sirupa: F (v letu 2008) in GF1 (v letu 2009);
- glukozni sirup C\*Sweet M 01277 (Cargill), prispevalo podjetje Mercator Emba d.d., Logatec. Oznaka sirupa: G (v letu 2008) in GL (v letu 2009);
- invertni sirup: proizvajalec in dobavitelj Mercator Emba d.d., Logatec. Oznaka sirupa: IN.

Surovine za sirupe in sestava sirupov, kot sta jo navedla proizvajalca (Cargill in Mercator Emba), so predstavljeni v preglednici 9.

**Preglednica 9. Vrsta, izvor in sestava uporabljenih sladkornih sirupov, kot so navedli proizvajalci**

Parameter	C*Sweet M 01277	C*TruSweet 01750	C*TruSweet 01730	Invertni sirup
vrsta sirupa	glukozni	fruktozno-glukozni		invertni
oznaka KN*	1702 30 90 <sup>a</sup>	1702 40 10 <sup>b</sup>		1702 90 95 <sup>c</sup>
surovina	koruzni škrob, pšeni ni škrob			saharosa
pridobivanje	encimska hidroliza škroba	kislinska in/ali encimska hidroliza škroba		inverzija s kislino
suha snov (g/100 g)	81,5 – 82,5	70,5 – 71,5	77	73 – 75
fruktoza (g/100 g)	-	40 – 44	22 – 28	-
glukoza (dx) (g/100 g)	0 – 6	50 – 56	30 – 37	-
maltoza (dp2) (g/100 g)	46 – 52	0 – 5	17 – 24	-
maltotrioza (dp3) (g/100 g)	15 – 25	0 – 5	5 – 15	-
pH	3,5 – 5,5	3,5 – 5,5	3,5 – 5,5	-

\* Oznaka kombinirane nomenklature (KN): (Uredba o kombinirani nomenklaturi carinske tarife s carinsko tarifo, 1999) in (Zakon o izvajanju carinskih predpisov Evropske skupnosti (ZICPES), 2004).

<sup>a</sup> glukoza (dekstroza) in glukozni sirup brez fruktoze ali z manj kot 20 mas.% fruktoze v suhem stanju.

<sup>b</sup> glukoza in glukozni sirup z najmanj 20 mas.% in manj kot 50 mas.% fruktoze v suhem stanju, brez invertnega sladkorja.

<sup>c</sup> Sirup iz invertnega sladkorja, ki ga sestavljajo (v mas. %): - sladkor (izražen kot saharosa) 66,5; - voda 31; - propilenglikol 2,5.

## 3.2 SENZORI NA ANALIZA MEDU

Senzori na analizo medu uporabljamo za vrednotenje senzoričnih lastnosti medu. Uporabljamo lahko kvalitativne metode, s katerimi v rutinski kontroli preverjamo ustreznost deklarirane vrste, za podroben opis senzoričnih lastnosti pa je potrebna deskriptivna senzorična analiza.

### 3.2.1 Kvalitativna senzorična analiza

#### Princip:

Pri senzorični analizi s svojimi utili ugotavljamo in vrednotimo lastnosti medu. Ocenjujemo videz, vonj, okus in aromo. S kvalitativno metodo potrdimo vrsto medu, ki jo je deklariral izdelatelj, pri čemer ne uporabljamo to kovanja.

#### Izvedba:

Senzorični panel so sestavljali trije šolani preskuševalci, ki so pri ocenjevanju senzoričnih lastnosti vzorcev upoštevali značilne lastnosti videza, vonja, okusa in arome posameznih vrst medu.

V skladu z uveljavljeno prakso (Pravilnik o senzoričnem ocenjevanju medu, 2010) je bila preskuševalcem v oporo predhodno izmerjena električna prevodnost medu. Med iz nektarja mora imeti vrednost električne prevodnosti  $\geq 0,8$  mS/cm, med iz mane pa  $> 0,8$  mS/cm, pri čemer te omejitve ne veljajo za nekatere vrste medu (Pravilnik o medu, 2011).

### 3.2.2 Kvantitativna deskriptivna analiza

Analizo smo uporabili za opis in ovrednotenje intenzivnosti senzoričnih lastnosti vrst medu, ki do sedaj še niso bile definirane (rešeljikov med).

#### Princip:

Z deskriptivno metodo definiramo senzorični profil vzorca medu. To pomeni, da določimo značilne lastnosti senzoričnih lastnosti medu ob pomoči referenčnih standardov in jih tudi kvantificiramo. Metoda je osnovno obsežna in zahteva panel preskuševalcev specialistov (ISO 13299, 2003).

#### Izvedba:

Senzorični panel so sestavljali trije šolani preskuševalci, ki so ovrednotili senzorične lastnosti medu rešeljike. Za opis videza smo uporabili opisnike za barvno lestvico medu, ovrednotili smo tudi bistrost medu. Vonj in aromo smo opisali s standardnimi opisniki, definiranimi v Kolesu vonjev in arom (Piana in sod., 2004). Pri okusu smo ovrednotili prisotnost in intenzivnost sladkega, kislega, grenkega in slanega okusa z opisniki: nezaznavno (0), zaznavno (1), šibko (1), srednje (2) in močno (3) zaznavno.

V skladu z uveljavljeno prakso (Pravilnik o senzoričnem ocenjevanju medu, 2010) je bila v vzorcih predhodno izmerjena električna prevodnost medu.

### 3.3 DOLO ANJE VSEBNOSTI OGLJIKOVIH HIDRATOV Z METODO LC-MS

#### Princip:

Pripravimo vodno raztopino vzorcev medu v 50 % acetonitrilu in jih analiziramo s teko insko kromatografijo HILIC (angl. Hydrophilic Interaction Chromatography) z masnim detektorjem.

#### Reagenti:

- mobilna faza A: 30/70 acetonitril/voda z 0,10 % NH<sub>4</sub>OH,
- mobilna faza B: 80/20 acetonitril/voda z 0,10 % NH<sub>4</sub>OH,
- standardi: fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza, turanoza, palatinoza, gentibioza, melibioza, rafinoza, melicitoza, maltotrioza, izomaltotrioza, panoza.
- standardne raztopine sladkorjev: lo eno pripravimo raztopino vsakega standarda posebej v koncentraciji 0,4 g/100 mL v 50 % acetonitrilu. V bu ko odtehtamo ustrezno koli ino analitsko istega standarda in ga raztopimo v dvakrat destilirani vodi. Dopolnimo do oznake. Razred imo z raztopino acetonitrila do koncentracije od 0,04 do 0,4 g sladkorja/100 mL v 50 % acetonitrilu.

#### Aparatura in pribor:

- teko inski kromatograf Agilent Technology 1100: z vakuumskim razplinjevalnikom G1379A, binarno rpalko G1312A, avtomatskim podajalnikom vzorcev G1330B in s termostatom kolone G1316A.
- kromatografska kolona: XBridge™ Amide 3,5 μm × 2,1 × 100 mm (Waters),
- masni detektor Micromass Quattro Micro (Waters):
  - na in: ESI (angl. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry)
  - kapilara (kV): 4,50
  - cona (V): 20
  - le a (V): 3
  - eksreaktor (V): 0,5
  - temperatura Cone (°C): 120
  - temp. razpršilnega N<sub>2</sub> (°C): 350
  - pretok N<sub>2</sub> Cone (L/h): 30
  - pretok razpršilnega N<sub>2</sub> (L/h): 400
- filtri za filtracijo (Millipore) vzorcev z najlonsko membrano z velikostjo por 0,22 μm.

#### Delovni pogoji:

- Volumen injiciranja: 1 μL,
- Temperatura vzorcev: 8 °C,
- Temperatura kolone: 45 °C.

#### Detekcija:

- Na in: SIR (angl. Selected Ion Recording)

vrsta saharida	m/z	cona (V)
monosaharidi	179,44	14
disaharidi	314,35	30
trisaharidi	503,35	40

**Preglednica 10. Gradient mobilne faze pri LC-MS analizi ogljikovih hidratov v medu**

**Table 10. Mobile phase gradient for LC-MS analysis of carbohydrates in honey**

as (min)	mobilna faza A (%)	mobilna faza B (%)	Pretok (mL/min)
0	0	100	0,120
15	20	80	0,120
20	30	70	0,120
21	70	30	0,120
23	0	100	0,120
30	0	100	0,120

Priprava vzorcev za analizo:

V ašo odtehtamo  $1 \pm 0,0001$  g vzorca medu in raztopimo v dvakrat destilirani vodi, razplinimo in premešamo v ultrazvo ni kopeli (10 min.). Vzorce kvantitativno prenesemo v 50 mL bu ko in dopolnimo do oznake z dvakrat destilirano vodo. Raztopino vzorca prelijemo v 50 mL plasti no centrifugirko in centrifugiramo 5 min. pri obratih  $4000 \text{ min}^{-1}$ . Odpipetiramo ekvivalentni volumen supernatanta raztopine vzorca in acetonitrila, da dobimo kon no raztopino vzorca medu 0,4 g/100 mL v 50 % acetonitrilu. Filtriramo ez filter z velikostjo por 0,22  $\mu\text{m}$  neposredno v vialo. Vialo takoj zapremo in izvedemo analizo.

Izvedba analize:

Pred analizo vzorcev smo dolo ili delovne pogoje sistema in naredili umeritveno krivuljo za navedene sladkorje. S pomo jo petih raztopin standardov sladkorjev s koncentracijami med 0,4 in 0,04 g/100 mL v 50 % acetonitrilu smo za merjeno koncentracijsko obmo je izra unali ena bo umeritvene krivulje in koeficient determinacije ( $r^2$ ).

Za umeritveno krivuljo in analizo vzorcev medu smo na kolono vbrizgali 25  $\mu\text{L}$  raztopine. Vzorce smo analizirali v dveh ponovitvah.

Izra un vsebnosti sladkorjev v vzorcu:

Kromatograme smo obdelali s programom Quantify v MassLynx<sup>TM</sup> V4.0. Vsebnost sladkorjev v medu smo kvantitativno ovrednotili s primerjavo površin vrhov raztopine medu s površinami vrhov standardnih raztopin. Pri prera unu smo upoštevali tudi maso odtehtanega vzorca medu in faktor razred itve. Rezultate za posamezne sladkorje v medu smo podali v g/100 g medu.

Sladkorje smo identificirali na osnovi retencijskih asov, ki so zna ilni za posamezni sladkor. Uporabili smo tudi Metodo standardnega dodatka, pri kateri vzorcu medu dodamo znano koli ino izbranega standarda sladkorja, pri emer se na kromatogramu vrh tega sladkorja pove a.

Preverjanje ponovljivosti metode:

- dnevna ponovljivost: vzorce medu L23, R05 in IG362 smo analizirali v osmih ponovitvah in izra unali parametre ponovljivosti. Delovanje sistema smo kontrolirali tako, da smo z vsako analizo analizirali tudi raztopine standardov sladkorjev s koncentracijo 0,04 g/100 mL v 50 % acetonitrilu. Dnevna ponovljivost analize ogljikovih hidratov z opisano metodo je bila zadovoljiva, saj je bil KV manjši od 6 % pri vseh saharidih, razen pri gentibiozi z melibiozo, kjer je znašal 12 %.

- meddnevna ponovljivost: vzorce medu A23, K31 in FG362 smo analizirali v petih različnih dneh, v skupaj enajstih ponovitvah. Meddnevna ponovljivost je bila za vse ino ogljikovih hidratov zadovoljiva, saj je KV za fruktozo, glukozo, saharozo in maltozo znašal 5,0 %, za ostale ogljikove hidrate pa 20,0 %.

### 3.4 DOLO ANJE RAZMERIJ IZOTOPOV OGLJIKA IN DUŠIKA V MEDU IN NJEGOVIH FRAKCIJAH

#### 3.4.1 Določanje razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v medu (SCIRA – Stable Isotope Ratio Analysis) (AOAC 998.12, 1999)

##### Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega ( $^{13}\text{C}$ ) in lažjega ( $^{12}\text{C}$ ) izotopa ogljika v medu. Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo v ‰,  $^{13}\text{C}$ , definirane z enačbo (1).

##### Reagenti:

- interni, laboratorijski standard: ureaC (urea), (Kemika, Hrvaška),
- referenčni standardi: IAEA-NBS 22 (oil), IAEA-CH-7 (polyethylen), IAEA-CH-6 (sucrose), (IAEA, Avstrija).

##### Aparatura in pribor:

- kositrove kapsule dimenzije 6x4 mm (SerCon, Velika Britanija),
- plastični nosilci za kapsule,
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce (Europa Scientific, Velika Britanija).

##### Priprava vzorcev za analizo:

Uteko injen med smo eno uro homogenizirali v ultrazvočni kopeli. Homogeniziran vzorec (1 – 2 µg) smo z ozko spatulo prenesli v kositrovo kapsulo, jo s pinceto zatisnili in oblikovali v kroglico ter prenesli v nosilec za kapsule. Nosilec smo postavili na avtomatski podajalnik masnega spektrometra. Sledil je sežig posameznih vzorcev.

##### Izvedba analize:

- Kakovost meritev spremljamo z analizo referenčnih standardov IAEA-NBS 22 (oil), IAEA-CH-7 (polyethylen), IAEA-CH-6 (sucrose), z vrednostmi  $^{13}\text{C}$ :  $-29,7 \pm 0,2$  ‰,  $-31,8 \pm 0,2$  ‰ in  $-10,4 \pm 0,2$  ‰. Za vsakodnevno preverjanje pravilnosti meritev, to je na začetku in koncu merjenja ter na vsakih pet do deset izmerjenih vzorcev, uporabljamo laboratorijski standard ureaC. Napaka meritev znaša 0,2 ‰. Izvedbo je podrobneje opisala Kropf (2009).

##### Izražanje:

Razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo, ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard

(st). Enota so promili (‰). Za izražanje smo uporabili ena bo 1, predstavljeno v poglavju 2.1.1.2.

#### Preverjanje ponovljivosti metode:

Pet vzorcev medu smo analizirali v šestih paralelkah. Podobno kot Kropf (2009) smo ugotovili dobro ponovljivost metode, saj je povprečna *KV* znašal 0,44 %. Preostale vzorce smo analizirali v dveh paralelkah in rezultate podali kot aritmetično sredino teh dveh meritev.

### **3.4.2 Določanje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v proteinih medu (ISCIRA – Internal Standard Isotope Ratio Analysis) (AOAC 998.12, 1999)**

#### Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa ogljika v proteinih izoliranih iz medu. Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo  $\delta^{13}\text{C}$  v ‰, definirano z ena bo (1).

#### Reagenti:

- $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (10 % vodna raztopina), (Sigma-Aldrich, Švica),
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,33 M – 1,88 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /100 mL vode), (Merck, Nemčija),
- interni, laboratorijski standard: urea-C (urea), (Kemika, Hrvaška),
- referenčni standardi: IAEA-NBS 22 (oil), IAEA-CH-7 (polyethylen), IAEA-CH-6 (sucrose), (IAEA, Avstrija).

#### Aparatura in pribor:

- 50 mL plastične centrifugirke z zamaškom,
- centrifuga Eppendorf 5810 (možnost centrifugiranja pri 1500 g), (Eppendorf, Nemčija),
- 2 mL centrifugirke,
- kositrove kapsule dimenzije 6x4 mm (SerCon, Velika Britanija),
- plastični nosilci za kapsule,
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce (Europa Scientific, Velika Britanija).

#### Priprava vzorcev za analizo – izolacija proteinov medu (White in Winters, 1989):

V 50 mL plastično centrifugirko z navojem smo odtehtali 10–12 g medu, dodali 4 mL vode in med raztopili s pomočjo mešanja s stekleno palčko. V vialo smo zmešali 2 mL 10 % raztopine volframata in 2 mL (0,33 M) žveplove (VI) kisline ter mešanico med mešanjem dodali v centrifugirko. Centrifugirko z vsebino smo segrevali na vodni kopeli (80 °C) ca 30 minut, da so se tvorili vidni kosmiči in bister supernatant. V primeru, da se kosmiči niso tvorili ali je supernatant ostal moten, smo dodali še po 2 mL kisline in ponovno segrevali, dokler niso nastali kosmiči. Nato smo raztopino v centrifugirki dopolnili z destilirano vodo do oznake 50 mL in centrifugirali 5 minut pri obratih 1500 g, odlili supernatant in sprali oborino 5 krat s po 50 mL destilirane vode (oborina se mora dobro oistiti). S Pasteurjevo pipeto smo prenesli oborino z minimalno vode (supernatanta) v 2 mL centrifugirko, jo pokrili in za 2 minuti potopili v vrelo vodo, da so proteini popolnoma koagulirali (ta korak



ni potreben, e nadaljnja analiza poteka takoj po obarjanju). Vzorec v 2 mL centrifugirki smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 1500 g in s Pasteurjevo pipeto odstranili ve ino supernatanta. Oborino smo posušili v sušilniku pri 75 °C (vsaj 3 ure). Tako pripravljene izolirani proteini so obstojni v hladilniku (hladen in temen prostor) v zaprti epruveti/viali ali že v kapsulah.

#### Izvedba analize:

Izvedba analize je enaka, kot je opisano pri metodi SCIRA. Napaka meritev znaša 0,2 ‰.

#### Izra un potvorbe medu:

$$\% \text{ potvorbe} = 100 * \frac{{}^{13}\text{C}_{\text{proteini}} - {}^{13}\text{C}_{\text{med}}}{{}^{13}\text{C}_{\text{proteini}} - (-9,7 \text{ ‰})} \quad \dots(2)$$

Negativne rezultate obravnavamo kot pristne, to je z 0 % dodanega sladkorja. Metoda je primerna za ugotavljanje potvorb medu z dodanim sladkorjem v deležih od 7 do 20 %.

#### Preverjanje ponovljivosti metode:

Ponovljivost metode smo preverili z analiziranjem petih vzorcev v 6 paralelkah. Metoda ima dobro ponovljivost, kar je ugotovila tudi Kropfova (2009), s povpre nim KV 0,99 %. Ostale vzorce smo analizirali v dveh paralelkah in rezultate podali kot aritmeti no sredino dveh meritev.

### **3.4.3 Dolo anje razmerja $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ v proteinih medu**

#### Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega in lažjega izotopa dušika v proteinih izoliranih iz medu. Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo  $\delta$  ‰,  $^{15}\text{N}$ , definiranega z ena bo (1).

#### Reagenti:

- $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (10 % vodna raztopina), (Sigma-Aldrich, Švica),
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,66 N – 1,88 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /100 mL vode), (Merck, Nem ija),
- interni, laboratorijski standard: europaN (ammonium sulphate), (Europa Scientific, Velika Britanija),
- referen ni standardi: IAEA-N-1 (ammonium sulphate), IAEA-N-2 (ammonium sulphate), (IAEA, Avstrija).

#### Aparatura in pribor:

- 50 mL plasti ne centrifugirke z zamaškom,
- centrifuga Eppendorf 5810 (možnost centrifugiranja pri obratih 1500 g), (Eppendorf, Nem ija),
- 2 mL centrifugirke,
- kositrove kapsule dimenzije 6x4 mm (SerCon, Velika Britanija),
- plasti ni nosilci za kapsule,
- pinceta za zatesnitev kositrovih kapsul,

- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce (Europa Scientific, Velika Britanija).

#### Priprava vzorcev za analizo:

Vzorce medu pripravimo enako, kot je opisano pri metodi ISCIRA v poglavju 3.4.2, v podpoglavju Priprava vzorcev za analizo - izolacija proteinov medu.

#### Izvedba analize:

- Kakovost meritev spremljamo z obasno analizo referenčnih standardov IAEA-N-1 (ammonium sulphate) in IAEA-N-2 (ammonium sulphate), ki imata naslednji vrednosti  $^{15}\text{N}$ :  $0,4 \pm 0,2 \text{ ‰}$  in  $20,3 \pm 0,2 \text{ ‰}$ . Pravilnost meritev dnevno preverjamo z analizo laboratorijskega standarda europaN. Podrobnejšo izvedbo je opisala Kropf (2009).
- Napaka meritev znaša  $0,3 \text{ ‰}$ .

#### Preverjanje ponovljivosti metode:

Ponovljivost metode smo preverili z analiziranjem petih vzorcev v 6 paralelkah. Ugotovili smo dobro ponovljivost metode, saj je povprečen  $KV$  znašal  $4,0 \text{ ‰}$ . Ostale vzorce smo analizirali v 2 paralelkah in rezultat podali kot aritmetično sredino dveh meritev.

### **3.4.4 Določanje razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v frakcijah fruktoze, glukoze, disaharidov in trisaharidov medu (Elflein in Raezke, 2008)**

#### Princip:

Metoda temelji na merjenju izotopskega razmerja med deležem težjega ( $^{13}\text{C}$ ) in lažjega ( $^{12}\text{C}$ ) izotopa ogljika v fruktozni, glukozni, disaharidni in trisaharidni frakciji raztopine medu. Izotopska razmerja podajamo z vrednostjo  $\delta$  v ‰,  $^{13}\text{C}$ , definirane z enačbo (1).

#### Reagenti:

- interni, laboratorijski standard: ureaC (urea), (Kemika, Hrvaška),
- referenčni standardi: IAEA-NBS 22 (oil), IAEA-CH-7 (polyethylen), IAEA-CH-6 (sucrose), (IAEA, Avstrija).

#### Aparatura in pribor:

- 3 mL centrifugirke (Eppendorf),
- sistem HPLC: kromatogram, stropalka, kolona,
- masni spektrometer Europa Scientific 20-20 z ANCA-SL preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce (Europa Scientific, Velika Britanija).

#### Priprava vzorcev za analizo:

Uteko inžen med smo eno uro homogenizirali v ultrazvočni kopeli. V 50 mL bučko smo odtehtali  $0,2 \pm 0,0001 \text{ g}$  homogeniziranega vzorca medu in ga raztopili v dvakrat destilirani vodi. Pripravljeno raztopino medu s konc.  $0,4 \text{ g}/100 \text{ mL}$  smo prefiltrirali z  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  filter neposredno v vialo.

#### Izvedba analize:

- Vialo z raztopino vzorca medu smo prenesli na avtomatski podajalnik sistema HPLC. V kolono smo vbrizgali 50 µL vzorca.
  - o delovni pogoji sistema HPLC: pretok: 0,800 mL/min; čas ločbe: 30 min; T vzorcev: 4 °C; T kolone: 60 °C.
- Frakcije fruktoze, glukoze, disaharidov in trisaharidov smo ročno lovili v 3 mL centrifugirke v časovnih obdobjih retencijskih časov, ki smo jih predhodno določili s pomočjo standardnih raztopin sladkorjev.
- Raztopine frakcij smo koncentrirali s sušenjem pri visokem pretoku zraka, en dan, pri temperaturi 40 °C.
- Skoncentrirane raztopine frakcij smo prenesli v ANCA-SL preparativni nastavek za tekoče vzorce. Sledil je sežig posameznih vzorcev in določitev <sup>13</sup>C v fruktozni, glukozni, disaharidni in trisaharidni frakciji medu z masnim spektrometrom Europa Scientific 20-20.

Rezultati meritev so bili zelo variabilni, kar je bila posledica tega, da smo frakcije medu, ki so se eluirale s kolone, ročno lovili. Vpeljava metode, ki sta jo opisala Elflein in Ræzke (2008) ni bila realizirana, saj se je izkazalo, da je za analizo nujno potreben med seboj povezan sistem HPLC in elementnega analizatorja z masnim spektrometrom. V nadaljevanju zato ne podajamo rezultatov naših preliminarnih analiz.

### 3.5 DOLOČENJE VSEBNOSTI AMINOKISLIN V MEDU Z METODO HPLC (Bernal in sod., 2005)

#### Princip:

Metoda temelji na določanju vsebnosti aminokislin v medu s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) na reverzno fazni koloni (RP-C18), z detekcijo v UV območju ( $\lambda = 280$  nm). Ločbo aminokislin dosežemo s predkolonsko derivatizacijo vzorca z reagentom DEMM (dietiletoksimetilenmalonat).

Metodo smo modificirali v postopku derivatizacije (razmerje med volumni vzorca in derivatizacijskega reagenta) in gradientu mobilne faze, s katerim smo skrajšali čas ločbe za 12 minut.

#### Reagenti:

- derivatizacijski reagent dietiletoksimetilenmalonat (DEMM), (Sigma Aldrich),
- boratni pufer pH = 9,2 (pripravimo nasičeno raztopino Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·12H<sub>2</sub>O – 15 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·12H<sub>2</sub>O/200 mL vode. Raztopino segrejemo, da se popolnoma raztopi, ohladimo in postavimo v hladilnik za 24 ur. Nato filtriramo skozi filtrirni papir in umerimo pH na 9,2 z 0,2 M borno kislino) (Merck),
- CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (0,025 M – 1,927 g CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/1L vode), (Merck),
- CH<sub>3</sub>CN (Sigma-Aldrich),
- NaOH (5 M – 50 g NaOH/250 mL vode), (Merck),
- HCl (0,1 M HCl – 8,5 mL konc.HCl/1L vode), (Merck),
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,2 M – 1,2367 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/200 mL vode), (Merck),
- standardi aminokislin: alanin (ALA), (Fluka); allo-izolevcin (ALO-ILE), glutaminska kislina (GLU), glutamin (GLN), izolevcin (ILE), serin (SER) in triptofan (TRP), (Sigma); arginin (ARG), asparagin (ASP), asparaginska kislina (ASP), cistein

- (CYS), glicin (GLY), histidin (HIS), levcin (LEU), lizin (LYS), metionin (MET), fenilalanin (PHE), prolin (PRO), treonin (THR), tirozin (TYR) in valin (VAL), (USP),
- dvakrat destilirana voda.

#### Aparatura in pribor:

- HPLC sistem Agilent Series 1100 (Agilent Technologies):
  - o binarna napeljava g1312A,
  - o termostatisan avtomatski vzorčni evalnik g13129A,
  - o termostat za HPLC kolono g1365B,
  - o MWD detektor g1365B,
  - o razplinjevalnik g1379A,
  - o ALST herm g1330B,
  - o programska oprema: LC ChemStation,
- kolona Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent),
- pH meter (Mettler Toledo),
- tehtnica AX205 (Mettler Toledo),
- mešalnik in stresalnik (Vortex),
- 10 mL steklene bučke,
- 10 mL steklene centrifugirke z obrusom, stekleni zamaški,
- steklene vialice,
- 0,45 µm membranski filter (Millipore).

#### Priprava vzorcev za analizo:

- V 10 mL bučko odtehtamo  $3 \pm 0,0001$  g homogeniziranega vzorca medu, dodamo 0,5 mL 5 M NaOH in dopolnimo do oznake z boratnim puškom pH = 9,2. Temeljito mešamo 1 minuto (vortex) nato prefiltriramo čez membranski filter z velikostjo por 0,45 µm. Raztopino vzorca pripravimo v dveh paralelkah.
- Slep vzorec: V 10 mL bučko odpipetiramo 0,5 mL 5 M NaOH in dopolnimo do oznake z boratnim puškom pH = 9,2. Prefiltriramo čez 0,45 µm membranski filter.

#### Priprava raztopin standardov aminokislin:

##### a) Izhodne raztopine standardov

V 20 mL bučke odtehtamo:

- o 15 mg ( $\pm 0,1$  mg) standardov naslednjih aminokislin: Asp, glu, Asn, His, gly, Thr, Arg, Ser, Tyr, Val, Met, Cys, Trp, Allo-Ile, Ile, Leu in Lys,
- o 40 mg ( $\pm 0,1$  mg) standarda aminokislin gln in Ala.

V 10 mL bučki odtehtamo:

- o 40 mg ( $\pm 0,1$  mg) standarda Pro,
- o 30 mg ( $\pm 0,1$  mg) standarda Phe.

Standarde raztopimo v 0,1 M HCl in dopolnimo z 0,1 M HCl do oznake. Za 10 minut jih postavimo v ultrazvočno kopel, da se popolnoma raztopijo. Standarde pripravimo v dveh paralelkah.

##### b) Delovne raztopine standardov

V 50 mL bučke odpipetiramo:

- o 2,00 mL izhodne raztopine standardov: Asp, glu, Asn, His, gly, Thr, Arg, Thr, Ser, Val, Met, Cys, Trp, Allo-Ile, Ile, Leu, Lys, gln in Ala,

- 4,00 mL izhodne raztopine standardov Pro in Tyr,
- 5,00 mL izhodne raztopine standardov Phe.

Odpipetirane izhodne raztopine standardov dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH = 9,2. Delovne raztopine standardov pripravimo iz obeh paralelk izhodnih standardnih raztopin.

c) Priprava delovnega standarda za derivatizacijo:

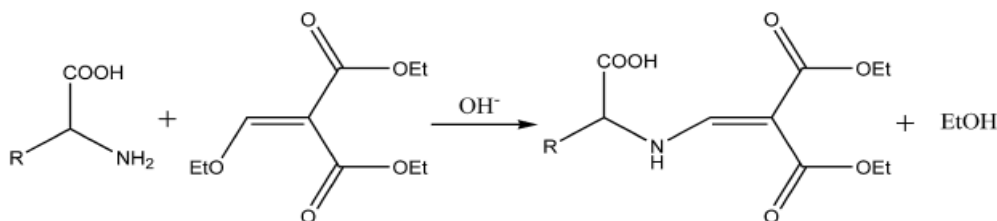
Za vsako delovno raztopino standarda v 50 mL bu ki pripravimo 10 mL bu ko.

Vanjo odpipetiramo 4,00 mL delovne raztopine standarda, dodamo 0,5 mL 5 M NaOH in dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH = 9,2. Pripravljamo iz obeh paralelk raztopin delovnih standardov.

Tako pripravljene delovne raztopine standardov aminokislin derivatiziramo po postopku za derivatizacijo vzorcev.

#### Derivatizacija vzorcev:

V 10 mL centrifugirko z obrusom odpipetiramo 1,00 mL raztopine vzorca medu (oz. slepega vzorca, delovne raztopine standarda), dodamo 10  $\mu$ L derivatizacijskega reagenta DEMM in 3,99 mL boratnega pufru pH = 9,2. Centrifugirko zapremo z zamaškom in mešamo na mešalniku 20 sekund. Zamašek na centrifugirki zatesnimo s parafilmom in centrifugirko 50 minut segrevamo v vodni kopeli na 90 °C. Derivatizirano raztopino ohladimo, prefiltriramo ez 0,45  $\mu$ m membranski filter in napolnimo v vialo. Potek reakcije med aminokislino in derivatizacijskim reagentom je prikazan na spodnji sliki.



Slika 3. Reakcija aminokislina z derivatizacijskim reagentom DEMM (Alaiz in sod., 1992)

Figure 3. Reaction of amino acid and DEMM derivatization agent (Alaiz et al., 1992)

#### Izvedba analize:

Vialo z derivatiziranim vzorcem prenesemo na avtomatski vzor evalnik HPLC sistema, ki je temperiran na 4 °C. Alikvot vzorca, to je 10  $\mu$ L, vbrizgamo na reverzno fazno kolono, na poteka lo ba pod naslednjimi pogoji:

- temperatura kolone: 45 °C,
- pretok 1 mL/min,
- mobilna faza:
  - mobilna faza A: 0,025 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>,
  - mobilna faza B: CH<sub>3</sub>CN,
- gradient: predstavljen v preglednici 9.
- detekcija: UV,  $\lambda$  = 280 nm.

**Preglednica 11. Gradient mobilne faze pri dolo anju aminokislin v medu**

**Table 11: Mobile phase gradient in analysis of amino acids in honey**

t (min)	0	8	13	15	25	40	42	47	52	54	55	56	68	68,1	75
% A	93	93	89	86	84	84	82	80	70	50	40	0	0	93	93
% B	7	7	11	14	16	16	18	20	30	50	60	100	100	7	7

Ustreznost kromatografskega sistema smo pred pri etkom analiz preverili tako, da smo 5-krat vbrizgali raztopino delovnega standarda. Določene vrednosti sistema so zadostile kriterijem za ugotavljanje ustreznosti sistema in so predstavljene v Prilogi B. Primernost, ob utljivost in natan nost kromatografske metode smo preverili z določitvijo osnovnih parametrov validacije, ki so predstavljeni v prilogi C.

Ponovljivost metode:

- Dnevna ponovljivost: vzorec medu smo pripravili v 4 paralelkah in jih dvakrat vbrizgali na kolono. Izračunali smo RSD med posameznimi injiciranjmi in paralelkami. Skladno s kriterijem za sprejemljivost določene vrednosti standardov posameznih aminokislin (n=4) 10,0 % smo potrdili natan nost metode znotraj dneva.
- Meddnevna ponovljivost: po petih dneh smo iz istega vzorca pripravili ponovno 4 paralelke in jih izmerili na drugem sistemu HPLC. Vrednosti, določene na obeh sistemih smo primerjali in izračunali RSD med 8 paralelkami. Glede na kriterij natan nosti metode (RSD 15,0 %) smo ugotovili, da je metoda dovolj natan na za določanje aminokislin v medu.

Rezultati za dnevne in meddnevne ponovljivosti za posamezno aminokislino so predstavljeni v Prilogi B.

Izračun vsebnosti aminokisline v medu:

$$\text{vsebnost aminokisline (mg/kg)} = \frac{A_{\text{vz}}}{A_{\text{st}}} * \frac{m_{\text{st}}}{m_{\text{vz}}} * \frac{V_{\text{vz}}}{V_{\text{st}}} * \frac{f_{\text{st}}}{1000} \quad \dots(3)$$

$A_{\text{vz}}$  = površina določene aminokisline v vzorcu

$A_{\text{st}}$  = površina dolo enega standarda

$m_{\text{st}}$  = natehta standarda (mg)

$m_{\text{vz}}$  = natehta vzorca (g)

$V_{\text{vz}}$  = razred itev vzorca (mL)

$V_{\text{st}}$  = razred itev standarda (mL)

$f_{\text{st}}$  = faktor standarda

1000 = pretvorba iz mg/g v mg/kg

### 3.6 DOLO ANJE IZBRANIH FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH PARAMETROV KAKOVOSTI V MEDU

#### 3.6.1 Vsebnost vode – refraktometri no dolo anje (AOAC 969.38, 1999)

Princip:

Metoda temelji na dolo anju vsebnosti vode z ro nim refraktometrom.

Aparatura:

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

Izvedba:

Metoda za refraktometri no dolo anje vsebnosti vode v uteko injenem medu je opisana v AOAC 969.38 (1999) in v Harmoniziranih metodah Mednarodne komisije za med (Bogdanov in sod., 2009).

#### 3.6.2 Elektri na prevodnost ( ) – konduktometri no dolo anje

Princip:

Merjenje elektri ne prevodnosti 20 % (w/w) vodne raztopine medu (20 % se nanaša na suho snov medu) pri 20 °C, s konduktometrom. Dolo anje elektri ne prevodnosti temelji na merjenju elektri ne upornosti, ki je recipro na vrednost elektri ne prevodnosti. Rezultat se poda v miliSiemensih na centimeter (mS/cm).

Reagenti:

- destilirana voda,
- KCl (0,1 M standardna raztopina za umerjanje celice konduktometra), (Hanna, Madžarska).

Aparatura:

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

Izvedba:

Metoda za konduktometri no dolo anje specifi ne elektri ne prevodnosti v medu je opisana v Harmoniziranih metodah Mednarodne komisije za med (Bogdanov in sod., 2009). Uporabili smo modifikacijo te metode. Namesto volumskega razmerja (masa medu/100 mL raztopine) smo pri pripravi vzorcev uporabili utežno razmerje (masa medu/100 g raztopine) zaradi manjše porabe steklovine in hitrejše priprave raztopine medu. Modifikacija se je izkazala kot dobra in je opisana v lanku Kropf in sod. (2008).

#### 3.6.3 Vrednost pH in skupne (titrabilne) kisline - titrimetri na metoda (AOAC 962.19, 1999)

Princip:

Titracija 10 % vodne raztopine medu z 0,05 M NaOH do pH 8,5, dodatek 10 mL 0,05 M NaOH in ponovna titracija z 0,05 M HCl do pH 8,3.

Reagenti:

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

Aparatura in pribor:

- pH meter MA 5736, steklena elektroda 4581 (Metrel, Slovenija),
- magnetno mešalo.

Izvedba:

Ob začetku meritve odčitamo vrednost pH. Titracijska metoda z določanjem ekvivalentne teže za določanje prostih in skupnih kislin ter laktonov medu je opisana v AOAC 962.19 (1999).

Napaka meritve znaša  $\pm 0,02$  pH.

### **3.6.4 Aktivnost diastaze – fotometrično določanje (AOAC 958.09, 2011)**

Princip:

Metoda temelji na enourni hidrolizi 1 % raztopine škroba z encimom iz 1 g medu pri temperaturi 40 °C.

Reagenti:

- NaCl (0,5 M raztopina), (Merck, Nemčija): 14,5 g NaCl smo raztopili v prekuhani destilirani vodi in dopolnili do 500 mL.
- acetatni pufer (pH 5,3): 87 g natrijevega acetata ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ), (Merck, Nemčija), smo raztopili v 400 mL destilirane vode, uravnali pH raztopine na 5,3 z dodatkom približno 10,5 mL ledocetne kisline (Merck, Nemčija) in razredili do 500 mL z destilirano vodo.
- škrob: odtehtali smo količino škroba, (Merck, Nemčija), ki ustreza masi 2,0 g brezvodnega škroba in ga pomešali z 90 mL destilirane vode v 250 mL erlenmajerjevi bučki. Suspenzijo smo takoj segreti nad gorilnikom in pustili zmerno vreti 3 min. Nato smo raztopino ohladili do sobne temperature in jo prenesli v 100 mL merilno bučko in temperirali v vodni kopli (40 °C) ter dopolnili bučko do oznake z destilirano vodo.
- I/KI – osnovna raztopina (0,07 M): pomešali smo 8,8 g joda (Merck, Nemčija) z 22 g kalijevega jodida p.a. (Merck, Nemčija) in zmes raztopili v 30 – 40 mL destilirane vode ter nato razredili do 1 L.
- I/KI – delovna raztopina (0,0007 M): v 30 – 40 mL destilirane vode smo raztopili 20 g kalijevega jodida p.a. (Merck, Nemčija), prelili v 500 mL merilno bučko, dodali 5 mL osnovne raztopine jodida (I/KI) in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

Aparatura in pribor:

- vodna kopel
- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 510 nm), (Cecil Instruments, Velika Britanija)

Izvedba:

Izvedba fotometričnega določanja aktivnosti diastaze je opisana v AOAC (2011), ki navaja tudi enačbo za izračun. Napaka meritve, izražena kot diastazno število, znaša  $\pm 0,72$  DN.



### 3.6.5 Vsebnost prolina – fotometrično določanje (po Oughu, modificirana metoda po Bogdanovu in sod., 2009)

#### Princip:

Prolin in ninhidrin tvorita rumen barvni kompleks. Po dodatku 2-propanola merimo absorbanco v raztopini vzorca in referenčni (standardni) raztopini pri valovni dolžini 510 nm. Delež prolina določimo računsko ob upoštevanju razmerij.

#### Reagenti:

- ninhidrin (3 % raztopina): 3,0 g ninhidrina (Merck, Nemčija) smo raztopili v 100 mL etilenglikolmonometil etera (Merck, Nemčija). Raztopina je obstojna 1 teden v temi.
- L(-) prolin (Merck, Nemčija): vakuumsko osušen prolin hranimo v eksikatorju,
  - a) Standardna raztopina prolina (0,8 mg/mL): 40 mg vakuumsko osušenega prolina smo razredili ali z destilirano vodo do volumna 50 mL. Raztopino smo pripravljali tedensko in jo do uporabe hranili v hladilniku.
  - b) Delovna raztopina prolina (0,032 mg/mL): 1 mL standardne raztopine prolina smo razredili ali do 25 mL z destilirano vodo. Raztopino smo pripravili vsak dan svežo.
- 2-propanol (Merck, Nemčija), razredili z destilirano vodo v razmerju 1:1 (v:v),
- mravljinčna kislina, HCOOH (Merck, Nemčija).

#### Aparatura:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 510 nm), (Cecil Instruments, Velika Britanija)

#### Izvedba:

Podroben opis izvedbe analize je podala Bertonec (2008). Napaka meritev znaša 3 %.

### 3.6.6 Vsebnost beljakovin – posredno določanje prek dušika (po Kjeldahlu) (AOAC 962.18, 1999)

#### Princip:

Kjeldahlova metoda temelji na posrednem določanju beljakovin prek dušika. Za izračun beljakovin in količine dušika uporabimo splošni empirični faktor 6,25, pri čemer privzamemo, da je ves v živilu prisoten dušik beljakovinski. Vzorec pred analizo razklopimo z mokrim sežigom pri visoki temperaturi ob prisotnosti kisline in katalizatorja. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo amoniak (NH<sub>3</sub>), ki ga lovimo v prebitno količino ino borove kisline, nastali amonijev borat nato titriramo s standardno raztopino klorovodikove kisline.

#### Reagenti:

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (koncentrirana), (Merck, Nemčija),
- katalizator Kjeltabs Cu / 3,5 (305 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,4 g CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O) (Foss, Švedska),
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (nasitena raztopina ca 3 %), (Merck, Nemčija),
- NaOH (30 % raztopina), (Merck, Nemčija),
- HCl (0,1 M), (Merck, Nemčija).

#### Aparatura in pribor:

- blok za razklop ali mokri sežig vzorca (Digestion Unit K-426, Büchi, Švica),

- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber, Büchi, Švica),
- destilacijska enota (Distillation Unit B-324, Büchi, Švica),
- titracijska enota (Titrino 702 SM, Metrohm, Švica),
- sežigne epruvete (Büchi, Švica).

Izvedba:

Podroben opis izvedbe analize je podala Bertoncej (2008).

### 3.6.7 Vsebnost saharoze – polarimetri no dolo anje (AOAC 920.184, 1999)

Princip:

Merjenje kota zasuka bistre raztopine medu pred inverzijo in po njej na polarimetru v območju 175-180 kotnih stopinj.

Reagenti:

- aluminijeva kaša (Al kaša): pripravili smo nasičeno vodno raztopino  $\text{AlCl}_3$  (Merck, Nemčija) (lahko tudi  $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ ), jo oborili s koncentriranim  $\text{NH}_3$  (25 % raztopina, Merck, Nemčija), filtrat spirali z destilirano vodo, dokler reakcija na  $\text{Cl}^-$  ali  $\text{SO}_4^{2-}$  ni bila negativna. Aluminijevo kašo smo sprali s filtrirnega papirja v steklenico z vodo, da smo dobili suspenzijo.
- $\text{HCl}$  (koncentrirana), (Merck, Nemčija),
- $\text{NaOH}$  (8 M), (Merck, Nemčija).

Aparatura:

- polarimeter (Carl Zeiss, Nemčija).

Izvedba:

Pripravili smo osnovno raztopino medu: 50 g medu v 250 mL destilirane vode.

Določanje direktnih ogljikovih hidratov – pred inverzijo:

V 100 mL merilno bučko smo odpipetirali 50 mL osnovne raztopine medu, dodali 3 mL Al kaše, dopolnili z destilirano vodo do 100 mL, premešali in filtrirali skozi filtrirni papir z oznako modri trak ter izmerili kot zasuka v območju 175–180 kotnih stopinj.

Določanje celokupnih ogljikovih hidratov – po inverziji:

V 100 mL merilno bučko smo odpipetirali 50 mL osnovne raztopine medu, dodali 25 mL destilirane vode ter 5 mL koncentrirane  $\text{HCl}$ . Za 5 min smo postavili v termostat (67–70 °C) in nato hitro ohladili pod tekočo vodo ali v vodi z ledom ter nevtralizirali z 8 M  $\text{NaOH}$  ob prisotnosti lakmus papirja. Dodali smo 3 mL Al kaše in dopolnili z destilirano vodo do 100 mL. Nato smo premešali in filtrirali skozi filtrirni papir z oznako modri trak ter polarimetrali v območju 175-180 kotnih stopinj.

Izračun:

$$\text{vsebnost saharoze (g/100 g)} = (\text{kot zasuka}_{\text{pred inverzijo}} - \text{kot zasuka}_{\text{po inverziji}}) * 5,725 \quad \dots(4)$$

### 3.6.8 Specifi na opti na rotacija (Bogdanov in sod., 2009)

#### Princip:

Specifi na opti na rotacija  $[\alpha]_D^{20}$  je kot zasuka polarizirane svetlobe pri valovni dolžini natrijeve D rde, merjen pri 20 °C v vodni raztopini medu, ki vsebuje 1 g medu/mL, pri 1 dm globine. Kotni zasuk v isti bistri vodni raztopini se meri s pomočjo polarimetra v območju 0–10 kotnih stopinj (rotacija v desno – pozitivne vrednosti) ter v območju 170–180 kotnih stopinj (rotacija v levo – negativne vrednosti).

#### Reagenti:

- raztopina Carrez I: 10,6 g kalijevega heksacianoferata (Rebane in Herodes),  $(K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O)$  (Riedel de Haën, Nemija), smo raztopili v destilirani vodi in razredili do 100 mL,
- raztopina Carrez II: 24 g cinkovega acetata,  $(Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O)$  (Merck, Nemija), smo raztopili v destilirani vodi in dodali 3 g brezvodne (100 %) očetne kisline ter razredili do 100 mL z destilirano vodo.

#### Aparatura:

- polarimeter z natrijevo svetilko in 2 dm kiveto, (Carl Zeiss, Nemija).

#### Izvedba:

Izvedba metode je opisana v Harmoniziranih metodah Mednarodne komisije za med (Bogdanov in sod., 2009).

### 3.6.9 Določanje vsebnosti elementov z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo s totalnim odbojem (TXRF)

#### Princip:

Merjenje multielementnega spektra oddane rentgenske fluorescenčne svetlobe pri vzbujanju sušine vzorca na nosilnem kvarnem steklu z molibdenovo monokromatsko svetlobo, ki pada na vzorec pod zelo majhnim kotom (1,8 mrad), pri čemer pride do popolnega odboja vpadnega snopa rentgenske svetlobe.

#### Reagenti:

- Ga (vodna raztopina s koncentracijo 0,01 g/ga/L) (CertiPUR<sup>®</sup>, gallium ICP Standard) (Merck, Nemija),
- HNO<sub>3</sub> (Merck, Nemija).

#### Aparatura:

- rentgenska cev (Seifert, Nemija) z molibdenovo anodo in energijo molibdenove K rde (17,4 keV).
- totalno refleksijski modul (Institut »Jožef Stefan«):
  - o kolimator,
  - o monokromator iz več tankih plasti ogljika in volframa,
  - o nosilec vzorca
- rentgenski spektrometer (Princeton gamma Tech Co., ZDA) temelji na visokoločljivostnem polprevodniškem Si(Li) detektorju. Elektronski sistem detektorja

sestavljajo: visokonapetostni vir, oja evalnik, analogno digitalni pretvornik ter ve kanalni analizator (MCA), (Canberra, ZDA).

#### Pribor:

- avtomatske pipete,
- nosilna kvar na stekla (  $r = 3$  cm, debelina 2 mm),
- infrarde a svetilka.

#### Delovni pogoji:

Merjenje spektra vsakega vzorca poteka 5 minut pri sobni temperaturi, pri napetosti 40 kV in elektri nem toku 30 mA na rentgenski cevi.

#### Priprava vzorcev za analizo:

- A) Vzorec: Odtehtamo 0,3 g ( $\pm 0,0001$  g) vzorca medu v 25 mL stekleno ašo in ga raztopimo v dvakrat destilirani vodi, ki jo dolijemo do oznake 10 mL. Ko se med raztopi, dodamo interni standard, 1 mL standardne raztopine galija s koncentracijo 0,01 g/L. Raztopino homogeniziramo 1 uro v ultrazvo ni kopeli. Nato odpipetiramo 10  $\mu$ L raztopine vzorca na nosilno kvar no steklo in pustimo ez no v eksikatorju, da se posuši. Do analize hranimo vzorce v eksikatorju, da ne pride do kontaminacije s prahom. Izmerimo spekter rentgenske fluorescen ne svetlobe z metodo TXRF.
- B) Slep vzorec: Izmerimo spekter istega kvara nega stekla.

#### Izvedba analize:

Sušino vzorca medu z dodanim internim standardom vstavimo v spektrometer in izmerimo fluorescen ni spekter. Meritev spektra vsakega vzorca poteka 5 minut. Podrobno izvedbo analize in izra un rezultatov je opisala Kropf (2009).

#### Ponovljivost:

Ponovljivost metode smo dolo ili na izbranem vzorcu, ki smo ga analizirali v šestih paralelkah (šest nanosov na reflektor iz ene raztopine vzorca). Z metodo TXRF smo dolo ili hkrati 13 elementov. Podobno kot že v predhodnih raziskavah (Kropf, 2009; Golob in sod., 2005) je bila ponovljivost dobra v primeru S, Cl, K, Ca, Pb in Rb, saj so bili pri teh elementih koeficienti variacije med paralelkami manjši od 15 %. Pri Mn in Br smo opazili nekoliko slabšo, a zadovoljivo ponovljivost, 24 in 22 %. Zelo slaba ponovljivost pa je bila pri Cr, Fe, Ni, Cu in Zn, ker so ti elementi prisotni v medu v nizkih koncentracijah. Zaradi tega teh elementov ne bomo obravnavali podrobneje, ampak se bomo omejili le na tistih osem elementov, ki so imeli KV pod 25 %.

Meja detekcije se dolo a posebej za vsak element v vsakem vzorcu na podlagi vsebnosti posameznih elementov in osnove vzorca. Po izkušnjah Golob in sod. (2005) so meje detekcije posameznih elementov primerljive med vzorci medu razli nih vrst in znašajo: 20,3 mg/kg (S), 8,17 mg/kg (Cl), 3,29 mg/kg (K), 2,56 mg/kg (Ca), 0,60 mg/kg (Mn), 0,50 mg/kg (Br) in 0,58 mg/kg (Rb).

### 3.7 STATISTI NA ANALIZA

Analitske vrednosti smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel 2007. Urejene podatke smo statisti no obdelali v programu IBM SPSS (IBM SPSS, 2009). Uporabili smo razli ne metode statisti ne obdelave: opisna statistika, korelacijska analiza, primerjava dveh vzorcev, primerjava treh ali ve vzorcev ter tudi kemometrijske metode.

#### 3.7.1 Opisna statisti na analiza

Opisna statistika ali univariatna analiza podatkov vsebuje izra une razli nih povpre nih mer (aritmeti na sredina, mediana), standardnega odklona, koeficienta variacije ter najmanjše in najve je vrednosti. Opravili smo jo v programu IBM SPSS (IBM SPSS, 2009).

Za prikazovanje podatkov neke številске spremenljivke pogosto uporabljamo grafi ni na in z okvirjem z ro aji (angl. *box and whiskers plot*). Okvir dolo ata kvartila  $Q_1$  in  $Q_3$ , njegovo pre ko pa  $Q_2$ . Dolžina okvira je enaka kvartilnemu razmiku. Ro aja okvira predstavljata pogojni minimum in pogojni maksimum, to je tista najmanjša oziroma najve ja vrednost, ki ni osamelec. Osamelci so vrednosti, ki bistveno odstopajo od ve ine ostalih vrednosti, to pomeni, da so izven intervala  $Q_1 - 1,5 \cdot Q$  in  $Q_3 + 1,5 \cdot Q$ . Na grafikonu jih prikažemo s krožcem. Ekstremni osamelci so vrednosti, ki so izven intervala  $Q_1 - 3 \cdot Q$  in  $Q_3 + 3 \cdot Q$ , prikažemo jih z zvezdico (Košmelj, 2007).

#### 3.7.2 Bivariatna analiza

V to analizo spadajo metode, ki testirajo medsebojni vpliv dveh spremenljivk. Ti sta lahko neodvisni, ali pa je ena odvisna, druga pa neodvisna.

##### 3.7.2.1 Relacijska analiza (Košmelj, 2007)

Spremenljivki sta med seboj lahko v razli nih relacijah. Prva relacija je odvisnost, pri emer vrednosti ene spremenljivke vplivajo na vrednost druge spremenljivke, v obratno smer pa ni vpliva. Druga relacija je povezanost oz. soodvisnost. Pod tem pojmom razumemo relacijo, ko se vrednosti obeh spremenljivk spreminjajo hkrati. Namen študija povezanosti spremenljivk je izra unati ustrezno mero, ki vrednoti mo povezanosti dveh spremenljivk. Mera povezanosti v odvisni relaciji je enostavna linearna regresija, mera pri soodvisnosti pa korelacija, kamor spadata dve meri povezanosti, Pearsonov koeficient korelacije ( $r$ ) in Spearmanov koeficient korelacije (koeficient korelacije rangov -  $r_s$ ).

##### Enostavna linearna regresija

e med spremenljivkama obstaja enostavna linearna povezava, lahko narišemo razsevni grafikon in skozi podatke potegnemo regresijsko premico, ki opisuje linearno zvezo med spremenljivkama. Regresijsko premico narišemo z uporabo metode najmanjših kvadratov. Regresijski model je lahko boljši ali slabši. Ena od najenostavnejših mer, ki vrednotijo kakovost modela, je koeficient determinacije ( $r^2$ ). To je merilo povezanosti dveh spremenljivk in izraža odstotek variabilnosti odvisne številске spremenljivke ( $y$ ), ki je pojasnjen z regresijskim modelom ene ali ve neodvisnih številskih spremenljivk ( $x$ ).

## Korelacija

Korelacijsko analizo smo izbrali, ker obravnavamo naključno kvantitativne spremenljivke. Ker nobene izmed teh spremenljivk ne izberemo sami vnaprej, ne moremo govoriti o odvisnosti ene od druge, ampak le o njihovi medsebojni povezanosti.

Koeficient korelacije po Pearsonu ( $r$ ) je merilo za stopnjo povezanosti med dvema spremenljivkama in pove, kako velika je korelacija. Uporablja se, kadar so spremenljivke normalno porazdeljene. Vrednost koeficienta korelacije je definirana na intervalu od  $-1$  do  $1$ , kjer  $-1$  pomeni popolno negativno linearno povezanost,  $0$  pomeni, da linearne povezanosti med spremenljivkami ni,  $1$  pa pomeni popolno in pozitivno linearno povezanost. Koeficient korelacije ne pove, ali je povezanost značilna ali ne. Zato značilnost korelacije ocenjujemo s  $t$ -testom pri  $m$  stopnjah prostosti. Koeficient determinacije ( $r^2$ ) je kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije ( $r$ ) in je definiran na območju od  $0$  do  $1$ , kjer vrednosti pod  $0,5$  pomenijo, da je povezava šibka, vrednosti med  $0,5$  in  $0,8$  pomenijo srednje močno povezavo, vrednosti nad  $0,8$  pa zelo močno povezavo.

Spearmanov koeficient korelacije ( $r_s$ ) meri intenzivnost povezanosti dveh spremenljivk, vendar ne temelji na predpostavki, da je ta povezanost linearna. Uporablja se za ugotavljanje monotone povezanosti dveh spremenljivk.

### 3.7.2.2 Analiza primerjav dveh ali več neodvisnih vzorcev

Parametrični testi (Košmelj in Kastelec, 2003)

Parametrični testi temeljijo na predpostavki, da se spremenljivke porazdeljujejo normalno. Kadar to ni izpolnjeno, je velika možnost napake pri interpretaciji rezultatov. Vendar pa imajo ti testi veliko možnost odkrivanja statističnih značilnosti. Pri teh testih se vedno uporabljajo aritmetične sredine kot povprečna vrednost in ne npr. mediane.

- **Studentov t-test**

Za primerjavo dveh neodvisnih vzorcev uporabimo statistični test z imenom  $t$ -test. Predpostavlja se, da sta varianci obeh vzorcev enaki. Test primerja povprečne vrednosti dveh vzorcev.

- **Analiza variance (ANOVA)**

S testom ANOVA preverjamo domnevo o enakosti povprečij treh ali več neodvisnih vzorcev. Pri tej metodi testiramo vpliv ene ali več neodvisnih spremenljivk na odvisno spremenljivko. Test spada med parametrične teste in temelji na predpostavkah, da so spremenljivke normalno porazdeljene in da so variance po vzorcih enake oz. homogene. Slednje preverjamo s preizkusi homogenosti varianc po obravnavanjih, kamor spada tudi Levenov preizkus. Pri tem preizkusu izvedemo ANOVO, kjer  $H_0$  pravi, da med variancami vzorcev ni razlik. Če  $H_0$  ne moremo zavrniti, ugotovimo, da razlike med variancami po vzorcih ne obstajajo. Tako je tudi drugi predpogoj za izhodno ANOVO izpolnjen in s statistično obravnavo lahko nadaljujemo.

Ni ena hipoteza ( $H_0$ ) pri testu ANOVA trdi, da so povprečja (aritmetične sredine) po obravnavanjih enaka, alternativna hipoteza pa, da obstaja vsaj en par, kjer povprečja po obravnavanjih nista enaki. V primeru, da  $H_0$  ne moremo zavrniti, je statistična analiza končna. Kadar  $H_0$  zavrnemo, sprejmemo alternativno hipotezo in s tem domnevo, da med povprečji ni razlike. V tem

primeru lahko statisti no obravnavo nadgradimo z uporabo *post-hoc* testov ali testov mnogoterih primerjav. ANOVA je tako preliminaren test, ki pove, ali se statisti na obravnava nadaljuje ali ne (Košmelj in Kastelec, 2003).

Duncanov test je eden izmed najbolj uporabnih *post-hoc* testov, s katerim ugotavljamo, kakšne so razlike med povprenimi vrednostmi posameznih statističnih vzorcev.

Neparametrični testi (Košmelj in Kastelec, 2002)

Neparametrični testi so enostavnejši od parametričnih in imajo manj predpostavk, vendar imajo tudi manjšo moč odkrivanja statističnih značilnosti. Ne temeljijo na predpostavki o normalni porazdelitvi spremenljivk. Kljub temu so precej uporabni, saj so hitri in preprosti.

- **Wilcoxon-Mann-Whitney test**

Test se uporablja za primerjavo dveh vzorcev in primerja njuni mediani. Ni elna hipoteza pravi, da med medianama vzorcev ni razlik. Temelji na primerjavi vsot rangov po vzorcih.

- **Kruskal-Wallisov test**

Kruskal-Wallisov test se uporablja za primerjavo treh ali več vzorcev. Ni elna hipoteza pravi, da so mediane po vzorcih enake. Test temelji na primerjavi vsot rangov po vzorcih.

### 3.7.3 Multivariatna analiza

Živila imajo kompleksno sestavo, analitika pa običajno obsega določanje več različnih komponent. Za obdelavo številnih parametrov so zelo uporabne kemometrične metode. Na količino podatkov poleg števila analiziranih komponent vpliva tudi število vzorcev. Z naraščanjem števila vzorcev lahko rezultati postanejo nepregledni. Poleg tega nas pogosto ne zanimajo le povprečne vrednosti parametrov, ampak tudi odgovori na mnogo kompleksnejša vprašanja o pristnosti vzorca, skladnosti vzorca z deklariranimi podatki kot so geografsko ali botanično poreklo. Na ta vprašanja lahko odgovorimo šele s kombinacijo analizičnih podatkov, za kar je nujna uporaba različnih kemometričnih metod. V analizi živilskih izdelkov obstajajo tri pomembnejša področja dela, pri katerih je uporaba kemometričnih metod nujna: kvantitativna določitev sestavin in lastnosti proizvoda, ugotavljanje podskupin/razredov med podatki in ugotavljanje podobnosti neznanega vzorca s skupinami drugih znanih vzorcev.

#### 3.7.3.1 Razvrščanje v skupine

Analiza grupiranja ali nenadzorovano razvrščanje v razrede se uporablja za ugotavljanje podskupin ali razredov med podatki. Proučevane enote razvrstimo v nekaj skupin med seboj podobnih enot zaradi pregledovanja ali zgoščenja podatkov. Metode razvrščanja v skupine delimo na nehierarhične metode (metoda prestavljanj, metoda voditeljev) in hierarhične metode. Slednje delimo na metode združevanja, kjer v vsakem koraku postopka združimo dve ali več skupin v novo skupino, in metode cepitev, kjer na vsakem koraku izbrano skupino razcepimo na dve ali več skupin (Adams, 1998).

Pri teh metodah je potrebno vnaprej določiti število iskanih razvrstitev. Enote se razvrščajo tako, da z izbranim optimizacijskim kriterijem izboljšujejo vnaprej podano za etno

razvrstitev. Največkrat so iteracijske, kar pomeni, da za neko zbirko razvrstitve s podanim številom skupin in nato predstavljajo enote iz ene v drugo skupino. Namen prestavljanja je, da s tem dosežemo zmanjšanje izbrane kriterijske funkcije (Adams, 1998).

Rezultate razvrstitve lahko predstavimo na dvodimenzionalnem grafu z osema  $x$  in  $y$ , kjer so posamezne skupine vzorcev prikazane s krožnico ali elipso okrog posameznih točk prikazanih vzorcev. Drug način prikaza razvrstitve v skupine je z uporabo dendrograma, kjer je potrebna tudi količina izražena medsebojna podobnost vzorcev, za kar največkrat koristimo račununanje evklidske razdalje med posameznimi pari vzorcev (Adams, 1998).

### 3.7.3.2 Faktorska analiza

Faktorska analiza je metoda za redukcijo podatkov. Z njo analiziramo povezave med spremenljivkami tako, da poskušamo najti novo množico spremenljivk, ki predstavljajo to, kar je skupnega opazovanim spremenljivkam. Išče torej tiste spremenljivke, ki so »za« merjenimi spremenljivkami in ki so »krive«, da se merjene spremenljivke obnašajo tako kot se oziroma, da so povezave takšne kot so. Išče torej latentne razsežnosti, ki pojasnjujejo strukturo nekega pojava. Cilj je, da ugotovimo, ali zveze med opazovanimi spremenljivkami lahko pojasnimo z manjšim številom posredno opazovanih spremenljivk ali faktorjev.

Metode faktorske analize so metoda glavnih osi (angl. *Principle Components Analysis – PCA*), metoda največje verjetnosti, alfa faktorska analiza in image faktorska analiza.

- **PCA**

Metoda PCA je zelo primerna za vizualizacijo kompleksnih podatkovnih matrik. Z njo skrijemo informacije na nekaj osi v večdimenzionalnem prostoru. Ponavadi že tri do pet osi predstavlja zadostno vrednost variance, da lahko predstavimo najpomembnejše podatkovne strukture (Adams, 1998). Metoda glavnih osi je transformacija koordinatnega sistema na osnovi statističnih količin in parametrov. Pri tem iz linearne kombinacije izhodnih podatkov tvorimo nove osi. Osnovno izhodišče PCA je predpostavka, da so stare koordinate med seboj odvisne, torej obstajajo med njimi določene korelacije. Namen PCA je poiskati tiste koordinate, ki so v danem merskem prostoru najbolj značilne (nosijo največji delež vseh informacij) (Adams, 1998).

### 3.7.3.3 Diskriminantna analiza

Metode diskriminantne analize ali tako imenovano nadzorovano razvrstitve v razrede (uvrstitve v razrede) se uporabljajo za ugotavljanje podobnosti neznanega vzorca s skupinami drugih poznanih vzorcev.

Diskriminantna analiza je posplošitev analize variance. Cilj te metode je čim bolj ločiti skupine med seboj. Ugotoviti želimo, kako dobro lahko z danim številom spremenljivk ločimo skupine med seboj. S pomočjo merjenih spremenljivk nato skušamo posamezno enoto čim bolj prirediti optimalni skupini. Ker imamo vnaprej določene skupine, lahko ta postopek imenujemo tudi uvrstitve v skupine. Diskriminantna analiza poišče linearno kombinacijo spremenljivk, ki bo najbolj ločila skupine med seboj, pri čemer bo napaka



pri uvrstitvi najmanjša. To stori tako, da dolo i novo smer z linearno kombinacijo merjenih spremenljivk, pri tem morajo biti razlike med povprečji največje, ob hkratnem čim manjšem prekrivanju med skupinami. To analizo lahko izvedemo za dve ali več skupin podatkov (Adams, 1998).

Med diskriminantne analize spadajo umetne nevronske mreže (angl. *Artificial Neural Networks – ANN*) ter linearna in kvadratna diskriminantna analiza (angl. *Linear Discriminant Analysis – LDA*, angl. *Quadratic Discriminant Analysis – QDA*).

- **LDA**

Linearna diskriminantna analiza se uporablja za ločevanje med dvema ali več skupinami podatkov. Glavni princip delovanja je najti tiste smeri v več variatnem prostoru, ki najbolj ločujejo posamezne skupine vzorcev. Ko določimo prvo novo smer, poiščemo naslednjo takšno smer z enakimi zahtevami oziroma lastnostmi, toda z omejitvijo, da informacije, vsebovane v obeh smereh, ne korelirajo. Postopek iskanja novih smeri se zaključuje, ko poiščemo zadostno število novih smeri, ki zadovoljivo opišejo sistem. Kot diskriminantna funkcija se lahko uporabi katerakoli matematična funkcija (Adams, 1998).

## 4 REZULTATI

Z različnimi fizikalno-kemijskimi analizami smo analizirali: 230 vzorcev medu letnikov 2008, 2009 in 2010, ki smo jih pridobili neposredno od čebelarjev; 70 vzorcev, ki smo jih v teh letih vzorili v trgovinah po Sloveniji; 79 vzorcev, ki smo jim namerno vmešali sladkorne sirupe, in 6 različnih sladkornih sirupov. Zaradi velikega števila vzorcev in analiziranih parametrov, nekatere analize niso bile opravljene na vseh vzorcih. Število analiziranih vzorcev je zato vedno podano v tabeli skupaj z rezultati, ki smo jih združili v smiselne sklope. Kljub temu, da s fizikalno-kemijskimi parametri, ki jih opredeljuje Pravilnik o medu (2011), potvorbe medu največkrat ne moremo detektirati oziroma potrditi, predstavljamo ta sklop rezultatov kot prvi, saj predstavlja izhodišče za vse nadaljnje analize na področju odkrivanja potvorbe medu.

### 4.1 REZULTATI OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV

Pravilnik o medu (2011) predpisuje največje je oziroma najmanjše dovoljene vrednosti za naslednje fizikalno-kemijske parametre, s katerimi vrednotimo kakovost medu: vsebnost vode, vsote vsebnosti fruktoze in glukoze, saharoze, prostih kislin, hidroksimetilfurfurala, aktivnosti diastaze kot diastazno število in električna prevodnost. V rutinski analizi kakovosti medu običajno poleg prostih kislin določimo tudi vsebnost laktonov in izražamo vsebnost skupnih kislin kot vsoto omenjenih dveh parametrov kislosti. Ob pričetku analize se odčitava še pH vrednost raztopine medu.

Vsebnosti v vodi netopnih snovi, s katero kvantificiramo količino nečistoč v medu, nismo določili. Čistost medu smo ovrednotili s senzorno analizo, pri čemer nobeden od vzorcev ni odstopal od določenih kriterijev.

Vrednosti, ki so predstavljene v preglednicah 12 in 13, predstavljajo povprečne meritve vsakega parametra v vzorcih posamezne vrste medu treh letnikov. Letna povprečna vrednosti analiziranih parametrov v posamezni vrsti medu so podana v preglednicah v Prilogi D.

#### 4.1.1 Rezultati analiz osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov v pristnem medu

Vrednosti zakonsko predpisanih parametrov smo določili v 29 vzorcih akacijevga, 41 cvetličnega, 23 lipovega, 31 kostanjevega, 39 gozdnega, 9 hojevega, 7 smrekovega, 28 oljne ogrščice, 17 rešljikovega, 3 ajdovega, 2 vzorcih divje češnje in v 1 vzorcu škrdatovega medu. Vse analize smo izvedli v dveh ali več vzporednih določitvah. V preglednici 10 so zbrane povprečne vrednosti analiziranih parametrov z opisnimi statistikami.

Izmerjene vrednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov niso odstopale od najvišjih oziroma najnižjih, kot jih predpisuje Pravilnik o medu (2011). Najmanjšo povprečno vsebnost vode smo določili v vzorcih gozdnega medu (14,6 g/100 g), največjo pa v vzorcih medu oljne ogrščice (16,0 g/100 g). Razlike v vsebnosti vode med vzorci so odstopale od  $\pm 0,8$  do 1,7 g/100 g. Največje razlike v vsebnosti vode smo ugotovili pri vzorcih ajdovega medu, kjer je *KV* znašal 11,3 %. Absolutno največjo vsebnost vode, 19,0 g/100 g, je vseboval vzorec

lipovega medu L21 iz leta 2010, ki tako v tem kriteriju ne bi ve ustrežal pogoju za med višje kakovosti (najve 18,6 % vode).

**Preglednica 12. Povpre ne vrednosti in opisne statistike vsebnosti vode, elektri ne prevodnosti, vsebnosti F + G in saharoze ter aktivnost diastaze v razli nih vrstah pristnega medu**

**Table 12. Means and descriptive statistics for water, F + G and sucrose content, electrical conductivity, and diastase activity determined in different types of authentic honey**

Vrsta medu	statisti ni parameter	Fizikalno-kemijski parameter				
		voda (g/100 g)	$\chi$ (mS/cm)	F + G (g/100 g)	saharosa (g/100 g)	diastaza (DN)
akacijev (n = 29)	$\bar{x} \pm SD$	15,0 <sup>a</sup> ± 0,9	0,19 ± 0,05	68,3 ± 1,4	1,78 ± 2,20	11,0 ± 2,9
	$x_{min}-x_{max}$	13,7–16,5	0,12–0,29	65,6–69,5	0,36–6,12	5,9–17,9
	KV (%)	5,87	27,0	2,05	123	26,5
cvetli ni (n = 41)	$\bar{x} \pm SD$	15,2 <sup>a,b</sup> ± 1,3	0,62 ± 0,14	66,1 ± 2,1	1,86 ± 1,37	16,5 ± 3,6
	$x_{min}-x_{max}$	12,8–18,2	0,30–0,86	63,4–68,5	0,89–4,19	6,4–24,3
	KV (%)	8,41	22,8	3,22	73,6	21,9
lipov (n = 23)	$\bar{x} \pm SD$	15,0 <sup>a,b</sup> ± 1,2	0,79 ± 0,13	68,1 ± 1,9	0,39 ± 0,07	14,9 ± 3,3
	$x_{min}-x_{max}$	13,7–19,0	0,56–1,02	65,6–70,3	0,28–0,43	9,9–21,2
	KV (%)	7,85	16,3	2,85	18,5	21,9
kostanjev (n = 31)	$\bar{x} \pm SD$	14,9 <sup>a</sup> ± 1,0	1,60 ± 0,32	63,9 ± 0,8	0,48 ± 0,36	19,7 ± 3,0
	$x_{min}-x_{max}$	13,3–16,9	0,81–2,14	62,9–64,8	1,10	15,2–27,4
	KV (%)	6,63	20,3	1,27	75,4	15,3
gozdni (n = 39)	$\bar{x} \pm SD$	14,6 <sup>a</sup> ± 1,1	1,17 ± 0,29	62,5 ± 2,6	1,42 ± 0,10	18,8 ± 3,4
	$x_{min}-x_{max}$	12,9–18,0	0,65–1,75	60,6–64,3	1,35–1,49	12,5–26,6
	KV (%)	7,25	25,0	4,23	7,0	18,1
hojev (n = 9)	$\bar{x} \pm SD$	15,3 <sup>a,b</sup> ± 0,9	1,29 ± 0,18	58,6 ± 2,2	1,75 ± 1,63	19,5 ± 6,9
	$x_{min}-x_{max}$	13,6–16,2	1,06–1,65	56,6–60,8	0,33–3,33	13,4–34,1
	KV (%)	5,65	13,8	3,78	93,4	35,1
smrekov (n = 7)	$\bar{x} \pm SD$	15,1 <sup>a,b</sup> ± 1,0	1,24 ± 0,21	63,7 ± 0,3	1,28 ± 0,18	20,1 ± 6,1
	$x_{min}-x_{max}$	13,4–16,2	1,00–1,56	63,5–64,0	1,15–1,40	9,4–24,2
	KV (%)	6,76	16,6	0,49	13,9	30,5
m. divje ešnje (n = 2)	$\bar{x} \pm SD$	15,3 ± 1,5	0,64 ± 0,25	66,3 ± 1,4	0,16 ± 0,06	–
	$x_{min}-x_{max}$	14,2–16,4	0,46–0,82	65,3–67,3	0,11–0,20	–
	KV (%)	9,95	39,5	2,14	41,1	–
m. oljne ogrš ice (n = 28)	$\bar{x} \pm SD$	16,0 <sup>b</sup> ± 1,2	0,40 ± 0,07	69,9 ± 0,2	0,52 ± 0,40	–
	$x_{min}-x_{max}$	14,2–19,4	0,22–0,56	69,7–70,0	0,23–0,80	–
	KV (%)	7,30	17,6	0,21	78,3	–
škržatov (n = 1)	$\bar{x} \pm SD$	13,1	1,74	–	–	–
	$x_{min}-x_{max}$	–	–	–	–	–
	KV (%)	–	–	–	–	–
rešeljikov (n = 17)	$\bar{x} \pm SD$	15,7 <sup>a,b</sup> ± 0,8	0,79 ± 0,21	65,7 ± 1,0	0,88 ± 0,54	–
	$x_{min}-x_{max}$	14,6–17,2	0,48–1,15	64,4–67,5	0,13–2,21	–
	KV (%)	5,12	26,7	1,48	61,7	–
ajdov (n = 3)	$\bar{x} \pm SD$	15,3 <sup>a,b</sup> ± 1,7	0,76 ± 0,21	66,7 ± 1,0	4,15 ± 0,23	–
	$x_{min}-x_{max}$	13,8–17,2	0,63–1,00	65,4–67,4	3,30–5,01	–
	KV (%)	11,3	27,0	2,01	8,05	–
Kruskal-Wallisov test (p)*		0,000	0,000	0,000	0,040	0,000

<sup>a,b</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo (p < 0,05).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena p < 0,05

Elektri na prevodnost medu je odvisna od njegovega botaničnega porekla, kar je razvidno tudi iz povprečnih vrednosti tega parametra pri posameznih vrstah medu. Poleg tega tudi velja, da imajo vrste medu iz nektarja nižjo električno prevodnost kot vrste medu iz mane. Meja med obema tipoma medu je vrednost 0,8 mS/cm, vendar pa so nekatere vrste pri tem pravilu izvzete. Povprečno najnižjo prevodnost, 0,19 mS/cm, smo določili v akacijevem medu, največjo pa v kostanjevem medu, 1,60 mS/cm. Povprečna električna prevodnost vzorcev cvetličnega medu je bila nižja od največje dovoljene, vrednost 0,8 mS/cm pa je bila presežena v vzorcih C05, C28 in C38. Variabilnost med izmerjenimi vrednostmi vzorcev iste vrste medu je bila razmeroma velika, *KV* je znašal od 13,8 % pri hojevem medu do 27,0 % pri akacijevem medu. Električna prevodnost je namreč tesno povezana z botaničnim izvorom medu oziroma s količino prevladujočih vrst nektarja ali mane, ter z vrsto ostalih nektarjev ali mane v medu.

Za skupno vsebnost fruktoze in glukoze v medu Pravidnik o medu (2011) določa, da jo je v medu iz nektarja vsaj 60 g/100 g, v medu iz mane pa najmanj 45 g/100 g. Pogoju so zadostili vsi analizirani vzorci medu, ki smo jih pridobili pri slovenskih čebelarjih, saj so se povprečne vrednosti gibale med 58,6 g/100 g v hojevem medu in 69,9 g/100 g v medu oljne ogrščice. Koeficienti variabilnosti med vsebnostmi Fru+Glu v vzorcih iste vrste medu so bili manjši od 5 %. Vzorec škrdatovega medu ni bil vključen v analizo.

Vsebnost saharoze v medu je omejena na 5 g/100 g medu, razen pri nekaterih vrstah, v katerih so dovoljene nekoliko večje količine. Zahtevi Pravidnika (2011) so ustrezali vsi vzorci, saj akacijev med lahko vsebuje do 10 g saharoze v 100 g medu. Povprečna količina saharoze je bila najmanjša v medu divje češnje (0,16 g/100 g), največja pa v ajdovem medu (4,15 g/100 g). Koeficienti variabilnosti so bili pri tem parametru veliki, tudi do 123 %, saj je vsebnost saharoze odvisna od različnih faktorjev, med drugim od vrste nektarja, zrelosti medu, aktivnosti encimov.

Aktivnost encima diastaza, ki jo izražamo kot diastazno število (DN), mora v pristnem, ne pregretem medu znašati najmanj 8, v medu z naravno nizko encimsko aktivnostjo, kot je akacijev med, pa najmanj 3. Ker smo analizirali dokaj sveže vzorce medu (stare 3–6 mesecev), je bila visoka tudi njihova diastazna aktivnost. Največjo povprečno DN smo določili v slovenskem smrekovem medu (20,1), pri akacijevem pa v akacijevem medu (10,95). Le v enem vzorcu cvetličnega medu, C30, smo določili nižjo diastazno aktivnost (DN = 6,38) od zahtevane s Pravidnikom o medu. Največjo aktivnost diastaze (DN = 34,1) smo ugotovili v vzorcu hojevega medu H01. Koeficienti variabilnosti DN so bili visoki, znašali so od 15,2 % med vzorci kostanjevega medu do 35,1 % med vzorci medu hoje. V analizo niso bili vključeni vzorci medu škrdata, divje češnje, oljne ogrščice, rešeljike in ajde.

Vrste medu so se v obravnavanih parametrih razlikovale tudi statistično značilno. S Kruskal-Wallisovim testom rangov smo ugotovili značilne razlike ( $p < 0,05$ ) glede na vrsto medu med medianami vseh petih fizikalno-kemijskih parametrov. Z ANOVO smo še dodatno potrdili, da se vzorci akacijevga, kostanjevega in gozdnega medu v vsebnosti vode statistično značilno ( $p < 0,05$ ) razlikujejo od medu oljne ogrščice.

Nadaljevanje analiziranih vrednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov je prikazano v preglednici 13. Svež, naraven med lahko vsebuje največ 50 mekv/kg prostih kislin (Pravidnik o medu, 2011). V vzorcih medu slovenskih čebelarjev smo jih določili povprečno med 10,3 (akacijev med) in 37,7 mekv/kg (ajdov med). Vsebnost kislin v vzorcih iste vrste je precej variirala, kar odražajo tudi visoki *KV*, ki so se gibali od 17,6 %

pri smrekovem medu do 57,3 % pri lipovem medu. Koli ina laktonov v vzorcih medu je bila manjša od vsebnosti prostih kislin. Najmanj laktonov smo ugotovili v smrekovem medu (povpre no 2,74 mekv/kg), najve pa v medu divje ešnje (povpre no 13,7 mekv/kg).

**Preglednica 13. Povpre ne vrednosti in opisne statistike vsebnosti prostih kislin, laktonov in skupnih kislin, vrednosti pH in vsebnosti HMF v razli nih vrstah pristnega medu**

**Table 13. Means and descriptive statistics for free acidity, content of lactones and total acids, pH value and content of HMF determined in different types of authentic honey**

Vrsta medu	statisti ni parameter	Fizikalno-kemijski parameter				
		proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH	HMF (mg/kg)
akacijev (n = 29)	$\bar{x} \pm SD$	10,3 <sup>a</sup> ± 3,4	5,35 <sup>c</sup> ± 1,78	15,6 <sup>a</sup> ± 4,4	4,15 ± 0,20	3,36 ± 1,67
	$x_{min}-x_{max}$	6,5–22,3	0,39–9,29	9,2–29,0	3,62–4,46	2,02–5,18
	KV (%)	33,0	33,3	28,0	4,72	49,6
cvetli ni (n = 41)	$\bar{x} \pm SD$	18,6 <sup>b,c</sup> ± 7,1	3,93 <sup>a,b,c</sup> ± 2,13	22,5 <sup>a,b,c</sup> ± 7,0	4,37 ± 0,36	9,85 ± 6,04
	$x_{min}-x_{max}$	8,7–42,7	0,08–9,01	11,9–43,7	3,88–5,16	2,81–20,9
	KV (%)	38,2	54,2	31,0	8,15	61,3
lipov (n = 23)	$\bar{x} \pm SD$	15,0 <sup>b</sup> ± 8,6	3,61 <sup>a,b,c</sup> ± 1,80	18,6 <sup>a</sup> ± 8,7	4,93 ± 0,48	1,60 ± 0,65
	$x_{min}-x_{max}$	6,5–38,4	0,67–7,65	7,2–45,0	4,11–6,02	0,86–2,11
	KV (%)	57,3	49,9	47,0	9,71	41,0
kostanjev (n = 31)	$\bar{x} \pm SD$	15,5 <sup>a,b</sup> ± 6,9	3,42 <sup>a,b,c</sup> ± 1,94	18,9 <sup>a</sup> ± 8,1	5,14 ± 0,60	1,71 ± 0,64
	$x_{min}-x_{max}$	6,1–29,7	0,00–7,79	8,5–37,4	4,35–6,42	0,67–2,40
	KV (%)	44,5	56,6	42,8	11,6	37,2
gozdni (n = 39)	$\bar{x} \pm SD$	24,8 <sup>c,d</sup> ± 4,5	3,23 <sup>a,b</sup> ± 1,50	28,0 <sup>b,c</sup> ± 5,0	4,69 ± 0,35	5,39 ± 7,32
	$x_{min}-x_{max}$	18,1–34,3	1,50–7,69	20,2–38,7	4,08–5,37	0,21–10,6
	KV (%)	18,3	46,3	18,0	7,48	135
hojev (n = 9)	$\bar{x} \pm SD$	20,3 <sup>c,d</sup> ± 4,2	3,02 <sup>a</sup> ± 1,29	23,3 <sup>a,b</sup> ± 4,9	5,14 ± 0,20	1,63 ± 0,27
	$x_{min}-x_{max}$	13,8–27,5	0,83–5,05	16,3–31,5	4,85–5,43	1,44–1,82
	KV (%)	20,7	42,8	21,2	3,82	16,5
smrekov (n = 7)	$\bar{x} \pm SD$	26,7 <sup>d</sup> ± 4,7	2,74 <sup>a</sup> ± 3,77	29,5 <sup>c</sup> ± 5,0	4,74 ± 0,42	0,48 ± 0,21
	$x_{min}-x_{max}$	19,5–34,4	0,00–10,66	21,9–37,2	4,12–5,22	0,38–0,71
	KV (%)	17,6	137,4	17,1	8,91	18,3
m. divje ešnje (n = 2)	$\bar{x} \pm SD$	31,4 ± 11,7	13,7 ± 0,51	45,1 ± 12,2	4,41 ± 0,18	–
	$x_{min}-x_{max}$	23,1–39,6	13,35–14,07	36,5–53,7	4,28–4,53	–
	KV (%)	37,2	3,7	27,0	4,01	–
m. oljne ogrš ice (n = 28)	$\bar{x} \pm SD$	21,6 <sup>b,c,d</sup> ± 5,5	5,13 <sup>b,c</sup> ± 1,68	26,8 <sup>b,c</sup> ± 5,7	4,12 ± 0,16	–
	$x_{min}-x_{max}$	14,3–28,7	2,17–6,75	20,2–34,9	3,72–4,34	–
	KV (%)	25,3	32,8	21,4	4,00	–
škržatov (n = 1)	$\bar{x} \pm SD$	34,1	0,03	34,2	5,26	–
	$x_{min}-x_{max}$	–	–	–	–	–
	KV (%)	–	–	–	–	–
rešeljikov (n = 17)	$\bar{x} \pm SD$	24,4 <sup>d</sup> ± 7,3	4,67 <sup>a,b,c</sup> ± 1,39	29,1 <sup>c</sup> ± 7,9	4,50 ± 0,18	–
	$x_{min}-x_{max}$	14,5–47,8	2,53–6,89	17,0–53,7	4,20–4,90	–
	KV (%)	29,7	29,7	27,1	4,00	–
ajdov (n = 3)	$\bar{x} \pm SD$	37,7 <sup>c</sup> ± 9,3	11,8 <sup>d</sup> ± 1,90	49,5 <sup>d</sup> ± 7,4	4,02 ± 0,40	–
	$x_{min}-x_{max}$	31,1–44,3	10,4–13,1	44,2–54,7	3,74–4,30	–
	KV (%)	24,7	16,1	15,0	9,85	–
Kruskal-Wallisov test (p)*		0,000	0,000	0,000	0,000	0,027

a,b,c,d,e – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo (p < 0,05).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena p < 0,05

Na koli ino skupnih kislin v vzorcih medu je vplivala predvsem vsebnost prostih kislin. Glede na vsebnost skupnih kislin bi vrste medu lahko razdelili v tri skupine. V prvi skupini so vzorci akacijevega, lipovega in kostanjevega medu, v katerih je bilo povprečno manj kot 20 mekv/kg prostih kislin. V drugi skupini so vzorci cvetli nega, gozdnega, hojevega, smrekovega, rešeljikovega medu in medu oljne ogršice, v katerih smo določili povprečno več kot 20 in manj kot 30 mekv/kg skupnih kislin. V tretji skupini so vzorci medu s povprečno vsebnostjo skupnih kislin večjo od 30 mekv/kg; to so med škržata, divje ešnje in ajde.

Ob prijetju določimo vsebnosti kislin izmerimo tudi vrednost pH 20 % raztopine medu. Za med je značilen nizek pH, vrste medu iz nektarja imajo običajno nižje vrednosti kot med iz mane. V naših vzorcih smo izmerili vrednosti pH povprečno med 4,02 v ajdovem medu in 5,14 v hojevem in kostanjevem medu. Vrednosti pH se med vzorci iste vrste niso močno razlikovale, kar je razvidno tudi iz koeficientov variabilnosti, ki segajo od 4,0 do 11,6 %.

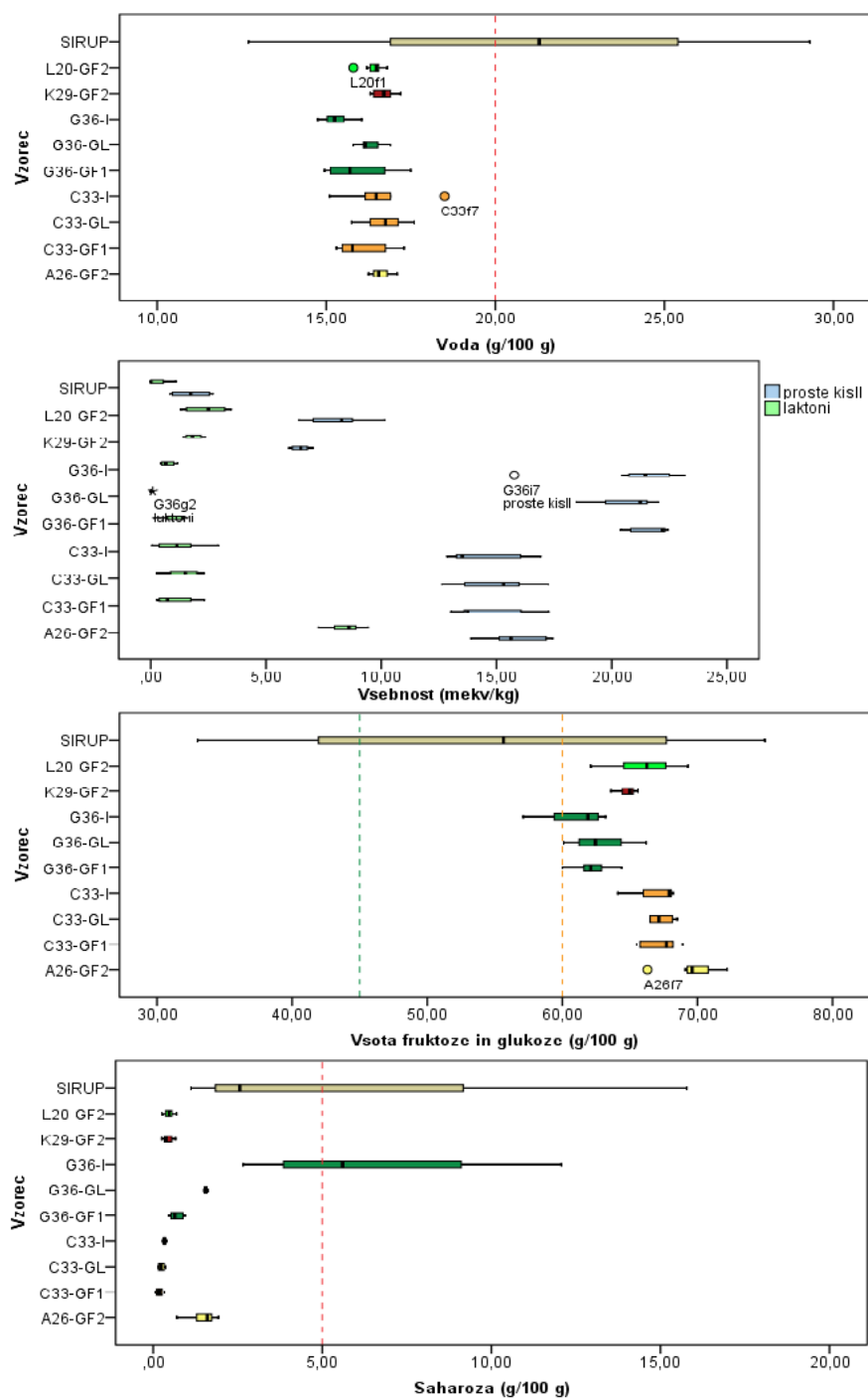
Vsebnost hidroksimetilfurfurala je še eden od osnovnih parametrov, ki kažejo na kakovost medu. Vsebnost je odvisna predvsem od pogojev (temperature) pri pridobivanju, predelavi in skladiščenju medu ter od njegove starosti. Pravilnik o medu (2011) dovoljuje največ 40 mg/kg HMF v medu, ki izvira s področij z zmernim podnebjem. Za med višje kakovosti je največja dovoljena vsebnost HMF še manjša, običajno do 15 mg/kg (Združenje Koevski gozdni med, 2009; ZS, 2008). V vzorcih medu slovenskih čebelarjev smo določili povprečno od 0,48 mg/kg HMF v smrekovem medu do 9,85 mg/kg v cvetli nem medu. Pogoju o vsebnosti HMF v medu višje kakovosti ne bi ustrezal le vzorec C39 (20,9 mg/kg). V analizo niso bili vključeni vzorci medu divje ešnje, oljne ogršice, škržata, rešeljike in ajde.

Z neparametričnim testom Kruskal-Wallis smo ugotovili, da se akacijev, cvetli ni, lipov, kostanjev, gozdni, hojev, smrekov, rešeljikov in ajdov med ter med oljne ogršice statistično značilno ( $p < 0,05$ ) razlikujejo v vseh treh parametrih kislosti, vrednosti pH in vsebnosti HMF. Z ANOVO smo potrdili še, da se ajdov med razlikuje od ostalih vrst v vsebnosti prostih kislin, laktonov in skupnih kislin. Akacijev med je vseboval značilno manj prostih kislin kot ostale vrste medu, razen lipovega in kostanjevega medu. V vsebnosti laktonov sta se hojev in smrekov med statistično značilno razlikovala od medu akacije, oljne ogršice in ajde. Akacijev, lipov in kostanjev med so se značilno ( $p < 0,05$ ) razlikovali od medu ajde, rešeljike, smreke, oljne ogršice in od gozdnega medu v vsebnosti skupnih kislin.

#### **4.1.2 Rezultati analiz osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov v namerno potvorjenih vzorcih**

Vzorci akacijevega medu A26, cvetli nega medu C33, lipovega medu L20 oziroma L23, kostanjevega medu K29 in gozdnega medu G36 so bili izbrani kot reprezentativni vzorci svoje vrste, v katere smo vmešali sladkorne sirupe. Osnovni fizikalno-kemijski parametri, enaki kot pri pristnih vzorcih, so bili določeni v dveh ponovitvah. Na enak način smo analizirali tudi štiri uporabljene sirupe: fruktozno glukoznega (GF1 in GF2), glukoznega (GL) in invertnega (IN). Zaradi obsežnosti so povprečne vrednosti analiziranih parametrov posameznih vzorcev zbrane v prilogi E, v tem delu pa predstavljamo rezultate proučevanja zveze med količino dodanega sirupa in spremembo vrednosti merjenega parametra.

Na sliki 4 so prikazani okviri z roaji za izbrane osnovne fizikalno-kemijske parametre, določene v vzorcih z dodanim sirupom in samih sirupih, za katere Pravilnik o medu (2011) določa zgornjo oz. spodnjo mejo: vsebnost vode, prostih kislin in laktonov, skupno vsebnost fruktoze in glukoze ter vsebnost saharoze.



Slika 4. Vsebnosti vode, prostih kislin in laktonov, fruktoze in glukoze ter saharoze v sirupih in izbranih vrstah medu z različno količino dodanega sirupa

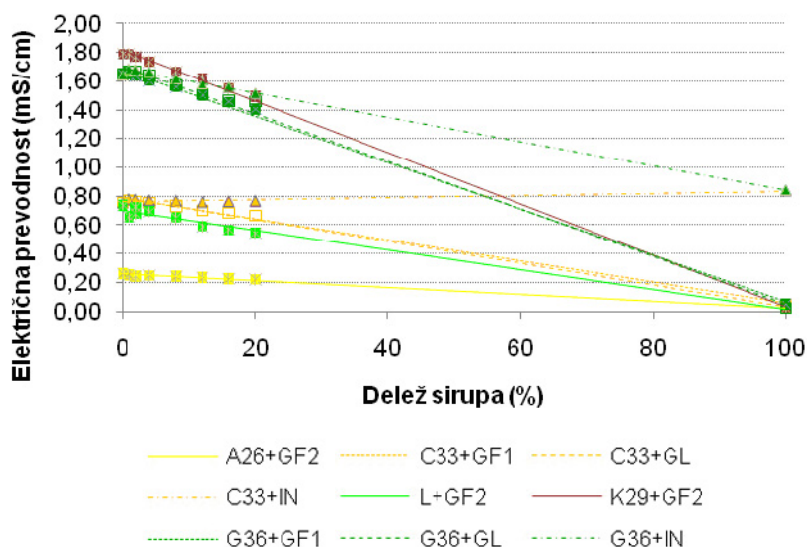
Figure 4. Box plot of value ranges for the content of water, free acidity, lactones, fructose and glucose, and sucrose in sugar syrups and selected honey samples with added different amounts of syrup

Vsebnost vode v vseh vzorcih medu z dodanim sirupom je bila manjša od 20 g/100 g. To mejo so presegli le sirupi GF1, GF2 in GL. Tudi vsebnost prostih kislin v namerno potvorjenih vzorcih ni bila prekora ena. Sirupi so vsebovali zelo malo prostih kislin, v GF1, GL in IN poleg tega nismo ugotovili prisotnosti laktonov.

Vsi namerno potvorjeni vzorci so ustrezali zahtevi Pravilnika glede vsote fruktoze in glukoze. Manjšo količino teh dveh sladkorjev, to je 33,0 g/100 g, smo določili edino v glukoznem sirupu GL. Podobno smo ugotovili tudi za vsebnost saharoze v potvorjenih vzorcih gozdnega, lipovega, kostanjevega in akacijevega medu. Slednji so je vsebovali še največ, vendar še vedno manj kot 5 g/100 g. Izjema so bili vzorci gozdnega medu z dodanim invertnim sirupom, ki je vseboval veliko saharoze. V teh vzorcih je vsebnost saharoze znašala od 2,66 do 12,1 g/100 g, v samem sirupu IN pa 15,8 g/100 g.

Zvezo med deležem dodanega sirupa in vrednostjo fizikalno-kemijskega parametra predstavljamo z razsevnim grafikonom. Zveza je linearna in odvisna. Izračunali smo ena bo regresije in determinacijski koeficient ( $r^2$ ). Ker se električna prevodnost različnih vrst medu značilno razlikuje, smo vpliv deleža posameznega sirupa proučevali ločeno, za vsako vrsto medu posebej. Rezultati so predstavljeni v sliki 5 in preglednici 14. Vrednosti ostalih osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov se med vrstami medu ravno tako razlikujejo, vendar ne izraziteje, zato smo vrednosti različnih vrst medu, potvorjenih z istim sirupom, obravnavali skupaj in podali skupno ena bo regresije. Rezultati so predstavljeni v sliki 6 in preglednici 15.

Slika 5 prikazuje regresijske premice zveze med električno prevodnostjo petih vrst medu in deleži dodanih sirupov štirih vrst. Električna prevodnost fruktozno-glukoznega sirupa GF1 in GF2 ter glukoznega sirupa je bila nizka (0,051; 0,024 in 0,026 mS/cm), zato se s povečanjem količine dodanega sirupa zmanjšujejo vrednosti EP v medu.



Slika 5. Vpliv deleža in vrste sirupa na električno prevodnost vzorcev akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetličnega in gozdnega medu

Figure 5. Effect of syrup amount and type on electrical conductivity of acacia, linden, chestnut, multifloral and forest honey samples



Invertni sirup je imel elektri no prevodnost 0,840 mS/cm. V primeru cvetli nega medu C33 je bila zveza med EP in koli ino dodanega sirupa pozitivna, pri gozdnem medu pa negativna. Negativna zveza med elektri no prevodnostjo medu in koli ino dodanega sirupa ter vrsto sirupa (razen v primeru cvetli nega medu z dodanim invertnim sirupom) je razvidna tudi iz ena be premice, saj imajo smernostni koeficienti premic negativni predznak. Iz preglednice 14 je razvidno tudi, da so ugotovljene zveze zelo mo ne, z determinacijskim koeficientom med 0,841 in 0,999. Tako mo ne zveze so razumljive, saj gre v primeru vsake vrste medu za le en vzorec.

**Preglednica 14. Ena ba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in elektri no prevodnostjo akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetli nega in gozdnega medu**

**Table 14. Linear regression equation and determination coefficient for relation between added syrup type and amount and electrical conductivity of acacia, linden, chestnut, multifloral and forest honey**

Vrsta sirupa	Vzorec medu	Ena ba linearne regresije	$r^2$
GF1	C33	$y = -0,0073x + 0,7849$	0,995
	G36	$y = -0,0162x + 1,6822$	0,997
GF2	A26	$y = -0,0023x + 0,2599$	0,994
	L20 in L23	$y = -0,0069x + 0,7041$	0,989
	K29	$y = -0,0178x + 1,816$	0,999
GL	C33	$y = -0,0075x + 0,7861$	0,997
	G36	$y = -0,0166x + 1,7059$	0,995
IN	C33	$y = 0,0007x + 0,7636$	0,841
	G36	$y = -0,0085x + 1,6873$	0,996

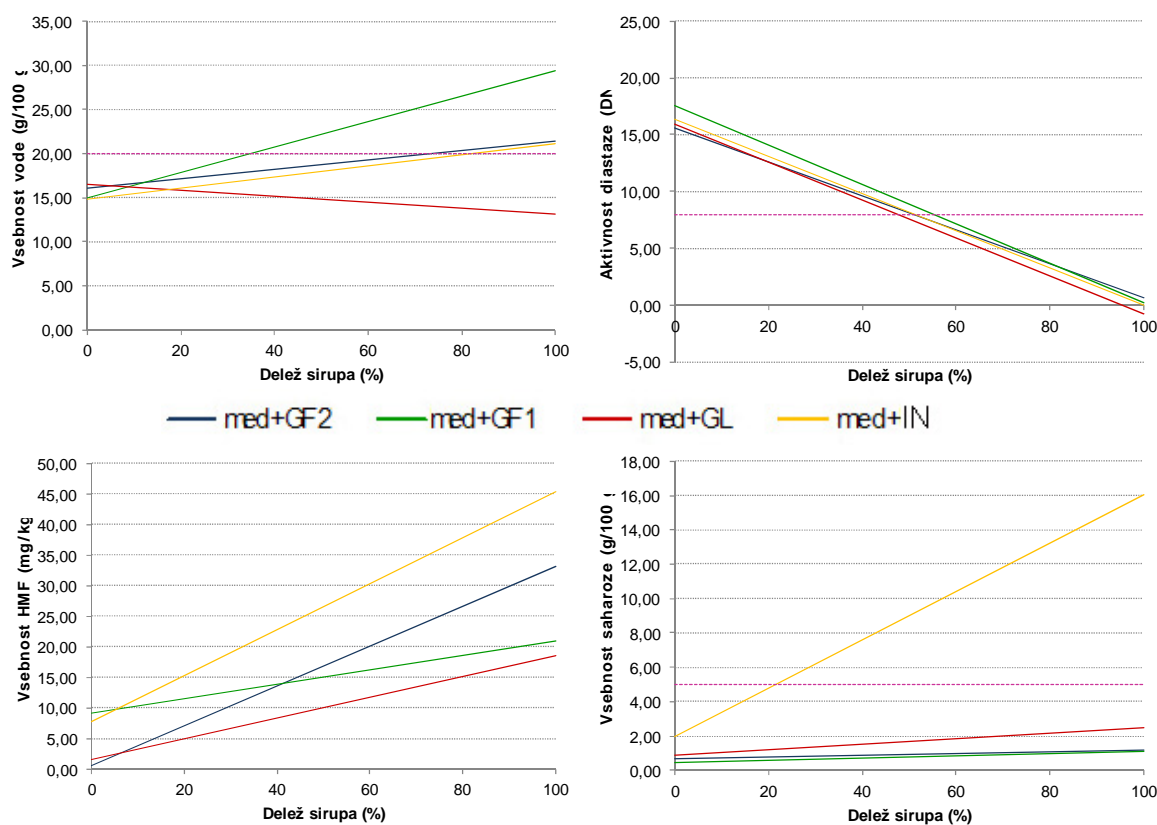
Legenda: x – vrednost fizikalno-kemijskega parametra; y – koli ina dodanega sirupa (v %);  $r^2$  – koeficient determinacije regresijske ena be

Vpliv dodajanja štirih sirupov, GF1, GF2, GL in IN, na vsebnost vode, HMF in saharoze ter na aktivnost encima diastaze v vzorcih akacijevega, cvetli nega, lipovega, kostanjevega in gozdnega medu smo prikazali na sliki 6. Barva posamezne regresijske premice je odvisna od sirupa, ki smo ga vmešali v vzorce naštetih petih vrst medu. S rtkano rožnato rto so ozna ene mejne vrednosti za vsebnost vode in saharoze ter za aktivnost diastaze, kot jih predpisuje Pravilnik o medu (2011).

Za regresije med vrsto in koli ino dodanega sirupa ter vsebnostjo vode v vzorcih medu petih vrst je zna ilen visok koeficient determinacije. Regresijske premice imajo pozitivni smernostni koeficient, razen v primeru glukoznega sirupa GL, kjer je zveza med koli ino dodanega sirupa in vsebnostjo vode v medu padajo a.

Mo ne in naraš ajo e zveze smo ugotovili tudi med vrsto in koli ino dodanega sirupa ter vsebnostjo hidroksimetilfurfurala v medu. Najvišji smernostni koeficient smo izra unali za regresijsko premico zveze med inverznim (IN) oziroma fruktozno-glukoznim sirupom GF2 in vsebnostjo HMF v vzorcih medu petih vrst. To pomeni, da je vsebnost HMF v medu najhitreje naraš ala z dodatki invertnega in GF2 sirupa.

Dodajanje invertnega sirupa je povzro ilo tudi najhitrejšo spremembo, to je naraš anje vsebnosti saharoze v vzorcih petih vrst medu. Smernostni koeficienti regresijskih premic za vse štiri zveze med vrsto sirupa in vsebnostjo saharoze v petih vrstah medu so bili pozitivni.



Slika 6. Vpliv deleža in vrste sirupa na vsebnost vode, aktivnost diastaze in vsebnost HMF in saharoze v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu

Figure 6. Effect of syrup amount and type on water content, diastase activity, and content of HMF and sucrose in deliberately adulterated samples of five honey types

Za aktivnost diastaze smo pri vseh petih vrstah medu ugotovili, da se diastazno število, s katerim izražamo aktivnost encima diastaze, z dodajanjem kateregakoli od štirih sirupov zmanjšuje. O tem pri ažo negativni smernostni koeficienti ena b linearne regresije, ki so znašali od  $-0,1740$ , za zvezo med dodanim fruktozno-glukožnim sirupom GF1 in DN, do  $-0,1496$  za zvezo med GF2 in DN.

Kot lahko preberemo v preglednici 15 so bili za vse zveze med vrsto sirupa in aktivnostjo diastaze zna ilni visoki determinacijski koeficienti. V preglednici 15 so poleg ena b linearne regresije med vrsto sirupa in aktivnostjo diastaze zbrane še ena be linearnih regresij med štirimi vrstami sirupa in vsebnostjo vode, HMF, saharoze, prostih kislin, skupno vsebnostjo fruktoze in glukoze ter vrednostjo pH. Predstavljene zveze so mo ne, za ena be linearne regresije pa so v ve ini primerov zna ilni visoki koeficienti determinacije.

**Preglednica 15.** Ena ba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in osnovnimi fizikalno-kemijskimi parametri, dolo enimi v petih vrstah medu (akacijevem, lipovem, kostanjevem, cvetli nem in gozdnem medu)

**Table 15.** Linear regression equation and determination coefficient for relation between added syrup type and amount and basic physico-chemical parameters, determined in five types of honey (acacia, linden, chestnut, multifloral and forest honey)

Fizikalno-kemijski parameter	Vrsta sirupa	Ena ba linearne regresije	$r^2$
vsebnost vode (g/100 g)	GF1	$y = 0,1448x + 14,919$	0,985
	GF2	$y = 0,053x + 16,142$	0,985
	GL	$y = -0,0336x + 16,453$	0,486
	IN	$y = 0,0637x + 14,811$	0,955
aktivnost diastaze (DN)	GF1	$y = -0,174x + 17,585$	0,840
	GF2	$y = -0,1496x + 15,569$	0,796
	GL	$y = -0,1662x + 15,879$	0,801
	IN	$y = -0,1639x + 16,344$	0,904
vsebnost HMF (mg/kg)	GF1	$y = 0,1194x + 9,0963$	0,494
	GF2	$y = 0,3252x + 0,6101$	0,967
	GL	$y = 0,171x + 1,5085$	0,989
	IN	$y = 0,3768x + 7,7678$	0,945
vsebnost fruktoze in glukoze (g/100 g)	GF1	$y = -0,0478x + 64,886$	0,339
	GF2	$y = -0,1731x + 68,222$	0,875
	GL	$y = -0,3399x + 67,659$	0,946
	IN	$y = 0,0968x + 64,54$	0,459
vsebnost saharoze (g/100 g)	GF1	$y = 0,0061x + 0,4693$	0,176
	GF2	$y = 0,0048x + 0,6972$	0,100
	GL	$y = 0,0162x + 0,8842$	0,500
	IN	$y = 0,141x + 1,9708$	0,738
vsebnost prostih kislin (mekv/kg)	GF1	$y = -0,1716x + 19,599$	0,620
	GF2	$y = -0,1009x + 11,007$	0,396
	GL	$y = -0,1954x + 20,309$	0,822
	IN	$y = -0,1776x + 20,017$	0,725
vrednost pH	GF1	$y = -0,0029x + 5,1035$	0,078
	GF2	$y = 0,0151x + 4,8845$	0,202
	GL	$y = 0,0199x + 4,9074$	0,743
	IN	$y = 0,025x + 4,9894$	0,872

Legenda: x – vrednost fizikalno-kemijskega parametra; y – koli ina dodanega sirupa (v %);  $r^2$  – koeficient determinacije regresijske ena ba

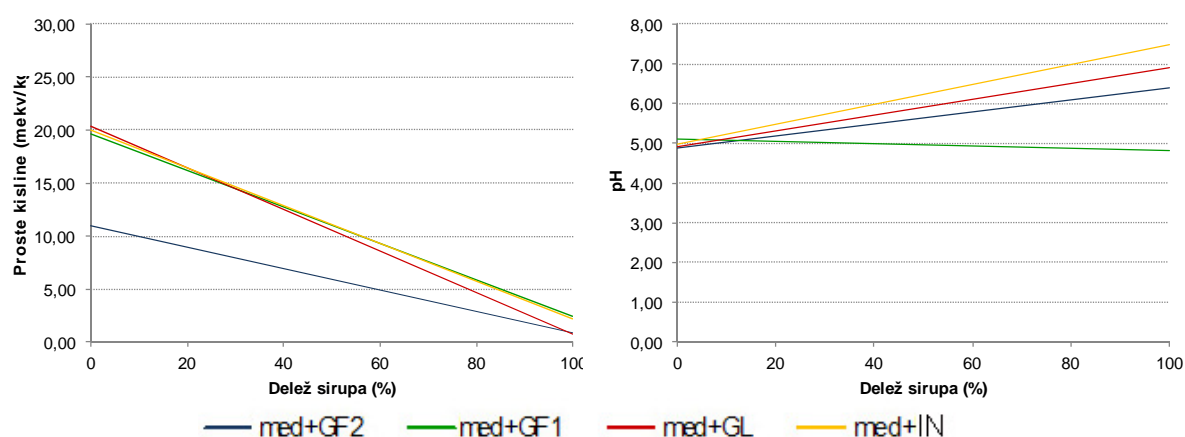
Vsebnost vode v fruktozno-glukoznih in invertnem sirupu je bila ve ja od 20 g/100 g, zato se je z višanjem deleža sirupa v medu ve ala tudi vsebnost vode. Obratno sorazmerje je veljalo edino v primeru dodajanja glukoznega sirupa, ki je vseboval 12,7 % vode. Za to zvezo smo izra unali nizek determinacijski koeficient ( $r^2 = 0,486$ ).

Sirupi so vsebovali med 18,6 (glukozni) in 45,2 mg/kg HMF (invertni sirup). V osnovnih vzorcih medu je bilo HMF manj kot 10 mg/kg, zato se je vsebnost te komponente v medu ve ala s koli ino dodanega sirupa. Zveza je bila mo na v vseh primerih, razen pri fruktozno-glukoznem sirupu GF1.

Najve saharoze je vseboval invertni sirup (15,8 g/100 g), kar je vplivalo tudi na strm naklon premice regresije **vsebnost saharoze – delež sirupa**. Vsebnost saharoze v fruktozno-glukoznih sirupih GF1 in GF2 in v glukoznem sirupu GL je bila podobna kot v

vzorcih medu, med 1,12 in 2,56 g/100 g, zato je bil vpliv dodajanja teh sirupov na pove anje koli ine saharoze v medu majhen.

Na sliki 7 je prikazan še vpliv koli ine dodanega sirupa na dva parametra kislosti medu, in sicer na vsebnost prostih kislin in pH v vzorcih namerno potvorjenega akacijevega, cvetli nega, lipovega, kostanjevega in gozdnega medu. Ker je vsebnost prostih kislin v sladkornih sirupih veliko manjša kot v pristnih vzorcih medu, med 0,82 mekv/kg v sirupu GF2 in 2,69 mekv/kg v IN, imajo ena be regresije za vse štiri sirupe negativen smernostni koeficient. Za regresijo med dodatki glukoznega in invertnega sirupa ter parametroma kislosti medu smo izra unali visoka koeficienta determinacije, nizkega pa v primeru uporabe fruktozno-glukoznega sirupa GF2. Ta sirup smo dodajali v vzorce akacijevega, lipovega in kostanjevega medu, ki so se v osnovi precej razlikovali v vsebnosti prostih kislin.



Slika 7. Vpliv deleža in vrste sirupa na vsebnost prostih kislin in vrednost pH v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu

Figure 7. Effect of syrup amount and type on free acidity and pH value of deliberately adulterated samples of five honey types

Uporabljeni sirupi so bili nekoliko manj kisli kot pristni vzorci medu, saj je njihova vrednost pH znašala od 4,80 (GF1) do 7,52 (IN). Mo no odvisno zvezo med vrednostjo pH v potvorjenih vzorcih medu in koli ino dodanega sirupa smo ugotovili za glukozni in invertni sirup, v primeru uporabe fruktozno-glukoznih sirupov, ki sta imela nižji pH, pa je bila zveza zelo šibka in v primeru GF1 celo z negativnim smernostnim koeficientom regresijske premice.

#### 4.1.3 Rezultati analiz osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov trgovinskih vzorcev

V letih 2008, 2009 in 2010 smo v trgovinah po Sloveniji vzor ili skupno 70 vzorcev medu. Poreklo medu je bilo razli no, tako glede na botani ni kot tudi geografski izvor. Na ve ini vzorcev je bilo navedeno geografsko poreklo v okvirih, kot ga zahteva Pravilnik o medu, torej da med izvira iz držav EU, iz držav, ki niso lanice EU ali da je med mešanica medu proizvedenega v EU in izven Skupnosti. Geografski izvor posameznega vzorca medu, vzor enega v trgovinah, je predstavljen v preglednici v prilogi E.

Vzorci smo senzorično ocenjeni, s čimer smo preverili, ali je vrsta medu, glede na botanični izvor, ustrezno določena. Značilnosti senzorične lastnosti posameznega vzorca smo označili z enim od treh znakov (+ za vrsto značilne senzorične lastnosti; 0 za manj značilne senzorične lastnosti; – za neznačilne senzorične lastnosti). Značilne senzorične lastnosti za deklarirano vrsto je imelo 52 vzorcev medu, 10 vzorcev je imelo manj značilne senzorične lastnosti in 8 vzorcev neustrezne senzorične lastnosti za vrsto, ki je bila navedena na etiketi. Neznačilne senzorične lastnosti so imeli en vzorec akacijevga medu (tA01), dva vzorca cvetličnega medu (tC01 in tC02), dva vzorca lipovega medu (tL04 in tL05) in trije vzorci gozdnega medu (tG01, tG13 in tG15).

Analizo osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov smo opravili v dveh ponovitvah. V preglednici 16 so predstavljene povprečne vrednosti meritev z osnovnimi statističnimi parametri. Nekatere vrste, ki so manj značilne za slovensko področje, je zastopal le po en vzorec, zato je v tem primeru podana le povprečna vrednost analiziranega parametra.

**Preglednica 16. Povprečne vrednosti in opisne statistike za vsebnost vode, električno prevodnost, vsebnost saharoze, HMF in aktivnost diastaze v trgovinskih vzorcih medu**

**Table 16. Average values and descriptive statistics for water content, electrical conductivity, sucrose and HMF content and diastase activity, determined in honey samples purchased in stores**

Vrsta medu	statistični parameter	Fizikalno-kemijski parameter				
		voda (g/100 g)	$\chi$ (mS/cm)	saharoza (g/100 g)	diastaza (DN)	HMF (mg/kg)
akacijev (n = 8)	$\bar{x} \pm SD$	16,4 ± 1,8	0,28 ± 0,27	4,82 ± 1,90	9,1 ± 1,1	21,6 ± 18,6
	$x_{min}-x_{max}$	13,7–18,1	0,11–0,93	3,58–7,01	7,1–9,7	3,7–51,7
	KV (%)	10,8	97,0	39,5	12,4	86,4
cvetlični (n = 30)	$\bar{x} \pm SD$	17,2 ± 1,5	0,41 ± 0,12	4,27 ± 1,30	12,4 ± 2,7	22,7 ± 15,4
	$x_{min}-x_{max}$	13,1–19,9	0,22–0,79	2,58–6,44	7,1–17,3	1,5–62,9
	KV (%)	8,83	29,3	30,5	21,9	67,8
lipov (n = 5)	$\bar{x} \pm SD$	17,8 ± 1,4	0,45 ± 0,24	3,44 ± 2,64	11,9 ± 1,9	9,1 ± 6,3
	$x_{min}-x_{max}$	15,7–19,7	0,24–0,82	1,57–5,30	10,2–13,9	4,6–13,5
	KV (%)	8,04	53,5	76,8	15,9	69,6
kostanjev (n = 5)	$\bar{x} \pm SD$	15,7 ± 1,3	1,21 ± 0,22	3,87 ± 1,95	19,4 ± 3,4	36,3 ± 28,0
	$x_{min}-x_{max}$	14,2–17,4	0,98–1,55	0,63–6,78	16,0–24,1	5,4–71,3
	KV (%)	8,13	18,3	28,3	17,6	77,2
gozdni (n = 16)	$\bar{x} \pm SD$	16,1 ± 1,8	0,95 ± 0,32	4,94 ± 2,46	14,7 ± 3,4	18,7 ± 13,2
	$x_{min}-x_{max}$	13,5–19,3	0,36–1,51	2,00–8,01	9,3–22,0	5,4–41,5
	KV (%)	11,3	33,8	49,8	22,8	70,6
hojčev (n = 1)	$\bar{x}$	16,7	1,26	5,79	15,0	23,0
pomarančev (n = 1)	$\bar{x}$	18,5	0,16	3,43	11,3	28,9
rožmarinov (n = 1)	$\bar{x}$	18,2	0,22	3,43	13,2	16,2
žajbljev (n = 1)	$\bar{x}$	18,0	0,53	2,43	15,9	35,7
timijanov (n = 1)	$\bar{x}$	18,1	0,29	3,86	14,6	27,4
sivkin (n = 1)	$\bar{x}$	18,3	0,25	3,58	12,7	17,5

Povprečna vsebnost vode v vzorcih medu, vzorci enih v trgovinah, je bila od 15,7 g/100 g v kostanjevem do 18,5 g/100 g v medu pomarančnem. Najmanj vode je vseboval vzorec cvetli nega medu tC16, ki je predstavljal mešanico medu pridelanega v EU in medu pridelanega izven EU. Vsebnost vode v nobenem od vzorcev ni presegla zakonsko dovoljene, eprav je 10 % vzorcev vsebovalo 18,6 ali več g/100 g vode.

Električna prevodnost je povezana z botaničnim poreklom nekaterih vrst medu. Za vzorec tA01, deklariran kot akacijev med, in tri vzorce, ki so bili v prodaji kot gozdni med, je negativno senzorično oceno za ustreznost deklariranja vrste medu potrdila izmerjena vrednost električne prevodnosti. Vzorec akacijevga medu je imel previsoko električno prevodnost (0,93 mS/cm), vsi trije vzorci gozdnega medu pa prevodnost, ki je bila nižja od 0,8 mS/cm. Vzorci v tem parametru niso ustrezali Pravilniku o medu (2011). Neznano ilno nizko električno prevodnost (0,24 mS/cm) sta imela tudi dva vzorca lipovega medu, ki sta dobila tudi negativno senzorično oceno. Najnižjo povprečno vrednost električne prevodnosti so imeli med pomarančnem, rožmarinovem, sivkinim in akacijevim medom. Kot je za vrste znano ilno, smo najvišjo povprečno vrednost električne prevodnosti izmerili v kostanjevem in hojevem medu.

Med 70 vzorci medu iz trgovin jih je pet vsebovalo več saharoze kot dovoljuje Pravilnik, torej več kot 5 g/100 g medu. Temu pogoju niso ustrezali vzorci tC08, tC10, tL01, tG04 in tH01, v katerih je bilo saharoze več kot 5 g/100 g. Najmanjšo povprečno vsebnost saharoze je imel žajbljev med, največjo pa hojev. Povprečna vsebnost saharoze med vrstami medu z več kot tremi vzorci je bila med 3,44 g/100 g v lipovem medu in 4,94 g/100 g v gozdnem medu.

Aktivnost encima diastaze, ki jo izražamo kot diastazno število, mora v svežem, nepregretem medu znašati vsaj 8. V vrstah medu, ki imajo naravno nizko diastazno aktivnost, mora vrednost DN znašati vsaj 3, vendar obenem ne smejo vsebovati več kot 15 mg/kg HMF (Pravilnik o medu, 2011). Povprečna vrednost diastaznega števila DN v analiziranih vzorcih medu iz trgovin je znašala od 9,1 v akacijevem medu do 36,3 v kostanjevem medu. Pri dveh vzorcih, tC26 in tA05, smo določili ali nižje diastazno število od predpisanega (DN = 7,1 v obeh primerih). Vzorec akacijevga medu bi sicer še lahko ustrezal zahtevam Pravilnika o medu, če v njem ne bi bila presežena tudi vsebnost HMF (51,6 mg/kg). Poleg tega vzorca je več HMF kot je dovoljeno, to je več kot 40 mg/kg, vsebovalo še šest drugih vzorcev: tC28, tK03 in tG12, ki so izvirali iz Slovenije, in tC20, tC29 in tK04, ki so bili deklarirani kot mešanica medu, pridelanega v državah EU in državah izven EU. Na nobenem od zadnjih treh vzorcev ni bilo podatka, da bi med v celoti ali delno izviral s področja s tropskim podnebjem, zato zanje tudi nismo privzeli kriterija »največ 80 mg/kg HMF« (Pravilnik o medu, 2011).

Koli inah prostih kislin v nobenem od trgovinskih vzorcev ni presegla najvišje dovoljene vrednosti, 50 mekv/kg. Najmanj prostih kislin smo določili v medu pomarančnem, 13,5 mekv/kg, največ pa v medu timijana, 26,2 mekv/kg. Pri vrstah medu z več kot tremi vzorci smo ugotovili precejšnjo variabilnost v vsebnostih prostih kislin, na kar kažejo tudi koeficienti variabilnosti, navedeni v preglednici 17. Najbolj raznolika je bila koli inah prostih kislin v cvetličnem medu, kjer je znašala od 8,33 do 28,7 mekv/kg. Najmanj prostih kislin smo določili v vzorcu cvetli nega medu tC06 (8,33 mekv/kg), največ pa v vzorcu gozdnega medu tG04 (42,6 mekv/kg).

Še večja raznolikost med vzorci iste vrste medu je bila v vsebnosti laktonov. Tako v akacijevem, cvetličnem, lipovem, kostanjevem kot tudi gozdnem medu smo kot najmanjšo

dolo ili vrednost 0,0 mekv/kg. Najve laktonov je vseboval vzorec cvetli nega medu tC09 (9,98 mekv/kg). Koeficient variabilnosti za vsebnost laktonov je pri omenjenih vrstah medu znašal tudi ve kot 100 %. Med posameznimi vzorci je malo laktonov, 0,99 mekv/kg, vseboval vzorec hojevega medu, veliko, 7,08 in 8,40 mekv/kg, pa vzorca žajbljevega in timijanovega medu.

**Preglednica 17. Povpre ne vrednosti in opisne statistike za vsebnost prostih kislin, laktonov in skupnih kislin ter vrednost pH v trgovinskih vzorcih medu**

**Table 17. Average values and descriptive statistics for the content of free acids, lactones and total acidity, and pH value determined in honey samples purchased in stores**

Vrsta medu	Statisti ni parameter	Fizikalno-kemijski parameter			
		proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH
akacijev (n = 8)	$\bar{x} \pm SD$	16,6 ± 5,4	2,87 ± 2,87	19,5 ± 6,5	4,45 ± 0,44
	$x_{min}-x_{max}$	10,7–23,7	0,00–6,70	10,7–30,4	4,14–4,95
	KV (%)	32,3	100	33,3	9,88
cvetli ni (n = 30)	$\bar{x} \pm SD$	19,2 ± 7,0	3,93 ± 3,66	23,1 ± 9,6	4,37 ± 0,30
	$x_{min}-x_{max}$	8,3–28,7	0,00–9,98	12,1–38,3	4,07–4,90
	KV (%)	36,4	93,3	41,4	6,94
lipov (n = 5)	$\bar{x} \pm SD$	23,9 ± 3,1	4,08 ± 4,39	28,0 ± 5,4	4,31 ± 0,14
	$x_{min}-x_{max}$	20,8–27,0	0,00–7,90	21,7–34,9	4,21–4,41
	KV (%)	13,2	107	19,4	3,28
kostanjev (n = 5)	$\bar{x} \pm SD$	19,7 ± 6,9	2,22 ± 2,53	2189 ± 8,7	4,58 ± 0,30
	$x_{min}-x_{max}$	8,6–25,3	0,00–6,48	8,6–30,8	4,07–5,06
	KV (%)	35,0	113	39,9	7,91
gozdni (n = 16)	$\bar{x} \pm SD$	21,4 ± 7,5	2,45 ± 3,03	23,8 ± 9,0	4,79 ± 0,30
	$x_{min}-x_{max}$	10,2–42,6	0,00–7,80	10,2–50,0	4,48–5,11
	KV (%)	35,1	123	37,6	6,19
hojev (n = 1)	$\bar{x}$	22,1	0,99	23,1	4,58
pomaran ev (n = 1)	$\bar{x}$	13,5	5,60	19,1	4,14
rožmarinov (n = 1)	$\bar{x}$	18,0	6,60	24,6	4,14
žajbljev (n = 1)	$\bar{x}$	21,2	7,08	28,3	4,93
timijanov (n = 1)	$\bar{x}$	26,2	8,40	34,6	4,08
sivkin (n = 1)	$\bar{x}$	12,4	5,75	18,2	4,45

Analizirani vzorci medu iz trgovin so vsebovali povpre no od 19,5 (akacijev med) do 28,0 mekv/kg (lipov med) skupnih kislin. Najmanj skupnih kislin, 8,63 mekv/kg, je bilo v kostanjevem medu tK03, najve pa v vzorcu gozdnega medu tG04, 50,0 mekv/kg. Koeficienti variabilnosti so bili podobni kot pri vsebnosti prostih kislin in so znašali od 19,4 do 41,4 %.

Vrednosti pH v trgovinskih vzorcih se med posameznimi vrstami medu niso zna ilno razlikovale. Najnižja povpre na vrednost pH je bila 4,31 v lipovem medu, najvišja pa 4,79 v gozdnem medu. Med posameznimi vzorci je imel najnižji pH vzorec timijanovega medu (pH = 4,08), najvišji pH pa vzorec žajbljevega medu z vrednostjo pH = 4,93.

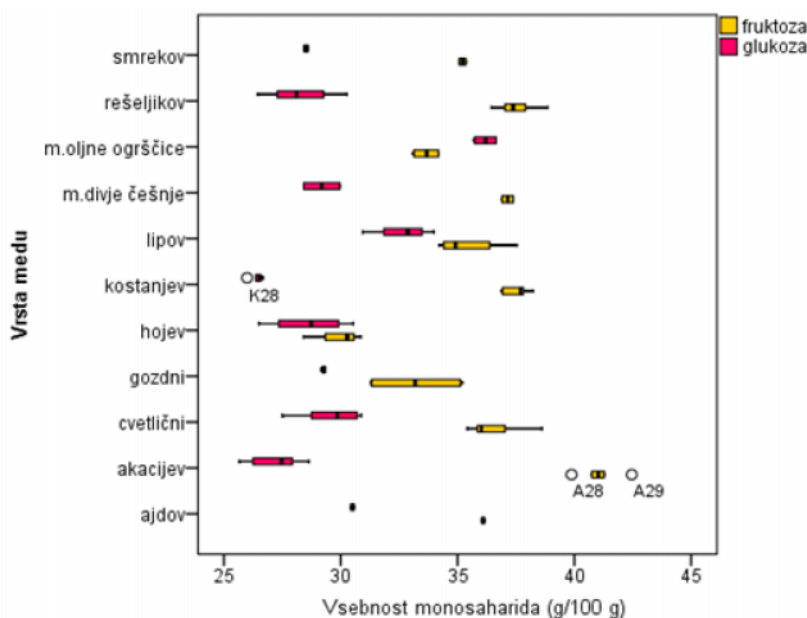
## 4.2 VSEBNOST OGLJIKOVIH HIDRATOV DOLOČENA Z METODO LC-MS

Z metodo tekoinske kromatografije HILIC (angl. *Hydrophilic Interaction Chromatography*) z masnim detektorjem smo v vzorcih medu določili in kvantificirali enajst različnih vrst ogljikovih hidratov: fruktozo, glukozo, saharozo, turanozo, palatinozo, maltozo, melicitozo, erlozo, rafinozo, maltotriozo in panozo. Disaharidov gentibioze in melibioze nismo uspeli popolnoma ločiti, kvantificirali pa smo njuno skupno vsebnost. V nekaterih vzorcih medu smo uspeli kvantificirati tudi vsebnost trisaharida izomaltotrioze. V analizo so bili zajeti izbrani vzorci, pridobljeni neposredno od čebelarjev, vzorci medu, ki smo jih namerno potvorili z dodatki sladkornih sirupov in sami sirupi. V času analize so bili vzorci stari od dva do šest mesecev. Vsak vzorec je bil analiziran v vsaj dveh ponovitvah. Primer kromatograma je predstavljen na sliki v prilogi J.

### 4.2.1 Vsebnost ogljikovih hidratov v pristnih vzorcih medu

Vsebnost mono-, di- in trisaharidov smo določili ali v 55 vzorcih medu, ki smo jih dobili neposredno od čebelarjev. Število vzorcev posamezne vrste medu je poleg povprečnih vrednosti in opisnih statistik predstavljeno v preglednici 18.

Vzorci medu so vsebovali največ fruktoze in glukoze. V večini obravnavanih vrst medu je bila vsebnost fruktoze večja od količine glukoze, razen v medu oljne ogrščice, kjer je bilo razmerje obratno. Največjo povprečno vsebnost fruktoze, 41,1 g/100 g, smo določili v akacijevem medu, najmanj tega monosaharida, 30,0 g/100 g, pa so vsebovali vzorci hojevega medu. Med oljne ogrščice je vseboval največ glukoze, 36,2 g/100 g, najmanjšo povprečno vsebnost, 26,4 g/100 g, pa smo določili v kostanjevem medu.



Slika 8. Vsebnost fruktoze in glukoze v različnih vrstah medu, prikazana kot okvir z rožjami  
Figure 8. Box plots of fructose and glucose content in different honey types

Med vzorci iste vrste ni bilo večjih razlik v količinah fruktoze oziroma glukoze, kar potrjujejo tudi koeficienti variabilnosti, ki niso presegli 7%. Obratno pa smo z neparametričnim testom ugotovili, da se vsebnost teh dveh monosaharidov v obravnavanih



enajstih vrstah slovenskega medu zna ilno razlikuje. Razlike med vrstami so razvidne tudi v prikazu okvirja z ro aji na sliki 8, na kateri vidimo še, da sta pri akacijevem medu dva vzorca izstopala po vsebnosti fruktoze, A28 kot spodnji in A29 kot zgornji osamelec. Spodnji osamelec je bil tudi vzorec K28 v vsebnosti glukoze.

**Preglednica 18. Povpre na vrednost in osnovni statisti nih parametri vsebnosti fruktoze, glukoze, saharoze, turanoze, palatinoze in maltoze v vzorcih desetih vrst pristnega medu**

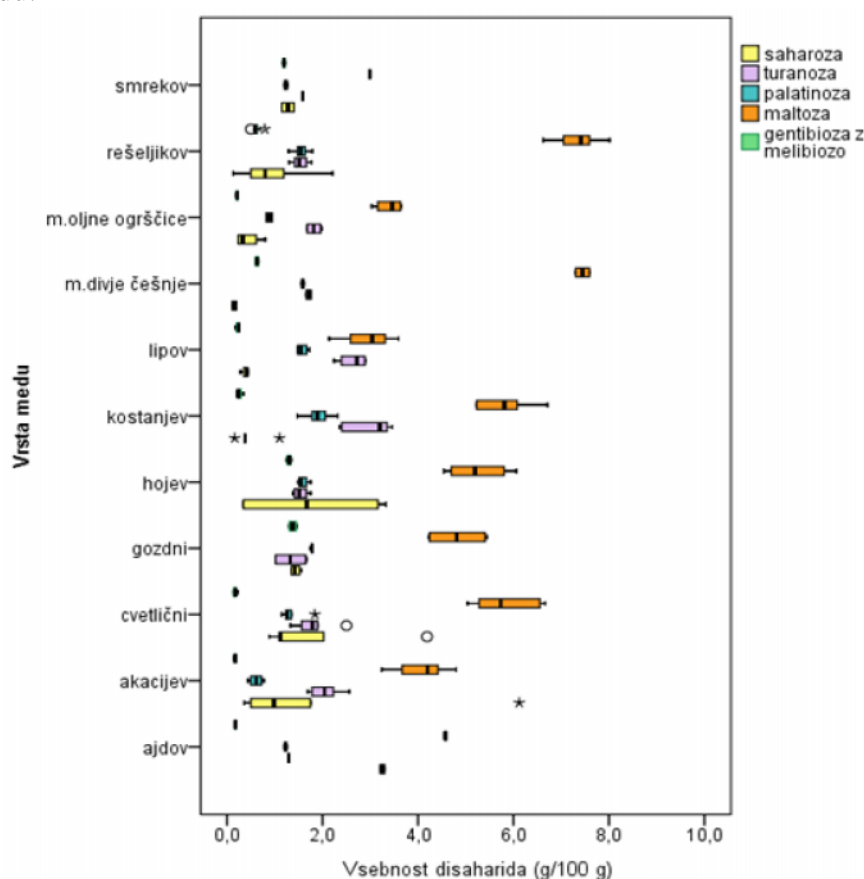
**Table 18. Average value and descriptive statistics of fructose, glucose, sucrose, turanose, palatinose and maltose content in authentic honey samples of ten types**

Vrsta medu	Statisti ni parameter	Vsebnost ogljikovega hidrata (g/100 g)					
		fruktoza	glukoza	saharoza	turanoza	palatinoza	maltoza
akacijev (n = 6)	$\bar{x}$	41,1	27,2	1,78	2,06	0,61 <sup>a</sup>	4,09 <sup>b,c</sup>
	SD	0,84	1,11	2,20	0,33	0,13	0,56
	KV (%)	2,05	4,07	123	16,3	20,7	13,7
cvetli ni (n = 5)	$\bar{x}$	36,6	29,5	1,86	1,82	1,36 <sup>c,d</sup>	5,85 <sup>e</sup>
	SD	1,27	1,42	1,37	0,44	0,28	0,73
	KV (%)	3,48	4,79	73,6	24,3	20,3	12,5
lipov (n = 4)	$\bar{x}$	35,4	32,7	0,39	2,64	1,57 <sup>d,e</sup>	2,95 <sup>a</sup>
	SD	1,49	1,27	0,07	0,31	0,12	0,60
	KV (%)	4,20	3,88	18,5	11,8	7,58	20,3
kostanjev (n = 5)	$\bar{x}$	37,5	26,4	0,48	2,96	1,90 <sup>f</sup>	5,81 <sup>e</sup>
	SD	0,59	0,27	0,36	0,53	0,32	0,63
	KV (%)	1,58	1,02	75,4	17,9	16,6	10,8
gozdni (n = 4)	$\bar{x}$	33,2	29,3	1,44	1,34	1,78 <sup>e,f</sup>	4,82 <sup>c,d</sup>
	SD	2,20	0,07	0,10	0,36	0,02	0,67
	KV (%)	6,61	0,23	7,05	27,3	0,98	14,0
hojev (n = 4)	$\bar{x}$	30,0	28,6	1,75	1,54	1,59 <sup>d,e</sup>	5,25 <sup>d,e</sup>
	SD	1,06	1,71	1,63	0,16	0,11	0,68
	KV (%)	3,55	5,96	93,4	10,5	7,24	13,0
smrekov (n = 2)	$\bar{x}$	35,2	28,5	1,28	1,59	1,23 <sup>c</sup>	2,99 <sup>a</sup>
	SD	0,19	0,12	0,18	0,01	0,04	0,01
	KV (%)	0,54	0,42	13,8	0,45	3,45	0,47
m.divje ešnje (n = 2)	$\bar{x}$	37,2	29,2	0,16	1,71	1,59 <sup>d,e</sup>	7,45 <sup>f</sup>
	SD	0,33	1,09	0,06	0,07	0,04	0,21
	KV (%)	0,89	3,73	41,1	4,14	2,23	2,75
m.oljne ogrš ice (n = 4)	$\bar{x}$	33,7	36,2	0,42	1,82	0,89 <sup>b</sup>	3,40 <sup>a,b</sup>
	SD	0,60	0,53	0,27	0,16	0,08	0,30
	KV (%)	1,80	1,46	63,1	8,94	8,48	8,70
rešeljikov (n = 17)	$\bar{x}$	37,5	28,2	0,88	1,53	1,56 <sup>d,e</sup>	7,37 <sup>f</sup>
	SD	0,66	1,15	0,54	0,15	0,15	0,44
	KV (%)	1,76	4,08	61,7	10,1	9,73	5,98
ajdov (n = 2)	$\bar{x}$	36,1	30,5	3,26	1,29	1,23 <sup>c</sup>	4,58 <sup>c,d</sup>
	SD	0,08	0,09	0,06	0,01	0,04	0,02
	KV (%)	0,22	0,30	1,96	1,10	2,89	0,46
K-W test (p)*		0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000

<sup>a,b,c,d</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo (  $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena  $p < 0,05$

Z uporabljenimi metodami LC-MS smo detektirali šest disaharidov: saharozo, turanozo, palatinozo, maltozo, gentibiozo in melibiozo. Ker je vrh gentibioze prehajal v vrh melibioze, podajamo količino teh dveh disaharidov kot skupno vrednost: gentibioza z melibiozo. Količina inško je bila v vzorcih medu največje maltoze, najmanj pa gentibioze z melibiozo. Vsebnost saharoze je bila v analiziranih vzorcih zelo raznolika, saj ni odvisna le od botaničnega izvora surovine za med. Široko območje vrednosti je razvidno tudi na sliki 9. Povprečna vsebnost je znašala od 0,16 g/100 g v medu divje češnje do 3,26 g/100 g v ajdovem medu. Manj kot 1 % saharoze smo določili tudi v lipovem, kostanjevem, rešljikovem medu in medu oljne ogrščice. Nekateri vzorci so izraziteje odstopali od ostalih iste vrste. Vzorec A28 je bil zgornji ekstremni osamelec v vsebnosti saharoze med akacijevim medom, K29 pa med kostanjevim medom, medtem ko je bil K31 spodnji ekstrem. Kruskal-Wallisov test je potrdil statistične razlike v vsebnosti saharoze med vrstami medu.



Slika 9. Vsebnost disaharidov v različnih vrstah medu, prikazana kot okvir z roaji  
Figure 9. Box plots of disaccharides' content in different types of honey

Analizirani vzorci slovenskega medu so imeli povprečno od 1,29 g/100 g (ajdov med) do 2,96 g/100 g (kostanjev med) turanoze. Koefficienti variabilnosti med vzorci iste vrste so znašali od 0,45 do 27,3 %. Široko območje vrednosti je bilo značilno za kostanjev, lipov in gozdni med (slika 9). Vzorec C38 z 2,50 g/100 g turanoze je bil zgornji osamelec med vzorci cvetličnega medu. Ugotovili smo tudi, da so razlike v vsebnosti turanoze med posameznimi vrstami medu statistično značilne (neparametrični test).

Značilne razlike med vrstami medu smo ugotovili tudi za vsebnost palatinoze. Z analizo variance in Duncanovim testom smo vrste medu razvrstili v šest skupin glede na vsebnost tega disaharida. Akacijev med vsebuje najmanj palatinoze, povprečno 0,61 g/100 g in se razlikuje od ostalih vrst medu. V drugi skupini (indeks b ob povprečni vrednosti v preglednici 18) je med oljne ogršice, v tretji skupini glede na vsebnost (c) pa sta ajdov in smrekov med z 1,23 g/100 g palatinoze. Cvetli ni med se od zadnjih dveh vrst ne razlikuje, ravno tako se ne razlikuje v vsebnosti palatinoze od lipovega, hojevega, rešeljikovega medu in medu divje ešnje. Največ palatinoze je vseboval kostanjev med, 1,90 g/100 g, ki se je v vsebnosti disaharida značilno razlikoval od vseh vrst medu, razen od gozdnega. Skoraj toliko palatinoze kot so jo povprečno vsebovali vzorci kostanjevega medu je vseboval tudi cvetli ni med C40, ki je bil v svoji vrsti zato zgornji ekstremni osamelec.

Disaharidov gentibioze in melibioze je bilo v vzorcih medu malo, od 0,17 g/100 g v akacijevem in cvetli nem medu do 1,38 g/100 g v gozdnem medu. Z ANOVO smo statistično potrdili razlike med vrstami medu in jih po vsebnosti obeh disaharidov razdelili v šest skupin. V prvi skupini (indeks a ob povprečni vrednosti v preglednici 19) z najmanj gentibioze z melibiozo so bili akacijev, cvetli ni in ajdov med. Značilno so se razlikovali od ostalih vrst medu z izjemo lipovega medu in medu oljne ogršice. Slednji dve vrsti se v vsebnosti melibioze z gentibiozo tudi nista razlikovali od kostanjevega medu (indeks b). V tretji skupini (indeks c) so bili vzorci medu divje ešnje in rešeljike, nato pa so vsak v svoji skupini z naraščajočo vsebnostjo melibioze z gentibiozo sledili smrekov, hojev in gozdni med.

V vseh obravnavanih vzorcih medu, ki smo jih dobili neposredno pri čebelarjih, smo določili ali vsebnosti trisaharidov melicitoze, erloze, rafinoze, maltotrioze in panoze. Koli ino izomaltotrioze smo uspeli ovrednotiti le v posameznih vzorcih akacijevnega, lipovega, kostanjevega medu in medu divje ešnje, zato so v preglednici 19 ino predstavljene le povprečne vrednosti tega trisaharida. Ker predpogoj za ANOVO, to je homogenost varianc, ni bil izpolnjen pri nobenem od trisaharidov, navajamo le rezultate neparametričnega Kruskal-Wallisovega testa. Z njim smo potrdili, da se vrste medu razlikujejo v vsebnostih analiziranih trisaharidov, razen v vsebnosti izomaltotrioze.

Za melicitozo je značilno, da je vrste medu iz mane vsebujejo več kot nektarne vrste medu. To potrjujejo tudi povprečne vrednosti predstavljene v preglednici 19 in okvirji z rožami na sliki 10. Največjo povprečno vsebnost melicitoze, 3,54 g/100 g, smo določili v smrekovem medu; le nekoliko manj pa jo je bilo v hojevem medu. Manj kot 1 g/100 g melicitoze so vsebovali lipov med, med divje ešnje, rešeljike, oljne ogršice, ajde ter cvetli ni in akacijev med, v katerem je bilo povprečno le 0,06 g/100 g melicitoze. Med vzorci rešeljike je vzorec R06 izstopal kot zgornji ekstremni osamelec (0,89 g/100 g).

Na sliki 10 vidimo, da je bila količina erloze v lipovem medu podobna vsebnosti melicitoze, v ostalih vrstah medu pa sta se vsebnosti obeh trisaharidov razlikovali. Območja vrednosti so bila povprečno nižja kot pri melicitozi. Med oljne ogršice je vseboval najmanj erloze, in sicer 0,19 g/100 g. Povprečno manj kot 0,5 % smo jo določili tudi v kostanjevem, ešnjevem, rešeljikovem in akacijevem medu. Več kot 2 % erloze sta vsebovala hojev in gozdni med, v katerem je bila povprečna vsebnost največja, 2,68 g/100 g.

**Preglednica 19. Povpre na vrednost in osnovni statisti nih parametri vsebnosti gentibioze z melibiozo, melicitoze, erloze, rafinoze, maltotrioze, panoze in izomaltotrioze v vzorcih pristnega medu desetih vrst**

**Table 19. Average value and descriptive statistics of gentiobiose with melibiose, melicitose, erlose, raffinose, maltotriose, panose and isomaltotriose content in authentic honey samples of ten types**

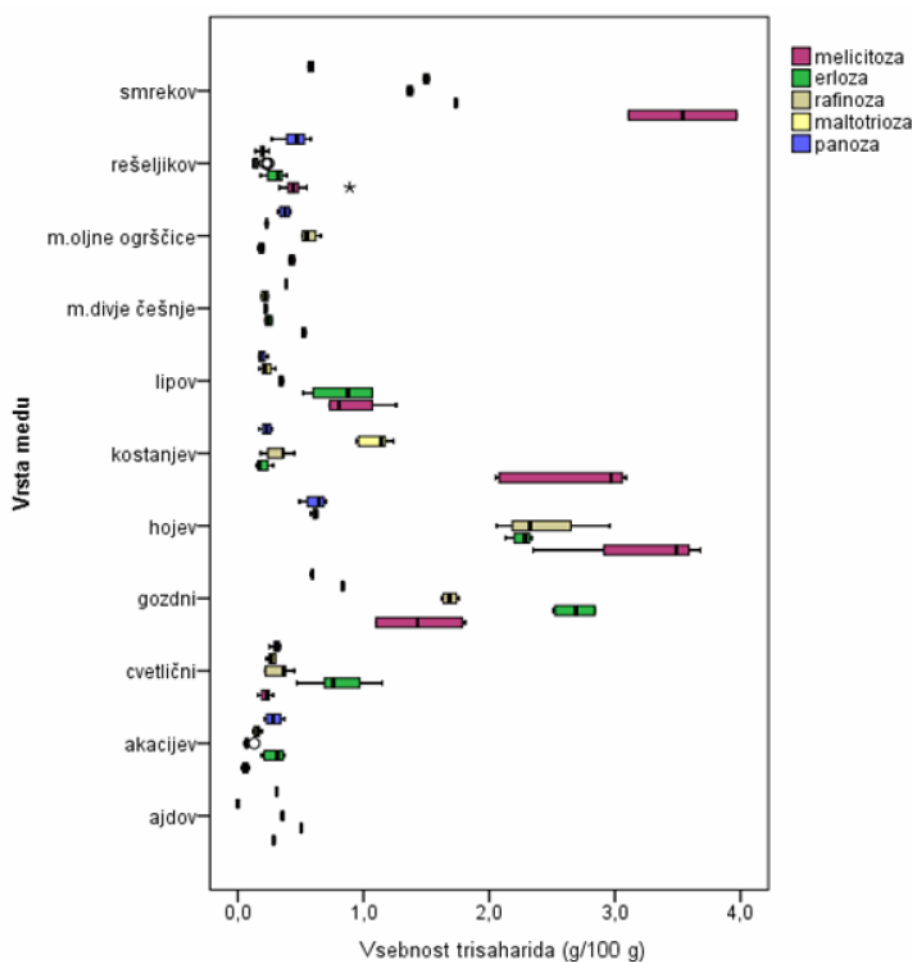
Vrsta medu	Statisti ni parameter	Vsebnost ogljikovega hidrata (g/100 g)						
		gentibioza z melibiozo	melicitoza	erloza	rafinoza	maltotrioza	panoza	izomaltotrioza
akacijev (n = 6)	$\bar{x}$	0,17 <sup>a</sup>	0,06	0,29	0,08	0,16	0,29	0,11
	SD	0,01	0,03	0,08	0,03	0,03	0,06	0,01
	KV (%)	6,94	43,5	27,0	35,6	17,2	22,6	5,50
cvetli ni (n = 5)	$\bar{x}$	0,17 <sup>a</sup>	0,22	0,81	0,33	0,27	0,30	
	SD	0,04	0,05	0,26	0,10	0,03	0,04	
	KV (%)	21,2	21,5	32,4	31,4	11,4	11,8	
lipov (n = 4)	$\bar{x}$	0,23 <sup>a,b</sup>	0,90	0,84	0,35	0,23	0,19	0,11
	SD	0,04	0,25	0,28	0,02	0,05	0,03	
	KV (%)	18,5	27,8	33,4	5,02	23,6	17,2	
kostanjev (n = 5)	$\bar{x}$	0,26 <sup>b</sup>	2,65	0,20	0,32	1,09	0,23	0,07
	SD	0,05	0,54	0,06	0,11	0,13	0,04	0,04
	KV (%)	18,9	20,2	27,4	33,8	12,2	18,4	63,9
gozdni (n = 2)	$\bar{x}$	1,38 <sup>f</sup>	1,44	2,68	1,69	0,84	0,59	
	SD	0,08	0,40	0,18	0,06	0,01	0,01	
	KV (%)	6,11	27,5	6,80	3,79	0,69	1,62	
hojev (n = 4)	$\bar{x}$	1,30 <sup>e</sup>	3,25	2,26	2,42	0,62	0,62	
	SD	0,05	0,61	0,09	0,38	0,02	0,09	
	KV (%)	3,82	18,7	4,04	15,8	3,87	15,0	
smrekov (n = 2)	$\bar{x}$	1,20 <sup>d</sup>	3,54	1,74	1,37	1,50	0,58	
	SD	0,04	0,61	0,01	0,03	0,03	0,03	
	KV (%)	2,96	17,2	0,41	2,06	1,89	4,88	
m.divje ešnje (n = 2)	$\bar{x}$	0,63 <sup>c</sup>	0,53	0,25	0,22	0,22	0,39	0,12
	SD	0,04	0,02	0,04	0,01	0,04	0,01	
	KV (%)	6,73	4,04	14,4	6,43	16,4	1,84	
m.oljne ogršice (n = 4)	$\bar{x}$	0,21 <sup>a,b</sup>	0,43	0,19	0,57	0,23	0,37	
	SD	0,02	0,02	0,02	0,07	0,01	0,05	
	KV (%)	7,23	5,37	11,8	12,2	3,55	12,3	
rešeljikov (n = 17)	$\bar{x}$	0,61 <sup>c</sup>	0,46	0,29	0,15	0,20	0,45	
	SD	0,06	0,13	0,07	0,04	0,03	0,09	
	KV (%)	9,96	27,9	23,8	25,8	16,3	20,7	
ajdov (n = 2)	$\bar{x}$	0,18 <sup>a</sup>	0,29	0,51	0,36	0,00	0,31	
	SD	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	
	KV (%)	4,04	2,48	1,40	1,99	0,00	1,12	
K-W test (p)*		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061

<sup>a,b,c,d</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena  $p < 0,05$

Koli ina rafinoze v analiziranih vzorcih medu se je gibala med 0,05 g/100 g (vzorec A27) in 2,96 g/100 g (H06). Povpre na vsebnost je bila ravno tako najmanjša v akacijevem

medu, 0,08 g/100 g, pri čemer je izstopal vzorec A26 kot zgornji osamelec. Podobne povprečne vsebnosti rafinoze, med 0,3 in 0,4 g/100 g, smo določili v kostanjevem, cvetličnem, lipovem in ajdovem medu. Vrste medu iz mane so vsebovale največ tega trisaharida, in sicer od 1,37 (smrekov med) do 2,42 g/100 g (hojev med). V rešeljikovem medu je bilo povprečno 0,15 % rafinoze, vendar so trije vzorci, R03, R05 in R13 pri tem odstopali kot zgornji osamelci.



Slika 10. Vsebnost trisaharidov v različnih vrstah medu, prikazana kot okvir z roaji

Figure 10. Box plots of trisaccharides' content in different types of honey

V vzorcih medu smo večinoma določili ali manj kot 1 % maltotrioze. V obeh vzorcih ajdovega medu je bilo tega trisaharida pod mejo kvantifikacije, nasprotno pa ga je bilo največ v kostanjevem (1,09 g/100 g) in smrekovem medu (1,50 g/100 g). Glede na povprečno vsebnost maltotrioze lahko vrste medu razvrstimo v naslednjem zaporedju: akacijev < rešeljikov < m. divje češnje < m. oljne ogrščice in lipov < cvetlični < hojev < gozdni < kostanjev < smrekov.

Povprečne vsebnosti panoze v vseh enajstih vrstah medu so bile manjše od 1 g/100 g. Najmanj smo je določili v lipovem medu, 0,19 g/100 g, največ pa v hojevem medu, 0,62 g/100g. Vrste medu so si v vsebnosti panoze sledile v naslednjem zaporedju: lipov < kostanjev < akacijev < cvetlični < ajdov < m. oljne ogrščice < m. divje češnje < rešeljikov < smrekov < gozdni < hojev.

Izomaltotriozo smo določili v vzorcih akacijevga medu, za katere smo izračunali povprečno vsebnost 0,11 g/100 g. Enako količino smo določili tudi v vzorcu lipovega medu L22, v ostalih vzorcih te vrste pa je bila količina manjša od meje kvantifikacije. Podobno je veljalo tudi za vzorca medu divje ešnje, saj smo vsebnost uspeli ovrednotiti le v enem izmed njiju. Vzorci kostanjevega medu so vsebovali povprečno 0,07 g/100 g izomaltotrioze, razlike med posameznimi vzorci pa so bile dokaj velike ( $KV > 63\%$ ).

#### **4.2.2 Razmerja med ogljikovimi hidrati v pristnih vzorcih medu in drugi izračunani parametri**

Iz analitskih podatkov o vsebnosti posameznih ogljikovih hidratov v medu smo izračunali različne parametre, ki so lahko povezani z njegovim botaničnim izvorom. Veja odstopanja od značilnih vrednosti lahko kažejo tudi na potvorbo. Izračunane vrednosti smo statistično obdelali: z ANOVO in Kruskal-Walisovim testom smo ugotavljali, ali med vrstami medu obstajajo statistično značilne razlike v izračunanih parametrih. Pogoj homogenosti varianc je bil izpolnjen le v primeru razmerja med maltotrizo in trisaharidi, kjer navajamo tudi rezultate ANOVE. Za vse ostale parametre veljajo rezultati neparametričnega testa, s katerim smo potrdili, da se vrste medu med seboj razlikujejo v vseh parametrih, predstavljenih v preglednicah 20 in 21.

Povprečne vrednosti vsebnosti posameznih saharidov smo sešteli. V preglednicah 20 in 21 predstavljamo skupno količino treh skupin saharidov v posameznih vrstah medu, in sicer monosaharidov, ki ju predstavljata fruktoza in glukoza, disaharidov (saharoza, turanoza, palatinoza, maltoza in gentibioza z melibiozo) in trisaharidov (melicitoza, erloza, rafinoza, maltotriaza, panoza in izomaltotriaza). Nektarne vrste medu so vsebovale več monosaharidov kot med iz mane. Največjo povprečno vsebnost smo izračunali v medu oljne ogršice (69,9 g/100 g), najmanjšo pa v hojevem medu (58,6 g/100 g). Vsebnost disaharidov je bila podobna v nektarnih in maninih vrstah medu. Najmanj disaharidov je bilo v medu oljne ogršice (6,73 g/100 g), največ pa v rešeljikovem medu (11,9 g/100 g). Pri vsebnosti trisaharidov so med nektarnimi in maninimi vrstami medu opazne razlike. V medu iz nektarja je bilo trisaharidov manj kot 2 g/100 g, izjema je bil le lipov med (2,52 g/100 g). V vrstah medu iz mane je bilo trisaharidov povprečno več kot 7 g/100 g, medtem ko jih je kostanjev med vseboval 4,55 g/100 g.

Na osnovi količin treh skupin saharidov smo izračunali razmerja med njimi. Razmerje med vsebnostjo mono- in disaharidov je imelo vrednosti od 5,53 v rešeljikovem medu do 10,4 v medu oljne ogršice. Razlike med vrednostmi razmerja med vsebnostjo mono- in trisaharidov so bile še izrazitejše. Razmerje med skupinama saharidov v akacijevem medu je bilo 10-krat večje od razmerja v hojevem ali smrekovem medu. Glede na vrednosti razmerja Mono/Tri si vrste medu sledijo v naslednjem zaporedju: akacijev > ajdov > rešeljikov > m. divje ešnje > m. oljne ogršice > cvetlični > lipov > kostanjev > gozdni > smrekov > hojev. Z izračunom razmerja med vsebnostjo di- in trisaharidov smo ugotovili, da je bilo v desetih vrstah medu disaharidov več kot trisaharidov, razen v smrekovem medu, ki je povprečno vseboval nekoliko več trisaharidov kot disaharidov ( $Di/Tri = 0,95$ ). Največjo vrednost razmerja smo izračunali za akacijev med, in sicer 9,32. Poleg razmerij med posameznimi skupinami smo izračunali še razmerje med vsebnostjo disaharidov in vseh saharidov ter med vsebnostjo trisaharidov in vseh saharidov. Iz razmerij lahko ugotovimo, da so disaharidi predstavljali od 9 (med oljne ogršice) do 15 % (rešeljikov

med) vsote vseh saharidov v medu. Delež trisaharidov v količini določeni določeni ogljikovih hidratov je bil od 1 % v akacijevem medu do 12 % v hojevem medu.

**Preglednica 20. Povprečne vrednosti izraženih parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v akacijevem, cvetličnem, lipovem, ajdovem medu in medu oljne ogrščice**

**Table 20. Average values of derived parameters linked to carbohydrate content in acacia, multifloral, linden, rape and buckwheat honey**

Izražen parameter		Kruskal-Wallisov test ( <i>p</i> )*	Vrsta medu				
			akacijev	cvetlični	lipov	m. oljne ogrščice	ajdov
Vrsta OH	Mono	0,000	68,3	66,1	68,1	69,9	66,6
	Di	0,000	8,70	11,1	7,78	6,73	10,5
	Tri	0,000	0,94	1,92	2,52	1,79	1,46
Razmerja med skupinami OH	Mono/Di	0,000	8,19	6,04	8,83	10,4	6,34
	Mono/Tri	0,000	73,5	34,7	27,2	39,2	45,8
	Di/Tri	0,000	9,32	5,85	3,13	3,78	7,23
	Di/OH	0,000	0,11	0,14	0,10	0,09	0,13
	Tri/OH	0,000	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02
Sladkor /OH	Palat/Di	0,000	0,07	0,13	0,20	0,13	0,12
	Malt/Di	0,000	0,48	0,53	0,38	0,50	0,44
	Malto3/Tri	0,000	0,16 <sup>e,f</sup>	0,14 <sup>d,e,f</sup>	0,09 <sup>b,c</sup>	0,13 <sup>c,d</sup>	0,00 <sup>a</sup>
Razmerja med posameznimi sladkorji	F/G	0,000	1,51	1,24	1,09	0,93	1,18
	Sah/Malt	0,002	0,43	0,34	0,14	0,13	0,71
	Sah/Tur	0,001	0,96	1,06	0,15	0,24	2,53
	Gent/Malt	0,000	0,04	0,03	0,08	0,06	0,04
	Palat/Malt	0,000	0,15	0,24	0,56	0,27	0,27
	Malto3/Tur	0,000	0,08	0,16	0,09	0,13	0,00
	Malto3/Melic	0,000	2,99	1,29	0,27	0,54	0,00
	Melic/Erloz	0,000	0,22	0,31	1,23	2,34	0,57

a,b,c,d – ANOVA: vrste medu se v parametru (povprečna vrednost), označenem z enakim nadpisanim indeksom statistično značilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statistično značilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je označena  $p < 0,05$

Pri pregledu literature smo opazili, da so nekateri avtorji dali večji pomen posameznim ogljikovim hidratom in razmerjem med njimi. Po tem zgledu smo izražali razmerja med vsebnostjo palatinoze, maltoze oziroma maltotrioze in skupno količino analiziranih ogljikovih hidratov in v zadnjem delu še razmerja med izbranimi saharidi, ki so predstavljena v tretjem sklopu preglednic 20 in 21. Palatinoza je predstavljala od 7 (akacijev med) do 20 % (lipov med) skupne količine disaharidov. Delež maltoze med disaharidi je bil bistveno večji, njegov obseg je znašal od 36 % v smrekovem medu do 65 % v medu divje češnje. Vrste medu so se razlikovale tudi v razmerju vsebnosti maltotrioze in trisaharidov, z Duncanovim testom smo jih uspešno razdelili na sedem skupin. Ker v ajdovem medu maltotrioze nismo določili, predstavlja ta vrsta svojo skupino. V drugo skupino z najmanjšim še merljivim deležem maltotrioze med trisaharidi spada

hojev med (indeks b) in poleg njega lipov, ki si z gozdnim, rešeljikovim medom in medom oljne ogršice deli tretjo skupino (indeks c). Od ostalih vrst se zna ilno razlikuje kostanjev med z najvišjim deležem maltotrioze med trisaharidi, medtem ko se smrekov med v tem parametru razlikuje od vrst medu, ki v indeksu nimajo rke f.

**Preglednica 21. Povprečne vrednosti izra unanih parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v kostanjevem, gozdnem, hojevem, smrekovem, rešeljikovem medu in medu divje ešnje**

**Table 21. Average values of derived parameters linked to carbohydrate content in chestnut, forest, fir, spruce, wild cherry and *Prunus mahaleb* honey**

Izra unani parameter		Kruskal-Wallisov test ( <i>p</i> )*	Vrsta medu					
			kostanjev	gozdni	hojev	smrekov	m. divje ešnje	rešeljikov
Vrsta OH	Mono	0,000	63,9	62,5	58,6	63,7	66,3	65,7
	Di	0,000	11,4	10,7	11,4	8,28	11,5	11,9
	Tri	0,000	4,55	7,24	9,16	8,73	1,64	1,56
Razmerja med skupinami OH	Mono/Di	0,000	5,64	5,82	5,30	7,71	5,76	5,53
	Mono/Tri	0,000	14,4	8,65	6,40	7,33	40,5	42,6
	Di/Tri	0,000	2,57	1,49	1,26	0,95	7,04	7,74
	Di/OH	0,000	0,14	0,14	0,14	0,10	0,15	0,15
	Tri/OH	0,000	0,06	0,09	0,12	0,11	0,02	0,02
Sladkor /OH	Palat/Di	0,000	0,17	0,17	0,14	0,15	0,14	0,13
	Malt/Di	0,000	0,51	0,45	0,47	0,36	0,65	0,62
	Malto3/Tri	0,000	0,24 <sup>g</sup>	0,12 <sup>c,d</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,17 <sup>f</sup>	0,13 <sup>d,e</sup>	0,13 <sup>c,d</sup>
Razmerja med posameznimi sladkorji	F/G	0,000	1,42	1,14	1,05	1,24	1,28	1,33
	Sah/Malt	0,002	0,08	0,30	0,31	0,43	0,03	0,12
	Sah/Tur	0,001	0,17	1,16	1,22	0,81	0,09	0,57
	Gent/Malt	0,000	0,05	0,29	0,25	0,40	0,09	0,08
	Palat/Malt	0,000	0,33	0,37	0,31	0,41	0,22	0,21
	Malto3/Tur	0,000	0,38	0,66	0,40	0,95	0,13	0,13
	Malto3/Melic	0,000	0,42	0,61	0,20	0,43	0,42	0,45
	Melic/Erloz	0,000	15,4	0,55	1,44	2,04	2,18	1,70

a,b,c,d – ANOVA: vrste medu se v parametru (povprečna vrednost), označenem z enakim nadpisanim indeksom statistično značilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statistično značilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je označena  $p < 0,05$

Za večino vrst medu je značilno, da vsebujejo več fruktoze kot glukoze, zato imajo vrednost F/G večjo od 1. Tako smo ugotovili za deset vrst medu, med oljne ogršice pa je imel  $F/G < 1$ . Razmerje med vsebnostjo saharoze in maltoze je bilo v prid slednje, saj so bile vrednosti pri vseh vrstah medu manjše od 1. Območje vrednosti je bilo od 0,03 (med divje ešnje) do 0,71 (ajdov med). Ajdov, cvetlični, gozdni in hojev med so vsebovali več saharoze kot turanoze, pri ostalih vrstah medu pa so bili deleži obratni in zato vrednosti Sah/Tur manjše od 1. Razmerje med vsebnostjo gentibioze z melibiozo in maltoze so bila pri vseh vrstah medu manjša od 1, vendar pri gozdnem, hojevem in smrekovem medu

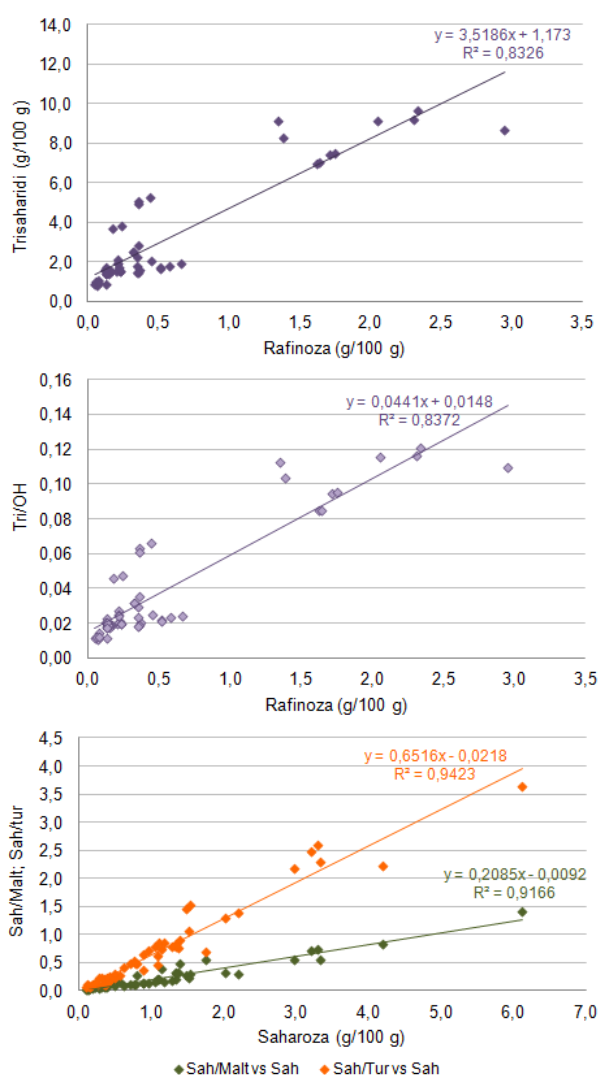


opazno višja od vrednosti ostalih vrst medu, ki izvirajo večinoma ali povsem iz nektarja. Razmerje med maltotrioza in turanoza je pokazalo, da je bilo trisaharida ob utno večinoma v manjnih vrstah medu in v kostonjevu medu. Razmerje med vsebnostjo maltotrioze in melicitoze je imelo pri akacijevem in cvetli nem medu vrednost večjo od 1, v ostalih vrstah medu pa je bil delež melicitoze višji in so bile izražene vrednosti razmerja manjše od 1. Z razmerjem med vsebnostjo melicitoze in erloze smo ugotovili, da je za akacijev, cvetli ni, ajdov in gozdni med značilno, da vsebujejo več erloze kot melicitoze, za ostale vrste medu pa velja ravno obratno. Območje vrednosti Melic/Erloz je bilo obsežno, od 0,22 (akacijev med) do 15,4 (kostonjev med).

#### 4.2.3 Zveze med analiziranimi in izraženi parametri ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu

V vzorcih enajstih vrst pristnega medu smo s kromatografsko metodo HILIC določili trinajst saharidov. Iz analitskih vrednosti smo izražali devetnajst parametrov, povezanih z vsebnostjo teh saharidov. V nadaljevanju smo proučevali zveze med skupno tridesetimi parametri. Za vsak par parametrov smo izražali Pearsonov korelacijski koeficient in rezultate predstavili v preglednici Priloge F. Zaradi obilice podatkov smo se osredotočili na močno ( $r = 0,70-0,89$ ) in zelo močno ( $r > 0,90$ ) zveze s stopnjo značilnosti  $p < 0,01$ . Le-te so obstajale med vsemi obravnavanimi parametri, z izjemo razmerja maltotrioza/melicitoza in melicitoza/erloza. Ta dva parametra nista bila močno ali zelo močno povezana z nobenim od ostalih parametrov niti med seboj.

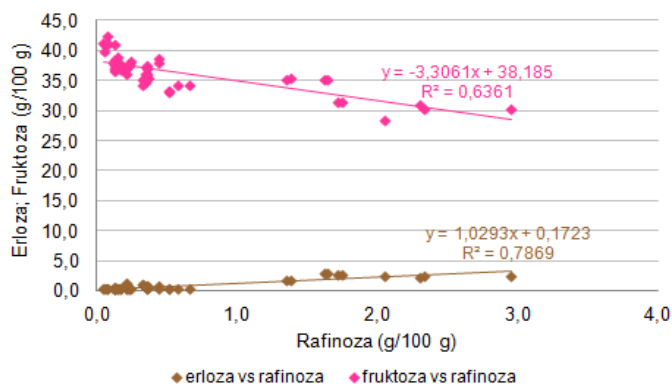
Zelo močne zveze smo ugotovili med vsebnostjo rafinoze in količino trisaharidov ( $r = 0,912$ ), med rafinozo in razmerjem Tri/OH ( $r = 0,911$ ) ter med vsebnostjo saharoze in razmerjem Sah/Malt ( $r = 0,957$ ) oziroma Sah/Tur ( $r = 0,971$ ). Vse štiri zveze so odvisne in linearne, kot je razvidno na sliki 11. Opisujejo jih ena ali dve regresijski premici z visokimi koeficienti determinacije.



Slika 11. Regresijske premice zveze med rafinozo in trisaharidi ter Tri/OH in saharozo in razmerjem Sah/Malt ter Sah/Tur v medu slovenskih ebelarjev

Figure 11. Regression between raffinose and trisaccharides, and Tri/OH, and sucrose and Sah/Malt and Sah/Tur ratio in Slovenian honey

Mo ne so bile tudi zveze med nekaterimi saharidi, na primer med vsebnostjo fruktoze in rafinoze ( $r = 0,798$ ) ter med vsebnostjo erloze in rafinoze ( $r = 0,887$ ). Relaciji sta neodvisni, saj vsebnost enega saharida nima neposrednega vpliva na vsebnost drugega. Kot je prikazano na sliki 12, je bila vsebnost erloze v analiziranih vzorcih pristnega medu premosorazmerna vsebnosti rafinoze, nasprotno pa so vzorci, ki so vsebovali ve fruktoze, imeli manj rafinoze.

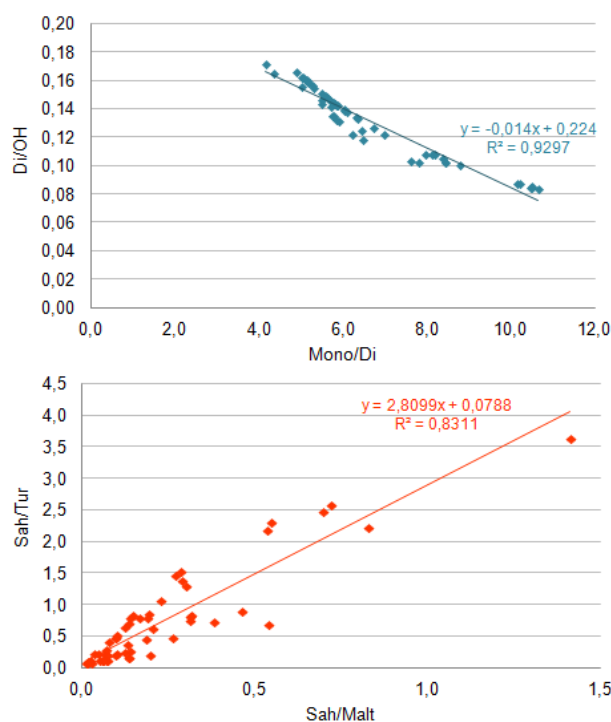


Slika 12. Korelacija med vsebnostjo erloze in rafinoze ter med vsebnostjo fruktoze in rafinoze v vzorcih pristnega medu slovenskih ebelarjev

Figure 12. Correlation between erlose and raffinose content, and fructose and raffinose content in samples of authentic honey from Slovenian beekeepers

Poleg prikazanih smo ugotovili še neodvisne zveze z mo nimi korelacijskimi koeficienti med gentibiozo z maltozo in: erlozo ( $r = 0,797$ ), rafinozo ( $r = 0,784$ ) in panozo ( $r = 0,817$ ).

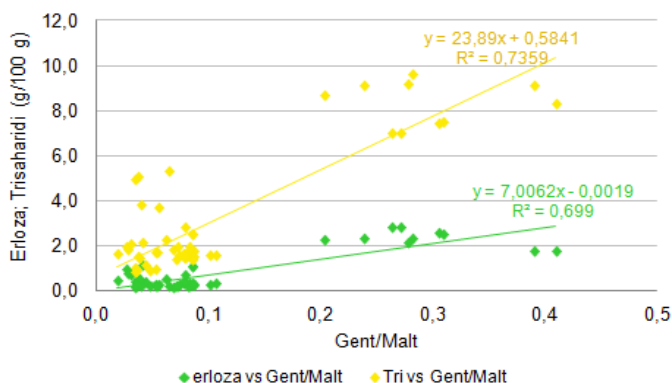
Korelacije so obstajale tudi med izra unanimi parametri, povezanimi z vsebnostjo ogljikovih hidratov v medu. Na sliki 13 sta predstavljeni dve zelo mo ni korelaciji, zveza med razmerjema Mono/Di in Di/OH ( $r = 0,967$ ) je padajo a, zveza med razmerjema disaharidov Sah/Malt in Sah/Tur ( $r = 0,911$ ) pa naraš ajo a. Med samimi tremi disaharidi oziroma njihovimi vsebnostmi je bila le šibka povezanost ( $r < 0,39$ ).



Slika 13. Korelacija med razmerjema Mono/Di in Di/OH ter Sah/Malt in Sah/Tur

Figure 13. Correlation between Mono/Di and Di/OH ratio, and Sah/Malt and Sah/Tur ratio

Na sliki 14 sta prikazani še dve korelaciji, pri katerih smo izračunali močno povezanost med vsebnostjo erloze in razmerjem gentibioza/maltoza ( $r = 0,834$ ) in med vsebnostjo trisaharidov in razmerjem gentibioza/maltoza ( $r = 0,858$ ). Obe zvezi sta naraščajoči.



Slika 14. Korelacija med vsebnostjo erloze in razmerjem Gent/Malt ter med vsebnostjo trisaharidov in razmerjem Gent/Malt v vzorcih pristnega medu slovenskih čebelarjev

Figure 14. Correlation between erlose content and Gent/Malt ratio, and trisaccharides content and Gent/Malt ratio in authentic honey samples from Slovenian beekeepers

#### 4.2.4 Vsebnost ogljikovih hidratov v namerno potvorjenih vzorcih medu

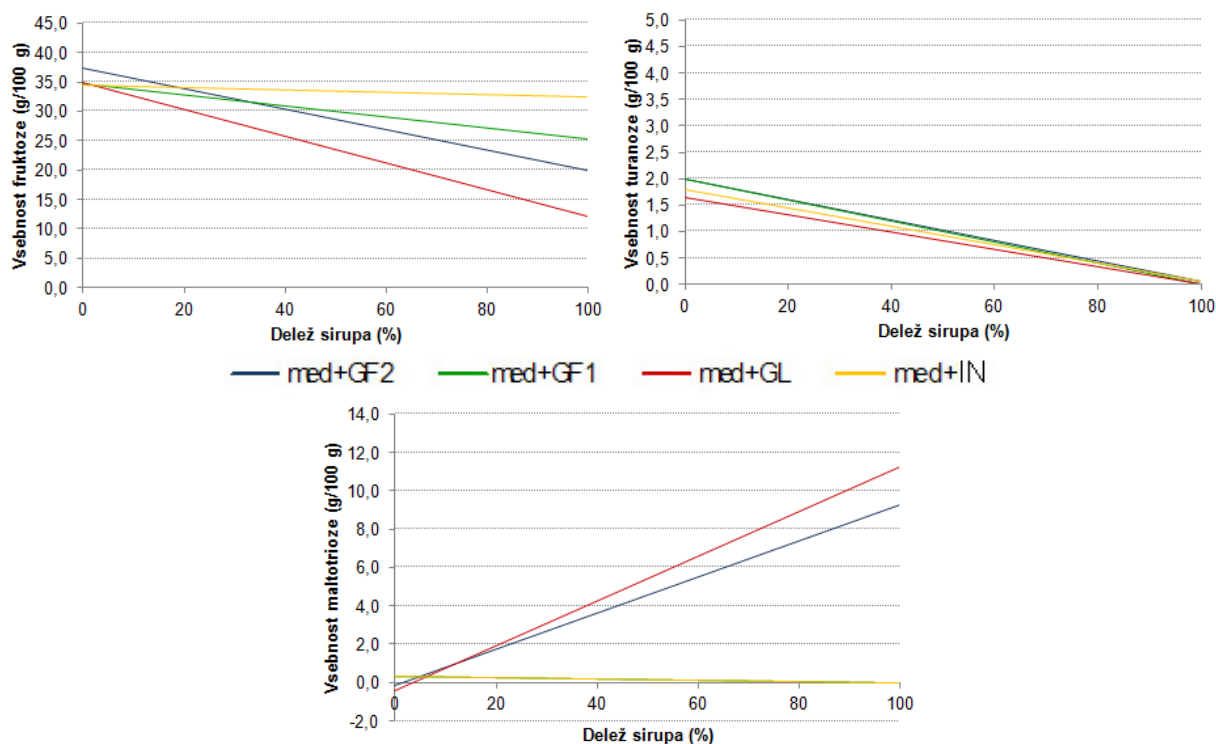
S kromatografsko metodo HILIC smo vsebnost trinajstih mono-, di- in trisaharidov določili v skupno 64 vzorcih cvetli nega, gozdnega, akacijevega, lipovega in kostanjevega medu, ki smo jim namerno dodali različne količine fruktozno-glukoznega (GF1 in GF2), glukoznega (GL) ali invertnega (IN) sirupa. Vsebnost ogljikovih hidratov smo določili tudi v samih sirupih.

Preglednica 22. Povprečne vsebnosti mono-, di- in trisaharidov v štirih sirupih, uporabljenih pri pripravi namerno potvorjenih vzorcev medu

Table 22. Average content of mono-, di- and trisaccharides in four types of syrups used in preparation of deliberately adulterated honey samples

Vrsta ogljikovega hidrata	Enota	Oznaka sirupa			
		GF1	GF2	GL	IN
fruktoza	g/100 g	25,6	19,8	12,2	32,8
glukoza	g/100 g	34,9	31,1	20,9	42,1
saharoza	g/100 g	1,12	1,12	2,56	15,8
turanoza	g/100 g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
palatinoza	g/100 g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
maltoza	g/100 g	9,32	16,6	42,2	< LOQ
gentibioza z melibiozo	g/100 g	< LOQ	0,01	< LOQ	< LOQ
melcitoza	g/100 g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
erloza	g/100 g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
rafinoza	g/100 g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
maltotrioza	g/100 g	< LOQ	9,49	11,7	< LOQ
panoza	g/100 g	< LOQ	0,44	< LOQ	< LOQ
izomaltotrioza	g/100 g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Kot je predstavljeno v preglednici 22, so sirupi vsebovali največ glukoze, to je od 20,9 (glukozni) do 42,1 g/100 g (invertni sirup). Vsebnost fruktoze je bila manjša in je znašala od 12,2 (glukozni) do 32,8 g/100 g (invertni sirup). Poleg naštetih monosaharidov so sirupi vsebovali tudi saharozo, največ invertni sirup. V obeh fruktozno-glukoznih sirupih in v glukoznem smo določili še maltozo in v GF2 in GL tudi maltotriozo. Sirup GF2 je vseboval še manjši delež panoze. Ostalih di- in trisaharidov v sirupih nismo določili oziroma je bila njihova vsebnost pod mejo kvantifikacije (< LOQ).

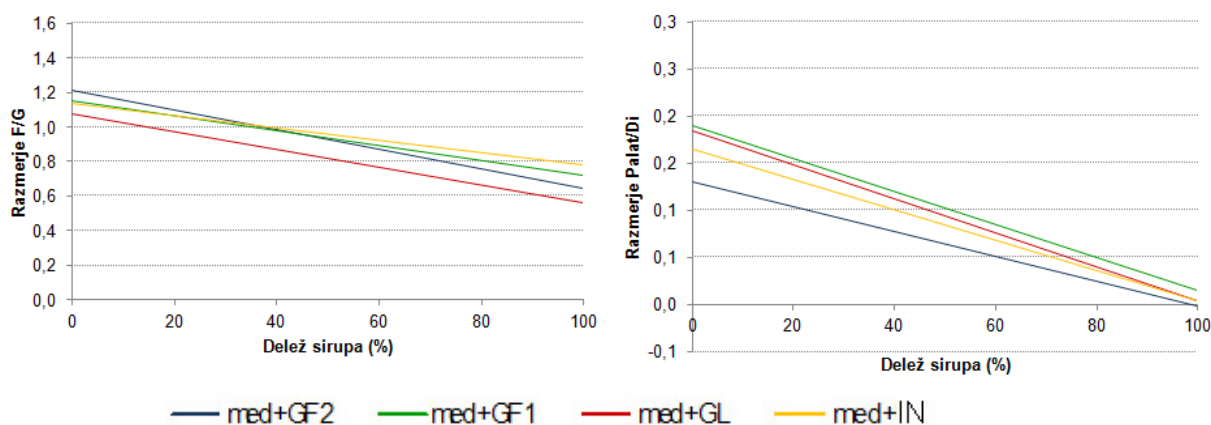


Slika 15. Vpliv deleža in vrste sirupa na vsebnost fruktoze, turanoze in maltotrioze v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu (akacijevga, lipovega, kostanjevega, cvetli nega in gozdnega)

Figure 15. Effect of syrup amount and type on fructose, turanose and maltotriose content in deliberately adulterated samples of five honey types (acacia, linden, chestnut, multifloral and forest)

Možna povezanost med deležem dodanega sirupa, vrsto sirupa in vsebnostjo posameznih ogljikovih hidratov smo najprej proučili z izračunom Pearsonovega korelacijskega koeficienta ( $r$ ). Ugotovili smo, da ni povezanost pri značilnosti  $p < 0,01$  med količino dodanega sirupa in vsebnostjo fruktoze ( $r = 0,800$ ), turanoze ( $r = 0,773$ ) in maltotrioze ( $r = 0,709$ ). Poleg tega je bil delež sirupa v medu močno povezan tudi z razmerjem Palat/Di ( $r = 0,721$ ) in F/G ( $r = 0,836$ ). V vseh primerih gre za linearno regresijo; zveze so v grafih prikazane na slikah 15 in 16.

Slika 15 prikazuje regresijske premice linearnega modela, s katerimi smo opisali odvisnost vsebnosti fruktoze, turanoze in maltotrioze v vzorcih namerno potvorjenega medu petih vrst, od deleža dodanega sirupa GF2, GF1, GL ali IN. V primeru fruktoze in turanoze imajo vse premice negativni smernostni koeficient. Premici, ki ponazarjata zvezo med maltotriozo in sirupoma GF1 in IN, imata nizek in prav tako negativen smernostni koeficient, medtem ko je zveza med maltotriozo in sirupoma GF2 in GL naraščajoča.



**Slika 16.** Vpliv deleža in vrste sirupa na razmerje F/G in Palat/Di v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu

**Figure 16.** Effect of syrup amount and type on F/G and Palat/DI ratio in deliberately adulterated samples of five honey types

Na sliki 16 so prikazane regresijske premice linearnega modela, s katerim smo opisali zvezo med razmerjem fruktoze in glukoze (F/G) oziroma med razmerjem palatinoze in disaharidov (Palat/Di) v vzorcih potvorjenega medu petih vrst ter deležem dodanega sirupa GF2, GF1, GL oziroma IN. Vse predstavljene zveze so padajo e.

V preglednici 23 so zbrane ena be regresijskih premic in koeficienti determinacije za zveze med sedmimi ogljikovimi hidrati in dvema razmerjema izbranih OH, ki smo jih dolo ali v pristnih in namerno potvorjenih vzorcih medu, ter dodanimi sirupi GF1, GF2, GL in IN. Determinacijski koeficienti predstavljenih ena b so visoki, razen v nekaterih primerih zvez: invertni sirup in vsebnost fruktoze in maltotrioze, sirup GF1 in vsebnost turanoze in maltotrioze, ter sirup GF2 in razmerje Palat/Di. Zveze med ostalimi saharidi, ki so bili prisotni v sirupih, in deleži sirupa so bile statisti no nezna ilne (glukoza), šibke (saharoza in panoza,  $r < 0,39$ ) oziroma zmerne (maltoza,  $r = 0,575$ ). Tudi ena be linearne regresije teh zvez in determinacijski koeficienti so podani v preglednici 23.

**Preglednica 23. Ena ba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in vsebnostjo fruktoze, turanoze, maltotrioze ter razmerjem Palat/Di in F/G v namerno potvorjenih vzorcih petih vrst medu**

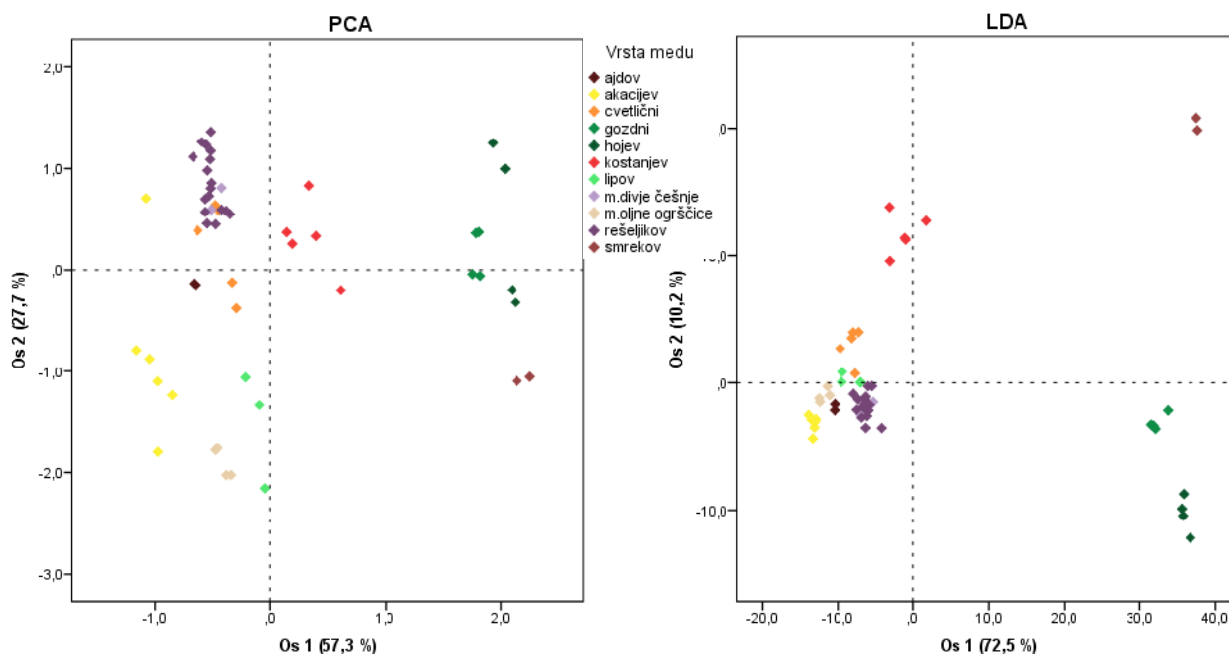
**Table 23. Linear regression equation and determination coefficient for relation between added syrup type and amount and content of fructose, turanose, maltotriose, and Palat/Di and F/G ratio in deliberately adulterated samples of five honey types**

Fizikalno-kemijski parameter	Vrsta sirupa	Ena ba linearne regresije	$r^2$
vsebnost fruktoze (g/100 g)	GF1	$y = -0,0957x + 34,773$	0,865
	GF2	$y = -0,174x + 37,301$	0,832
	GL	$y = -0,2276x + 34,85$	0,963
	IN	$y = -0,0196x + 34,439$	0,098
vsebnost turanoze (g/100 g)	GF1	$y = -0,0199x + 2,0014$	0,354
	GF2	$y = -0,0194x + 1,9885$	0,764
	GL	$y = -0,0164x + 1,6522$	0,789
	IN	$y = -0,0175x + 1,7951$	0,813
vsebnost maltotrioze (g/100 g)	GF1	$y = -0,0032x + 0,3114$	0,262
	GF2	$y = 0,0942x - 0,1806$	0,972
	GL	$y = 0,117x - 0,4265$	0,952
	IN	$y = -0,0037x + 0,3347$	0,266
razmerje Palat/Di	GF1	$y = -0,0017x + 0,1903$	0,671
	GF2	$y = -0,0013x + 0,1299$	0,362
	GL	$y = -0,0018x + 0,1848$	0,861
	IN	$y = -0,0016x + 0,1653$	0,895
razmerje F/G	GF1	$y = -0,0043x + 1,152$	0,914
	GF2	$y = -0,0057x + 1,2144$	0,665
	GL	$y = -0,0051x + 1,0774$	0,862
	IN	$y = -0,0036x + 1,1355$	0,919
vsebnost glukoze (g/100 g)	GF1	$y = 0,0479x + 30,113$	0,622
	GF2	$y = 0,0009x + 30,921$	0,000
	GL	$y = -0,1123x + 32,809$	0,764
	IN	$y = 0,1165x + 30,1$	0,845
vsebnost saharoze (g/100 g)	GF1	$y = 0,0061x + 0,4693$	0,176
	GF2	$y = 0,0048x + 0,6972$	0,100
	GL	$y = 0,0162x + 0,8842$	0,500
	IN	$y = 0,141x + 1,9708$	0,738
vsebnost maltoze (g/100 g)	GF1	$y = 0,0301x + 6,3686$	0,540
	GF2	$y = 0,1135x + 5,4417$	0,874
	GL	$y = 0,3807x + 3,434$	0,980
	IN	$y = -0,0559x + 5,5887$	0,871
vsebnost panoze (g/100 g)	GF1	$y = -0,0036x + 0,3977$	0,333
	GF2	$y = 0,002x + 0,2899$	0,217
	GL	$y = -0,0035x + 0,3472$	0,572
	IN	$y = -0,0034x + 0,337$	0,502

Legenda: x – vrednost fizikalno-kemijskega parametra; y – koli ina dodanega sirupa (v %);  $r^2$  – koeficient determinacije regresijske ena ba

#### 4.2.5 Rezultati multivariatne analize analitskih in izraževalnih parametrov ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu

Vrednosti vseh parametrov, ki smo jih dobili pri analizi ogljikovih hidratov s kromatografsko metodo, in tistih, ki smo jih izraževali iz teh vrednosti, smo obravnavali z metodo analize glavnih osi in z linearno diskriminantno analizo. S prvo metodo smo določili ali najpomembnejše parametre ogljikovih hidratov, ki največ prispevajo k razlikovanju med enajstimi vrstami slovenskega medu: maltoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, vsota disaharidov, vsota trisaharidov, razmerja Mono/Di, Mono/Tri, Di/Tri, Maltotri/Tur, Di/OH, Tri/OH in Gent/Malt. Z njimi pojasnimo 85 % variabilnosti med obravnavanimi vrstami medu, kot je to prikazano na levem grafu slike 17.



Slika 17. Porazdelitev vzorcev različnih vrst medu po obravnavi parametrov ogljikovih hidratov z analizo glavnih osi (PCA) in z linearno diskriminantno analizo (LDA)

Figure 17. Distribution of honey samples of different types after processing of carbohydrates' parameters with principal component (PCA) and linear discriminant (LDA) analysis

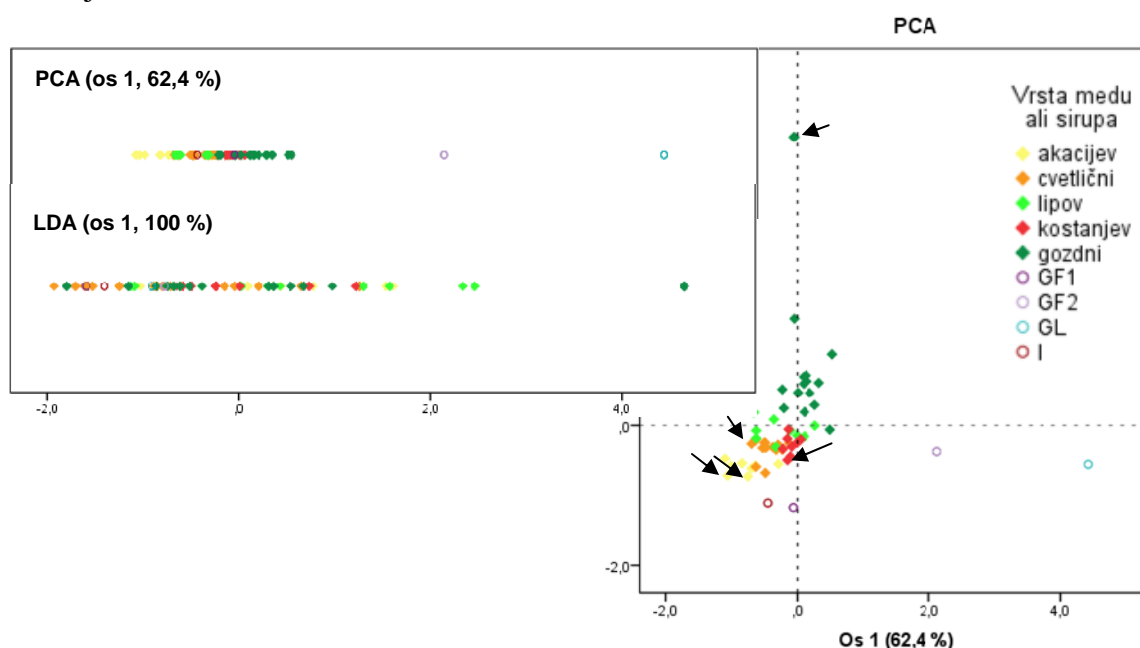
Vrste medu iz nektarja zasedajo leva kvadranta, kostanjev med srednji del, vrste medu iz mane – gozdni, hojev in smrekov med – pa desna kvadranta in se na osnovi izbranih parametrov jasno ločijo od ostalih vrst. Kot lahko še opazimo, medu divje češnje in rešeljike ne moremo ločiti na osnovi parametrov ogljikovih hidratov.

Ko smo izbrane parametre obravnavali z LDA, smo z njimi pojasnili, podobno, 82,7 % variabilnosti med vrstami medu. Na desnem grafu slike 17 se jasno ločijo hojev in gozdni med v spodnjem ter smrekov v zgornjem desnem kvadrantu od kostanjevega medu (sredina) in ostalih vrst. Vzorci slednjih so tesneje skupaj, nekoliko manj razpršeni kot pri PCA, jasno se ločijo vzorci akacijevga medu. LDA uporabljamo za razvrščanje vzorcev in ugotovili smo, da nam izbrani parametri omogočajo v povprečju 92,7 % pravilno klasifikacijo vzorcev glede na vrsto medu. Najmanj uspešna je bila klasifikacija vzorcev

rešeljikovega medu, saj jih je bilo na osnovi štirinajstih izbranih parametrov 23,5 % uvrš enih kot med divje ešnje (preglednica v prilogi G).

#### 4.2.6 Rezultati multivariatne analize analitskih in izra unanih parametrov ogljikovih hidratov v vzorcih potvorjenega medu

Na podoben na in, kot smo obravnavali parametre ogljikovih hidratov in njihove vrednosti v vzorcih pristnega medu, smo z metodama multivariatne analize analizirali tudi vrednosti v vzorcih namerno potvorjenega medu. S PCA smo izbrali vplivne parametre prvih dveh osi, s katerimi pojasnimo 88,2 % variabilnosti med vrstami: fruktozo, maltozo, gentibiozo z melibiozo, rafinozo, maltotrioza, vsoto monosaharidov, disaharidov in trisaharidov ter razmerja Mono/DI, Di/OH, Tri/OH in Gent/Malt.



Slika 18. Porazdelitev vzorcev potvorjenega medu po obravnavi parametrov ogljikovih hidratov z analizo glavnih osi (PCA) in linearno diskriminantno analizo (LDA)

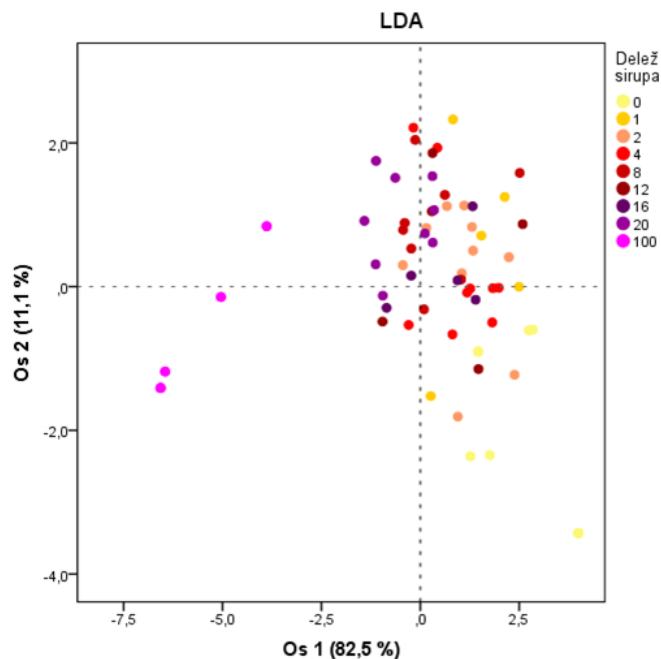
Figure 18. Distribution of adulterated honey samples after processing of carbohydrates' parameters with principal component (PCA) and linear discriminant (LDA) analysis

Kot je predstavljeno na desnem grafu slike 18, so se sirupi in vzorci medu z različnim deležem sirupa, ločijo od ostalih vrst medu in sirupov. Sirupa GL in GF2 sta se od ostalih vrst medu in sirupov ločila predvsem na osnovi vsebnosti maltoze in maltotrioze, disaharidov in razmerja Di/OH. Standardni (pristni) vzorci medu so uvršeni najbolj zgoraj in levo v svoji vrsti. Na sliki smo jih označili s puščico.

Z LDA smo na osnovi izbranih parametrov dosegli popolno pojasnitev variabilnosti na eni sami osi. Porazdelitev vzorcev je prikazana na levem spodnjem grafu slike 18, za primerjavo pa tudi porazdelitev na 1. osi pri PCA. Pri slednjih so vzorci zgoščeni, jasno se ločijo le sirupa GF2 in GL, v desnem delu grafa. Vzorca pristnega medu se ne ločijo jasno od potvorjenih. Na prikazu porazdelitve vzorcev po obravnavi z LDA so pristni vzorci vsake vrste uvršeni v desnem delu premice, pri čemer se od ostalih vzorcev jasno ločijo pristni gozdni in lipov med. V levem delu so uvršeni sirupi in vzorci z višjim deležem



sirupov. Z LDA smo ugotovili, da nam izbrani parametri ogljikovih hidratov omogoajo 94,4 % pravilno klasifikacijo vzorcev na pristne in potvorjene. Medtem ko so bili vsi vzorci pristnega medu uvršeni kot pristni, je bilo v to skupino uvrščenih še 6,6 % vzorcev potvorjenega medu.



Slika 19. Porazdelitev potvorjenih vzorcev medu glede na količino dodanega sirupa

Figure 19. Distribution of adulterated honey samples regarding the amount of added syrup

Z drugo analizo LDA smo ugotovili, da z dvanajstimi izbranimi parametri pojasnimo 93,7 % variabilnosti med vzorci medu glede na količino dodanega sirupa (prikazano na sliki 19). Pri tej analizi nismo upoštevali botanične vrste vzorcev medu, marveč le, ali so bili pristni, oziroma kolikšen delež sirupa smo jim vmešali. Prav tako sirupov nismo ločili po vrstah. Uspešnost klasifikacije vzorcev v skupine glede na delež prisotnega sirupa je bila le 50,7 %. Med drugim je bilo med pristne uvrščenih 10 % vzorcev z 2 % deležem sirupa in kar 20 % vzorcev z 12 % deležem sirupa (preglednica v prilogi H).

### 4.3 REZULTATI ANALIZE IZOTOPSKIH PARAMETROV

Izotopske parametre,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , smo določili ali v 192 vzorcih pristnega, 78 vzorcih namerno potvorjenega in 25 vzorcih trgovskega medu ter v 4 vzorcih sirupa. V preglednicah, ki so predstavljene v nadaljevanju, so zbrane povprečne vrednosti parametrov izmerjenih v različnih vrstah medu.

#### 4.3.1 Rezultati analize izotopskih parametrov ogljika in dušika v vzorcih pristnega medu

V vzorcih medu dvanajstih vrst smo določili razmerje izotopov  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v medu in razmerje  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  in  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  v proteinih, izoliranih iz medu. Iz analitskih vrednosti smo izračunali razliko med  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  in  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  ( $\delta^{13}\text{C} = ^{13}\text{C}_{\text{med}} - ^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ). Opisne statistike naštetih

parametrov, glede na vrsto medu, so predstavljene v preglednici 24. Ker smo pri nekaterih vzorcih oziroma vrstah medu pri izolaciji proteinov dobili premalo izolata, vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$  nismo mogli dolo iti.

**Preglednica 24. Opisne statistike izotopskih parametrov  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo enih v vzorcih pristnega medu**

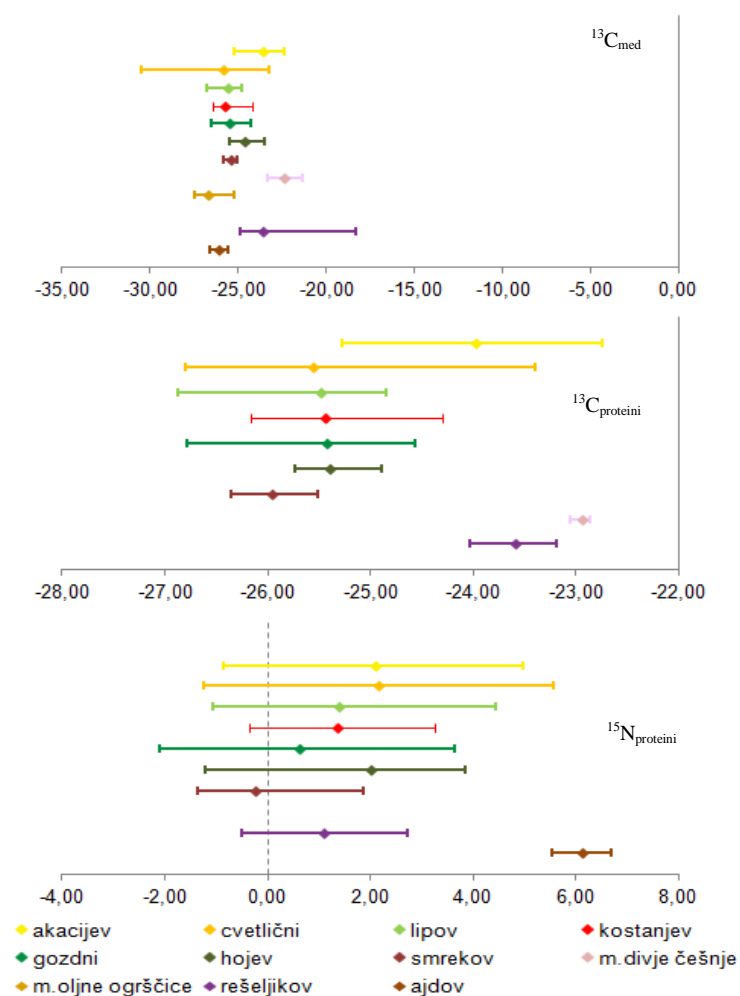
**Table 24. Descriptive statistics of isotopic parameters  $^{13}\text{C}_{\text{honey}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{protein}}$  and  $^{15}\text{N}_{\text{protein}}$ , determined in authentic honey samples**

Vrsta medu	Statisti ni parameter	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)
akacijev (n = 26)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-23,6 ± 0,9	-24,0 ± 0,8	2,11 ± 1,61
	$x_{\text{min}}$	-25,2	-25,3	-0,85
	$x_{\text{max}}$	-22,4	-22,7	4,97
cvetli ni (n = 39)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-25,8 ± 1,2	-25,6 ± 0,8	2,15 ± 1,80
	$x_{\text{min}}$	-30,5	-26,8	-1,24
	$x_{\text{max}}$	-23,3	-23,4	5,57
lipov (n = 20)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-25,6 ± 0,5	-25,5 ± 0,6	1,38 ± 1,58
	$x_{\text{min}}$	-26,8	-26,9	-1,06
	$x_{\text{max}}$	-24,8	-24,8	4,44
kostanjev (n = 29)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-25,7 ± 0,4	-25,4 ± 0,4	1,35 ± 1,03
	$x_{\text{min}}$	-26,5	-26,2	-0,37
	$x_{\text{max}}$	-24,2	-24,3	3,26
gozdni (n = 37)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-25,5 ± 0,6	-25,4 ± 0,5	0,61 ± 1,53
	$x_{\text{min}}$	-26,5	-26,8	-2,09
	$x_{\text{max}}$	-24,3	-24,6	3,64
hojev (n = 8)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-24,7 ± 0,6	-25,4 ± 0,4	2,00 ± 1,48
	$x_{\text{min}}$	-25,5	-25,7	-1,23
	$x_{\text{max}}$	-23,5	-24,9	3,84
smrekov (n = 6)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-25,4 ± 0,3	-26,0 ± 0,4	-0,24 ± 1,43
	$x_{\text{min}}$	-25,9	-26,4	-1,35
	$x_{\text{max}}$	-25,1	-25,5	1,86
m. divje ešnje (n = 2)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-22,4 ± 0,1	-22,9 ± 0,1	
	$x_{\text{min}}$	-22,5	-23,1	
	$x_{\text{max}}$	-22,3	-22,9	
m. oljne ogrš ice (n = 7)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-26,7 ± 0,7		
	$x_{\text{min}}$	-27,5		
	$x_{\text{max}}$	-25,2		
rešeljikov (n = 16)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-24,2 ± 0,5	-24,1 ± 0,7	0,39 ± 1,27
	$x_{\text{min}}$	-24,9	-24,9	-0,51
	$x_{\text{max}}$	-23,3	-22,5	1,29
ajdov (n = 2)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-26,1 ± 0,7	-25,8 ± 0,9	6,11 ± 0,81
	$x_{\text{min}}$	-26,6	-26,4	5,54
	$x_{\text{max}}$	-25,6	-25,2	6,68
Kruskal-W. test (p)*		0,000	0,000	0,001

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena p < 0,05

Obmo je povpre nih vrednosti razmerja izotopov ogljika v medu,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ , je znašalo od -26,7 (med oljne ogrš ice) do -22,4 ‰ (med divje ešnje). Na vrhnjem grafu slike 20 je

razvidno, da je bilo območje vrednosti najširše pri cvetličnem in rešeljikovem medu, za ostale vrste medu pa je bilo značilno ožje območje. Vrste medu so si po naraščajoči povprečni vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  sledile v naslednjem zaporedju: med oljne ogrščice < ajdov < cvetlični < gozdni < lipov < kostanjev < rešeljikov < akacijev < med divje češnje.



Slika 20. Območje vrednosti in povprečna razmerja izotopov C in N v različnih vrstah medu  
 Figure 20. Value range and averages of C and N isotope ratios in different honey types

V izolatu proteinov smo izmerili povprečne vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  med -26,0 ‰ v smrekovem medu in -22,9 ‰ v medu divje češnje. Območje vrednosti so bila opazno širša pri večini vrst medu, vendar osamelcev ali ekstremnih osamelcev ni bilo. Pri izražanju povprečnih vrednosti razmerij izotopov ogljika in dušika smo izločili dva vzorca rešeljike, in sicer R14 in R16, saj sta bili njuni vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  ekstremna osamelca, ki sta vplivali tudi na razliko med izotopi ogljika v medu in v proteinskem izolatu (tudi  $^{13}\text{C}$  sta bila ekstremna osamelca). Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  so v medu naraščale v zaporedju: smrekov < cvetlični < lipov < kostanjev < gozdni < hojev < rešeljikov < akacijev < med divje češnje. Povprečne vrednosti razmerja izotopov dušika v izolatu proteinov iz medu,  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , so se gibale med -0,24 ‰ v smrekovem medu in 6,11 ‰ v ajdovem medu. Zaporedje vzorcev

glede na vrsto je bilo v tem območju  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$  naslednje: rešeljikov < gozdni < kostanjev < lipov < hojev < akacijev < cvetli ni.

Najmanjšo povprečno razliko v razmerju izotopov ogljika v medu in izolatu proteinov smo izražali v smrekovem medu (-12,4), največja razlika med tema parametroma je bila v medu divje ešnje (0,58). Območja vrednosti so imela široka razpon predvsem pri cvetli nem in akacijevem medu, ter nekoliko ožjega pri vzorcih kostanjevega in smrekovega medu. Vzorce, v katerih je izražena unana razlika med parametroma enaka ali veča kot 1 ‰, obravnavamo kot potrjene. Na tak način je smiselno obravnavati posamezne vzorce in ne povprečij po vrstah. Poleg že omenjenih vzorcev rešeljike R14 in R16, smo ugotovili, da je bil  $^{13}\text{C}$  enak ali večji od 1 ‰ tudi pri vzorcu akacijevnega medu A27, cvetli nega medu C08 in C37 in smrekovem medu S05. S pomočjo enačbe 2, predstavljene v poglavju Material in metode, smo izražali delež potvorbe, ki ga izražamo v odstotkih dodanega sladkorja. Upoštevali smo podatke le za tiste vzorce, kjer smo predhodno ugotovili, da je bil  $^{13}\text{C}$  1 ‰. Izražali smo, da naj bi taki vzorci vsebovali od 6,1 % (C19) do 36 % (R16) dodanega sladkorja. Razmerja stabilnih izotopov ogljika in dušika v medu in proteinih ter izraženi parametri za posamezne vzorce so predstavljeni v preglednici v prilogi K1.

Izotopski parametri vzorcev iste vrste medu nimajo normalne porazdelitve, variance parametrov med vzorci iste vrste in razlikih vrst medu so primerljive, kot je to pokazal Levenov test homogenosti varianc. Zato pri statistiki ni obravnavi lahko uporabimo le neparametrične teste, na primer Kruskal-Walison test, s katerim smo ugotovili, da so med medianami izotopskih parametrov razlikih vrst medu statistično značilne razlike. Razlike in stopnja značilnosti smo označili v zadnji vrstici preglednice 24.

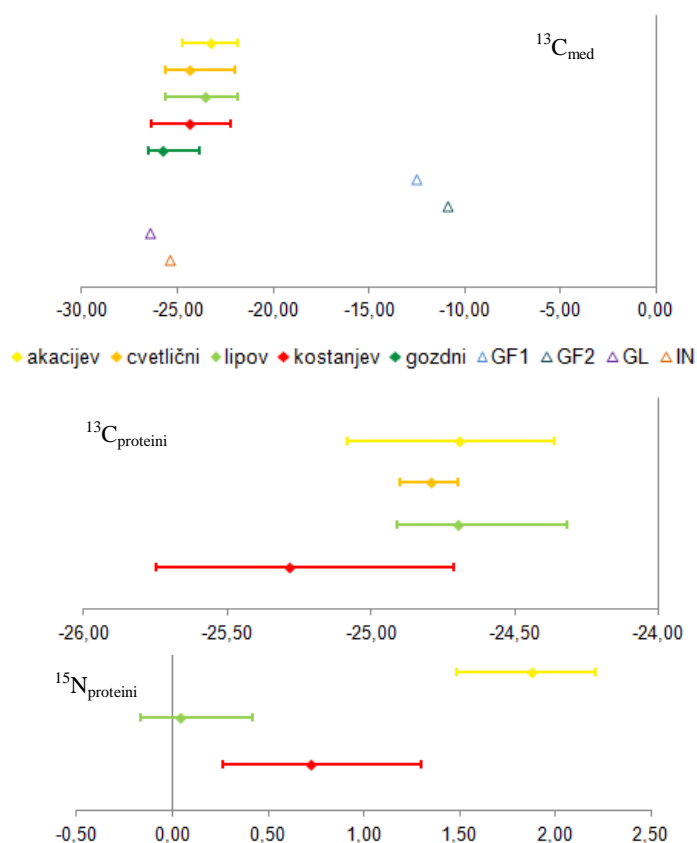
Poleg tega smo v obravnavanih vrstah slovenskega medu ugotovili močno zvezo med  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  in  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  ( $r = 0,890$ ) in  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  ter deležem potvorbe oziroma dodanega sladkorja ( $r = 0,732$ ).

#### **4.3.2 Rezultati analize izotopskih parametrov ogljika in dušika v vzorcih potvorjenega medu**

Tudi v vzorcih akacijevnega, cvetli nega, lipovega, kostanjevega in gozdnega medu, ki smo jim dodali znane deleže sirupa smo izmerili razmerje izotopov ogljika v medu in izolatu proteinov ter v slednjem še razmerje izotopov dušika. Povprečne vrednosti in območja vrednosti za serijo vzorcev iste vrste, so predstavljeni na sliki 21. Za primerjavo so prikazane tudi  $^{13}\text{C}_{\text{celokupni}}$  vrednosti vseh štirih sirupov.

Vrednosti glukoznega (-26,44 ‰) in invertnega (-25,37 ‰) sirupa sta bili nekoliko bolj negativni kot povprečne vrednosti večinoma vrst medu, fruktozno-glukoza sirupa pa sta imela vrednosti v območju med -12,52 in -10,9 ‰, ki ni značilno za med.

Povprečna vrednost  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  se v vzorcih, ki smo jim vmešali glukozni ali invertni sirup ni bistveno spremenila glede na vrednost v izhodiščnem, pristnem vzorcu, pri vzorcih, kjer smo uporabili fruktozno-glukoza sirup pa se je vrednost povečala (pomeni, da je manj negativna kot izhodna vrednost) za 3,12 ‰ v lipovem medu, 2,91 ‰ v akacijevem in 2,47 ‰ v vzorcih kostanjevega medu.



**Slika 21. Povpreja in obmojja vrednosti razmerja izotopov C in N v potvorjenih vzorcih medu**  
**Figure 21. Average values and ranges of isotope ratios of C and N in samples of adulterated honey**

Obmojja vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  so pri vseh petih vrstah medu široka, na kar je vplival tudi delež dodanega sirupa od 1 do 20 %. Obmojja so široka od 2,7 do 4,1 ‰, oziroma zajemajo vrednosti med -26,5 ‰ (gozdni med z 20 % GL) in -21,8 ‰ (akacijev med z 20 % GF2). Široka obmojja vrednosti, ki so bila značilna že za vzorce pristnega medu, smo ugotovili tudi za oba parametra izotopskih razmerij določeno v izolatu proteinov iz medu.

Razmerje izotopov dušika v izolatu proteinov smo uspeli določiti le v vzorcih akacijevga, lipovega in kostanjevega medu. Povprejna vrednost  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$  je bila največja pri vzorcih akacijevga medu (1,87 ‰), najmanjša pa pri lipovem medu (0,04 ‰). Za potvorjene vzorce akacijevga medu so bile značilne le pozitivne vrednosti, pri lipovem in kostanjevem medu pa so vrednosti segale od -1,26 ‰ (lipov) oziroma -0,17 ‰ (kostanjev) do 2,86 ‰ v potvorjenih vzorcih kostanjevega medu.

Izrazna razlika med razmerjem izotopov ogljika v medu in izolatu proteinov nam je pokazal potvorbe medu v vzorcih, ki so vsebovali 4 oziroma 8 % dodanega sirupa in ve. V tej raziskavi smo se osredotočili na fruktozno-glukozni sirup, saj sta zaradi svojih lastnosti in dostopnosti najbolj »prirodna« za mešanje z medom. Glukozni sirup se namreč zaradi svoje viskoznosti le težko meša z medom, medtem ko invertni sirup premo ne spremeni lastnosti predvsem zaradi svoje temne barve. V preglednici 25 so

predstavljeni vzorci, v katerih smo uspešno detektirali potvorbo. Za primerjavo je navedena koli in sirupa, ki smo jo vmešali v med in koli in dodanega sladkorja, izra unana z ena bo 2. Izbrani so bili samo tisti vzorci, pri katerih je bila razlika med razmerjem izotopov ogljika v medu in v izolatu proteinov enaka ali ve ja od 1 ‰, medtem ko so rezultati vseh meritev predstavljeni v preglednici priloge K2. Ujemanje med dejansko dodano koli ino in izra unano vrednostjo je precej zadovoljivo.

**Preglednica 25. Vzorci z dokazano potvorbo: primerjava med dodano in izra unano koli ino dodanega sladkorja**

**Table 25. Proven adulteration of samples: comparison of added amount and calculated amount of added sugar**

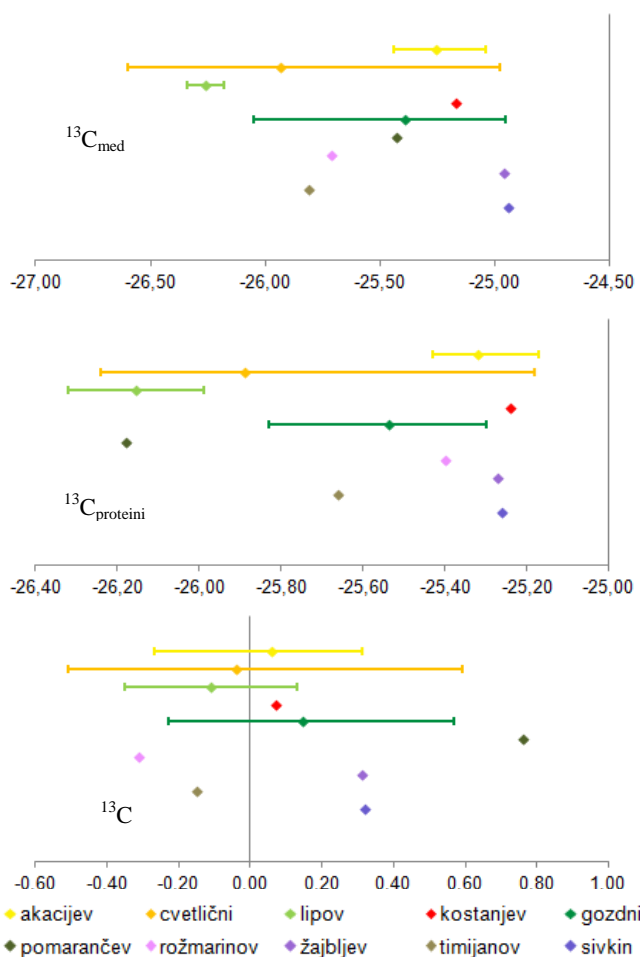
Oznaka vzorca	Vrsta sirupa	Delež sirupa (%)	<sup>13</sup> C (‰)	Potvorba (%)
A26f4		8	1,23	8,3
A26f5	GF2	12	2,48	16,1
A26f6		16	1,56	10,6
A26f7		20	2,54	17,4
L20f3		4	1,08	7,2
L20f4		8	1,36	8,9
L20f5	GF2	12	1,24	8,3
L20f6		16	2,41	16,1
L20f7		20	2,43	16,6
K29f5		12	2,45	16,3
K29f6	GF2	16	2,81	18,0
K29f7		20	2,36	15,3
G36f3*	GF1	4	1,00	6,8

\*Vzorci z ve jim deležem sirupa v tej seriji niso bili analizirani.

#### 4.3.3 Rezultati analize izotopskih parametrov ogljika in dušika v vzorcih medu iz trgovin

Izotopske parametre ogljika in dušika smo dolo ili v 25 vzorcih medu, ki smo jih vzor ili v razli nih trgovinah po Sloveniji. Analizirali smo tri vzorce akacijevega medu, deset vzorcev cvetli nega, dva vzorca lipovega, štiri vzorce gozdnega in po en vzorec kostanjevega, pomaran evega, rožmarinovega, žajbljevega, timijanovega in sivkinega medu. Na sliki 22 so prikazane povpre ne vrednosti in obmo ja vrednosti izotopskih parametrov <sup>13</sup>C<sub>med</sub>, <sup>13</sup>C<sub>proteini</sub> in <sup>15</sup>N<sub>proteini</sub> v prvih štirih vrstah medu, za ostale vrste z enim vzorcem pa so predstavljene povpre ne vrednosti.

Povpre na vrednost <sup>13</sup>C<sub>med</sub> je bila najnižja v lipovem medu (-26,3 ‰) in najvišja v medu sivke (-25,0 ‰). Vrste medu so si glede na naraš ajo o povpre no vrednost <sup>13</sup>C<sub>med</sub> sledile v naslednjem zaporedju: lipov < cvetli ni < timijanov < rožmarinov < pomaran ev < gozdni < akacijev < kostanjev < žajbljev < sivkin.



**Slika 22. Povpreja in obmojja vrednosti razmerja izotopov C v trgovinskih vzorcih**  
**Figure 22. Averages and value range of C isotope ratios in commercial honey samples**

Za cvetlični med je bilo značilno tudi široko območje vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ; vrednosti so segle od -26,4 do -25,2 ‰. Najvišja povprečna vrednost  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  je bila značilna za kostanjev med (-25,2 ‰), za med pomarančevca pa najnižja, -26,2 ‰. Vrste medu so si glede na naraščajočo povprečno vrednost razmerja izotopov ogljika v izolatu proteinov sledile: pomarančev < lipov < cvetlični < timijanov < gozdni < rožmarinov < akacijev < žajbljev < sivkin < kostanjev.

Vrednosti razmerja izotopov dušika v izolatu proteinov v trgovinskih vzorcih nismo uspeli določiti. Izražali smo razliko med razmerjem izotopov ogljika v medu in izolatu proteinov in to predstavili na tretjem grafu slike 22. Razvidno je, da sta imela najboljše območje vrednosti cvetlični in gozdni med. Najvišjo povprečno vrednost  $^{13}\text{C}$  smo izražali v medu pomarančevca (0,76 ‰). V nobenem od vzorcev razlika ni bila enaka ali večja 1 ‰, torej nobenega od vzorcev iz trgovin nismo sumili, da je bil potvoren. Rezultati vseh meritev v posameznih vzorcih so predstavljeni v prilogi K3.

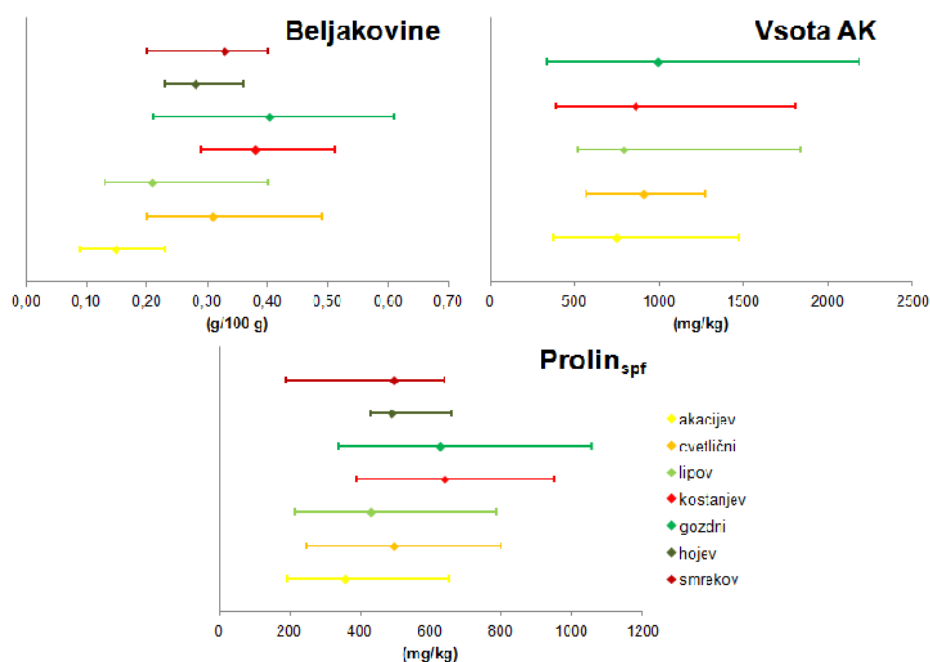
#### 4.4 REZULTATI DOLOČENJA VSEBNOSTI BELJAKOVIN IN PROFILA AMINOKISLIN

Vsebnost beljakovin s Kjeldahlovo metodo in profil aminokislin z metodo tekoinske kromatografije HPLC smo določili v 148 vzorcih medu, ki smo ga dobili od slovenskih čebelarjev, in v namerno potvorjenih vzorcih akacijevga, cvetličnega in gozdnega medu ter v vseh štirih sirupih (GF1 in GF2, GL in IN). V vseh naštetih vzorcih smo določili tudi vsebnost aminokislinske prolina s spektrofotometrično metodo.

##### 4.4.1 Vsebnost beljakovin in profil aminokislin v vzorcih pristnega medu

V analizo vsebnosti beljakovin, posameznih aminokislin (metoda HPLC) in aminokislinske prolina (spektrofotometrično metoda) je bilo vključeno 28 vzorcev akacijevga medu, 37 vzorcev cvetličnega, 20 vzorcev lipovega, 26 vzorcev kostanjevega in 28 vzorcev gozdnega medu. Vsebnost beljakovin in prolina smo določili ali še v sedmih vzorcih hojčevega in štirih vzorcih smrekovega medu slovenskih čebelarjev.

Na sliki 23 so prikazane obmožja vsebnosti in povprečne vrednosti za vsebnost beljakovin, prolina, določene spektrofotometrično, in skupno količino aminokislin v vzorcih sedmih vrst medu slovenskih čebelarjev. Najmanj beljakovin je bilo v vzorcih akacijevga medu (0,15 g/100 g), nekoliko več v lipovem (0,21 g/100 g) in cvetličnem medu (0,31 g/100 g), največjo povprečno vsebnost beljakovin pa smo določili v gozdnem medu (0,40 g/100 g), za katerega je bilo značilno tudi široko obmožje vrednosti in najvišji koeficient variabilnosti (29,7 %). V kostanjevem medu je bilo povprečno 0,38 % beljakovin, v hojčevem 0,28 % in v smrekovem 0,33 %. Statistično značilne razlike med medianami vsebnosti beljakovin v sedmih vrstah medu smo potrdili z neparametričnim Kruskal-Wallisovim testom ( $p = 0,000$ ).



Slika 23. Vsebnost beljakovin, skupnih aminokislin in prolina v vzorcih slovenskega medu  
Figure 23. Protein, total amino acid and proline content in samples of Slovenian honey



Podobne značilnosti kot za vsebnost beljakovin smo ugotovili tudi za skupno količino aminokislin, ki smo jih določili s tekoinsko kromatografijo. Najmanj aminokislin je vseboval akacijev med, povprečno 0,075 g/100 g, nato so sledili lipov med (0,079 g/100 g), kostanjev (0,086 g/100 g), cvetli ni (0,099 g/100 g) in gozdni med (0,099 g/100 g). Kljub različnim povprečnim vsebnostim aminokislin se akacijev, cvetli ni, lipov, kostanjev in gozdni med v tem parametru niso statistično značilno razlikovali. Med vsebnostjo beljakovin in skupnih aminokislin v medu slovenskih ebelarjev je obstajala le zmerne povezanost ( $r = 0,414$ ;  $p < 0,01$ ).

Statistično značilne razlike med sedmimi tipi vrstami slovenskega medu smo ugotovili za vsebnost prolina, določeno s spektrofotometrično. Najmanj te aminokislino je vseboval akacijev med (povprečno 356 mg/kg), ki se je po klasifikaciji z Duncanovim testom uvrstil v isto skupino kot lipov med (429 mg/kg). Obe vrsti se v vsebnosti prolina nista značilno razlikovali od hojevega (489 mg/kg), cvetli nega (494 mg/kg) in smrekovega (496 mg/kg) medu, ločeno pa sta se od gozdnega (626 mg/kg) in kostanjevega medu. Slednji je imel največ prolina (640 mg/kg) in se je razlikoval od vseh vrst medu, razen gozdnega.

Vsebnost posameznih aminokislin v medu smo določili z metodo HPLC. Rezultati določanja vsebnosti posameznih aminokislin so predstavljeni v preglednicah 26, 27 in 28 kot povprečne vrednosti za akacijev, cvetli ni, lipov, kostanjev in gozdni med.

Kot smo ugotovili z ANOVO, so se vrste medu značilno razlikovale v vsebnosti nekaterih aminokislin. Te razlike so označene z različnimi indeksi, nadpisanimi pri povprečnih vrednostih. Poleg tega so v zadnji vrstici preglednic predstavljeni tudi rezultati neparametričnega Kruskal-Wallisovega testa. Kot je razvidno iz vrednosti  $p$ , so se vrste medu razlikovale tudi v medianah številnih aminokislin.

Preglednica 26 prikazuje opisne statistike za vsebnost naslednjih aminokislin: asparagina, glutamina, asparaginske kisline, glutaminske kisline, histidina, serina in alanina. Največ asparagina je vseboval akacijev med, najmanj pa lipov. Razlike med vsebnostmi te aminokislino v petih vrstah slovenskega medu so bile statistično značilne, kar je prikazano z indeksi v preglednici 26. Z Duncanovim testom smo vrste medu razdelili v tri skupine. Poleg lipovega medu je bil v prvi skupini z najmanjšimi povprečnimi vrednostmi (indeks a) tudi cvetli ni med. Slednji se ni razlikoval od kostanjevega in gozdnega medu. Ravno tako ni bilo značilnih razlik v vsebnosti asparagina med gozdnim in akacijevim medom.

Glutamina je bilo največ v kostanjevem medu, sledili so cvetli ni, gozdni, akacijev in lipov med. Mediane vsebnosti te aminokislino so se med vrstami medu značilno razlikovale.

V lipovem medu smo določili največjo vsebnost asparaginske kisline, nekoliko manj jo je bilo v akacijevem medu. Kostanjev med je vseboval najmanj te aminokislino, povprečna vsebnost je bila za več kot polovico manjša od vsebnosti v lipovem medu.

Največjo povprečno vsebnost glutaminske kisline smo določili v gozdnem medu, za katerega je bila značilna tudi velika variabilnost ( $KV = 113\%$ ). Povprečne vsebnosti te aminokislino so bile od 32,6 mg/kg v kostanjevem do 32,8 mg/kg v lipovem medu.

Statistično značilne razlike med vrstami medu smo ugotovili tudi za vsebnost histidina. Značilno sta se razlikovala kostanjev s povprečno najmanjšo vsebnostjo in lipov z največjo vsebnostjo, med ostalimi vrstami medu pa razlik v povprečni vsebnosti histidina ni bilo.

Od botani nega porekla so bile odvisne mediane vsebnosti serina. Te aminokislina je bilo najmanj v akacijevem medu, 17,1 mg/kg, najve pa v lipovem, 35,6 mg/kg. Glede na vsebnost alanina lahko vrste medu razdelimo v tri skupine (indeksi a, b, c). Najnižje povpre je je bilo zna ilno za kostanjev med, ki se je razlikoval od cvetli nega in lipovega medu. V slednjem je bila povpre na vsebnost alanina najve ja, poleg kostanjevega medu pa se je zna ilno razlikoval tudi od akacijevega medu.

**Preglednica 26. Opisne statistike vsebnosti asparagina, glutamina, asparaginske kisline, glutaminske kisline, histidina, serina in alanina v slovenskem medu**

**Table 26. Descriptive statistics for the content of asparagine, glutamine, asparaginic acid, glutaminic acid, histidine, serine and alanine in Slovenian honey**

Vrsta medu	Statisti ni parameter	Vsebnost aminokislina (mg/kg)						
		Asp	Glu	Asn	Gln	His	Ser	Ala
akacijev (n = 28)	$\bar{x}$	29,8 <sup>c</sup>	25,3	48,0	44,7	19,2 <sup>a,b</sup>	17,1	62,9 <sup>a,b</sup>
	$x_{min}$	19,0	9,8	27,8	19,8	7,1	9,2	34,9
	$x_{max}$	48,4	49,5	83,7	97,2	82,3	46,5	125
	SD	10,1	12,9	20,4	23,1	20,6	9,7	25,6
	KV (%)	33,8	50,9	42,4	51,7	106	56,9	40,6
cvetli ni (n = 37)	$\bar{x}$	21,3 <sup>a,b</sup>	42,7	37,9	64,9	14,0 <sup>a,b</sup>	20,3	86,8 <sup>b,c</sup>
	$x_{min}$	8,0	16,6	5,2	14,6	6,4	10,3	26,7
	$x_{max}$	35,5	287,8	62,2	114	28,1	41,9	185
	SD	7,8	63,1	15,6	27,5	6,6	7,2	44,0
	KV (%)	36,5	147,7	41,1	42,3	47,5	35,5	50,7
lipov (n = 20)	$\bar{x}$	15,4 <sup>a</sup>	24,0	51,8	82,3	26,6 <sup>b</sup>	33,6	91,0 <sup>c</sup>
	$x_{min}$	3,3	8,8	15,7	5,2	4,0	10,9	39,0
	$x_{max}$	33,4	54,0	137	167,2	87,6	60,0	136
	SD	9,7	11,6	31,0	56,9	25,1	14,3	23,6
	KV (%)	63,3	48,5	59,7	69,2	94,2	42,6	26,0
kostanjev (n = 26)	$\bar{x}$	22,4 <sup>b</sup>	47,7	19,8	32,6	7,0 <sup>a</sup>	20,5	57,8 <sup>a</sup>
	$x_{min}$	11,8	15,9	5,0	6,1	0,0	9,2	23,5
	$x_{max}$	40,2	134	60,9	122	24,9	51,9	111
	SD	6,9	37,5	14,8	33,4	7,2	10,6	24,4
	KV (%)	30,6	78,7	74,7	102,3	102	51,6	42,2
gozdni (n = 28)	$\bar{x}$	26,2 <sup>b,c</sup>	39,4	38,7	107,4	20,3 <sup>a,b</sup>	26,8	69,0 <sup>a,b,c</sup>
	$x_{min}$	10,0	19,2	13,3	0,0	3,7	12,4	21,3
	$x_{max}$	46,5	89,7	95,5	424,6	112	75,1	236,2
	SD	10,2	18,8	19,8	122,4	24,0	15,3	47,7
	KV (%)	38,8	47,7	51,3	114	118	57,12	69,2
Kruskal-W. test (p)*		0,010	0,006	0,000	0,004	0,000	0,002	0,005

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena  $p < 0,05$

V preglednici 27 so predstavljene opisne statistike za naslednjih sedem analiziranih aminokislina: arginina, glicina, treonina, prolina, tirozina, valina in metionina. Povpre na vsebnost arginina je znašala med 16,4 mg/kg (akacijev med) in 29,3 mg/kg (kostanjev med). Med medianami posameznih vrst so bile statisti no zna ilne razlike.

Podobno smo ugotovili tudi za vsebnost glicina, ki je bila največja v gozdnem medu (11,0 mg/kg) in najmanjša v akacijevem medu (6,9 mg/kg).

Vzorci petih vrst medu se statistično niso razlikovali v povprečni vsebnosti in medianah vsebnosti treonina. Te aminokisliline je bilo v medu od 19,6 do 31,1 mg/kg. Prav tako se pet vrst medu ni razlikovalo v vsebnosti metionina. Povprečne vsebnosti te aminokisliline so se gibale med 1,8 in 5,0 mg/kg, v vzorcih gozdnega medu pa je bila njena količina pod mejo kvantifikacije.

**Preglednica 27. Opisne statistike vsebnosti arginina, glicina, treonina, prolina, tirozina, valina in metionina v slovenskem medu**

**Table 27. Descriptive statistics for the content of arginine, glycine, threonine, proline, tyrosine, valine and methionine in Slovenian honey**

Vrsta medu	Statistični parameter	Vsebnost aminokisliline (mg/kg)						
		Arg	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Met
akacijev (n = 28)	$\bar{x}$	16,4	6,9	19,6	244,7 <sup>a</sup>	26,3	10,6 <sup>a</sup>	5,0
	$x_{min}$	4,3	3,1	11,1	102	5,8	5,4	0,0
	$x_{max}$	65,0	27,0	42,2	451,4	80,5	17,0	20,5
	SD	17,9	6,3	8,3	112	24,6	4,2	8,6
	KV (%)	109	91,9	42,2	46,1	93,4	39,3	172
cvetli ni (n = 37)	$\bar{x}$	18,7	9,1	23,3	325 <sup>a,b</sup>	30,7	17,7 <sup>b</sup>	1,8
	$x_{min}$	6,9	3,5	0,0	160	12,3	6,2	0,0
	$x_{max}$	35,3	16,8	59,7	656	59,7	29,4	33,2
	SD	7,6	3,4	11,5	132	13,9	5,3	7,8
	KV (%)	40,5	37,2	49,3	40,5	45,1	29,8	424
lipov (n = 20)	$\bar{x}$	27,41	7,3	31,1	239 <sup>a</sup>	30,3	14,3 <sup>a,b</sup>	4,6
	$x_{min}$	6,6	1,2	12,9	129	10,5	6,9	0,0
	$x_{max}$	79,5	31,2	58,5	505	98,2	40,4	57,3
	SD	17,7	7,3	13,7	116	27,0	8,2	14,6
	KV (%)	64,4	100	44,2	48,5	89,2	57,5	318
kostanjev (n = 26)	$\bar{x}$	29,3	8,8	22,6	396 <sup>b</sup>	42,5	16,6 <sup>b</sup>	1,9
	$x_{min}$	5,0	2,8	4,0	202	13,0	5,6	0,0
	$x_{max}$	74,3	12,6	92,4	857	138	26,9	9,7
	SD	20,3	3,0	18,8	162	25,9	6,4	3,7
	KV (%)	69,3	33,5	83,4	40,8	61,1	38,4	195
gozdni (n = 28)	$\bar{x}$	25,8	11,0	22,0	359 <sup>b</sup>	35,6	16,9 <sup>b</sup>	< LOQ
	$x_{min}$	7,9	2,7	10,0	205	12,1	5,6	
	$x_{max}$	71,7	17,1	37,1	792	88,4	39,3	
	SD	15,7	3,4	8,6	146	20,5	7,9	
	KV (%)	60,8	31,2	39,2	40,6	57,7	46,9	
Kruskal-W. test (p)*		0,032	0,000	0,073	0,003	0,026	0,007	0,080

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povprečna vrednost), označenem z enakim nadpisanim indeksom statistično značilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statistično značilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je označena  $p < 0,05$   
< LOQ – pod mejo kvantifikacije

Med povprečnimi vsebnostmi prolina oziroma valina v akacijevem, cvetličnem, lipovem, kostanjevem in gozdnem medu so bile statistično značilne razlike. V obeh primerih smo z Duncanovim testom dobili dve skupini. Akacijev med se je v obeh primerih uvrstil v prvo

skupino, z manjšo povpre no vsebnostjo prolina oziroma valina. Statisti no zna ilno se je razlikoval od kostanjevega in gozdnega medu, ki sta predstavljala skupino z ve jo povpre no vsebnostjo tako prolina kot tudi valina. Od kostanjevega in gozdnega medu se je v koli ini prolina zna ilno razlikoval še lipov med, v vsebnosti valina pa razlik ni bilo. Povpre na koli ina tirozina v vzorcih medu je bila med 26,3 mg/kg (akacijev med) in 42,5 mg/kg (kostanjev med), z neparametri nim testom pa smo ugotovili, da se mediane vsebnosti statisti no zna ilno razlikujejo med vrstami medu ( $p = 0,026$ ).

V preglednici 28 so predstavljene opisne statistike za vsebnost cistina, triptofana, levcina, izolevcina, alo-izolevcina, fenilalanina in lizina v petih vrstah slovenskega medu.

**Preglednica 28. Opisne statistike vsebnosti cisteina, triptofana, levcina, izolevcina, alo-izolevcina, fenilalanina in lizina v slovenskem medu**

**Table 28. Descriptive statistics for the content of cysteine, tryptophane, leucine, isoleucine, allo-isoleucine, phenylalanine and lysine in Slovenian honey**

Vrsta medu	Statisti ni parameter	Vsebnost aminokislina (mg/kg)						
		Cys	Trp	Leu	Ile	Allolle	Phe	Lys
akacijev ( $n = 28$ )	$\bar{x}$	5,9	0,46	19,1	2,2	2,6 <sup>a</sup>	105	39,8 <sup>c</sup>
	$x_{min}$	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	21,8	30,2
	$x_{max}$	17,0	6,01	53,9	29,0	5,2	491,5	61,7
	SD	6,9	1,67	19,4	8,0	1,5	171	11,7
	KV (%)	116	361	102	361	58,1	163	29,5
cvetli ni ( $n = 37$ )	$\bar{x}$	9,2	< LOQ	5,9	< LOQ	7,5 <sup>c</sup>	199	29,5 <sup>b</sup>
	$x_{min}$	0,0		0,0		0,0	28,2	6,4
	$x_{max}$	40,4		50,6		25,6	659	48,8
	SD	13,1		14,3		5,5	167	12,7
	KV (%)	142		243		73,7	83,8	43,0
lipov ( $n = 20$ )	$\bar{x}$	5,4	< LOQ	9,7	2,0	3,9 <sup>a,b</sup>	112	22,9 <sup>a,b</sup>
	$x_{min}$	0,0		0,0	0,0	0,0	21,6	7,8
	$x_{max}$	16,1		40,1	31,2	13,5	586	60,0
	SD	6,6		15,0	7,8	3,6	141	14,5
	KV (%)	124		156	400	92,1	126	63,3
kostanjev ( $n = 26$ )	$\bar{x}$	18,0	< LOQ	6,3	< LOQ	4,4 <sup>a,b</sup>	116	19,2 <sup>a</sup>
	$x_{min}$	0,0		0,0		0,0	22,5	3,9
	$x_{max}$	63,0		31,7		10,9	527	54,6
	SD	19,1		12,3		3,0	119	12,9
	KV (%)	106		194		67,5	103	66,9
gozdni ( $n = 28$ )	$\bar{x}$	6,0	< LOQ	2,8	< LOQ	6,3 <sup>b,c</sup>	190	16,6 <sup>a</sup>
	$x_{min}$	0,0		0,0		2,4	37,0	6,6
	$x_{max}$	45,5		27,7		18,6	1051	64,4
	SD	11,3		8,5		4,2	255	12,8
	KV (%)	189		308		66,8	135	76,8
Kruskal-W. test ( $p$ )*		0,089	0,236	0,023	0,412	0,001	0,009	0,000

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena  $p < 0,05$   
< LOQ – pod mejo kvantifikacije

Z ANOVO smo dokazali statistično značilne razlike med vrstami medu v vsebnostih alo-izolevcina in lizina. Najmanj slednjega je bilo v gozdnem in kostanjevem medu, ki sta se v tem značilno razlikovala od cvetli nega in akacijevga medu. Akacijev med je vseboval največ lizina in se v tem parametru razlikoval od vseh ostalih vrst medu.

Nasprotno, pa je bila vsebnost alo-izolevcina v akacijevem medu najmanjša. Ta vrsta medu se je značilno razlikovala od gozdnega in cvetli nega medu, za katerega je bila značilna najvišja vsebnost te aminokislina.

Z neparametričnim testom smo potrdili razlike med medianami vsebnosti levcina in fenilalanina v petih vrstah medu. Za obe aminokislini je bila značilna velika variabilnost vsebnosti v vzorcih iste vrste, kar pri aju tudi vrednosti korelacijskih koeficientov ( $KV = 84\text{--}308\%$ ).

Obravnavane vrste medu se niso statistično značilno razlikovale v povprečnih vsebnostih cisteina, triptofana in izolevcina. Vsebnost triptofana smo uspeli kvantificirati le v vzorcih akacijevga medu, kjer smo ga določili med 0,0 in 6,0 mg/kg. Podobno v cvetli nem, kostanjevem in gozdnem medu nismo določili vsebnosti izolevcina, za vzorce akacijevga in lipovega medu pa je bila značilna velika variabilnost vrednosti ( $KV = 361$  oz.  $400\%$ ). Vsebnost cisteina smo določili v vzorcih vseh petih vrst. Povprečne vrednosti posamezne vrste so bile v intervalu med 5,4 (lipov med) in 18,0 (kostanjev med) mg/kg.

Med vsebnostmi posamezne aminokislina v vzorcih iste vrste je bila dokaj visoka variabilnost, kar je razvidno tudi iz koeficientov variabilnosti, ki so predstavljeni v vseh treh preglednicah. Vrednosti  $KV$  so znašale med 25,9 in  $400\%$ .

Med vsebnostmi večine aminokislina v petih vrstah medu zveze niso obstajale ali pa so bile zgolj šibke do zmerne. Možno zvezo smo ugotovili med vsebnostjo serina in glutaminske kisline ( $r = 0,720$ ) oziroma histidina ( $r = 0,715$ ). Poleg tega je bila možna korelacija še med vsebnostjo alo-izolevcina in valina ( $r = 0,742$ ), medtem ko je bila zveza med vsoto aminokislina in vsebnostjo fenilalanina ( $r = 0,754$ ) možna in odvisna.

#### **4.4.2 Vsebnost beljakovin in profil aminokislina v vzorcih potvorjenega medu**

V vzorcih lipovega in kostanjevega medu, potvorjenega s sirupom GF2, smo določili vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo in vsebnost beljakovin posredno preko dušika (faktor za preračun vsebnosti beljakovin iz dušika,  $f = 6,25$ ). V namerno potvorjenih vzorcih akacijevga, cvetli nega in gozdnega medu ter v vseh štirih sirupih smo poleg omenjenih analiz določili še profil aminokislina z metodo HPLC.

Zvezo med količinami dodanega sirupa in njegovo vrsto ter vsebnostjo posamezne aminokislina in beljakovin v potvorjenih vzorcih petih vrst medu smo proučevali z analizo linearne regresije. Ugotovili smo, da imajo visoke koeficiente determinacije ena za eno linearne regresije za zveze med vsebnostjo serina, valina, vsoto aminokislina in vsebnostjo beljakovin ter deležem in vrsto sirupa. Te štiri najmožnejše zveze so predstavljene na grafih slike 24, ena za eno linearne regresije in determinacijski koeficienti pa v preglednici 29.

Za vse zveze je bil značilen negativen smernostni koeficient regresijske premice, kar pomeni, da je vsebnost predstavljenih štirih parametrov z naraščanjem količin dodanega sirupa vse manjša. Kot je prikazano v preglednici 29, so determinacijski koeficienti visoki

za vse zveze med vsebnostjo serina, valina, vsote aminokislin in skupnih beljakovin ter deležem posameznega sirupa. Vrednosti  $r^2$  so znašale od 0,727 do 0,999.

**Preglednica 29. Ena ba linearne regresije in determinacijski koeficient za zvezo med deležem in vrsto dodanega sirupa in vsebnostjo serina, valina, skupnih aminokislin in beljakovin v akacijevem, cvetli nem in gozdnem medu**

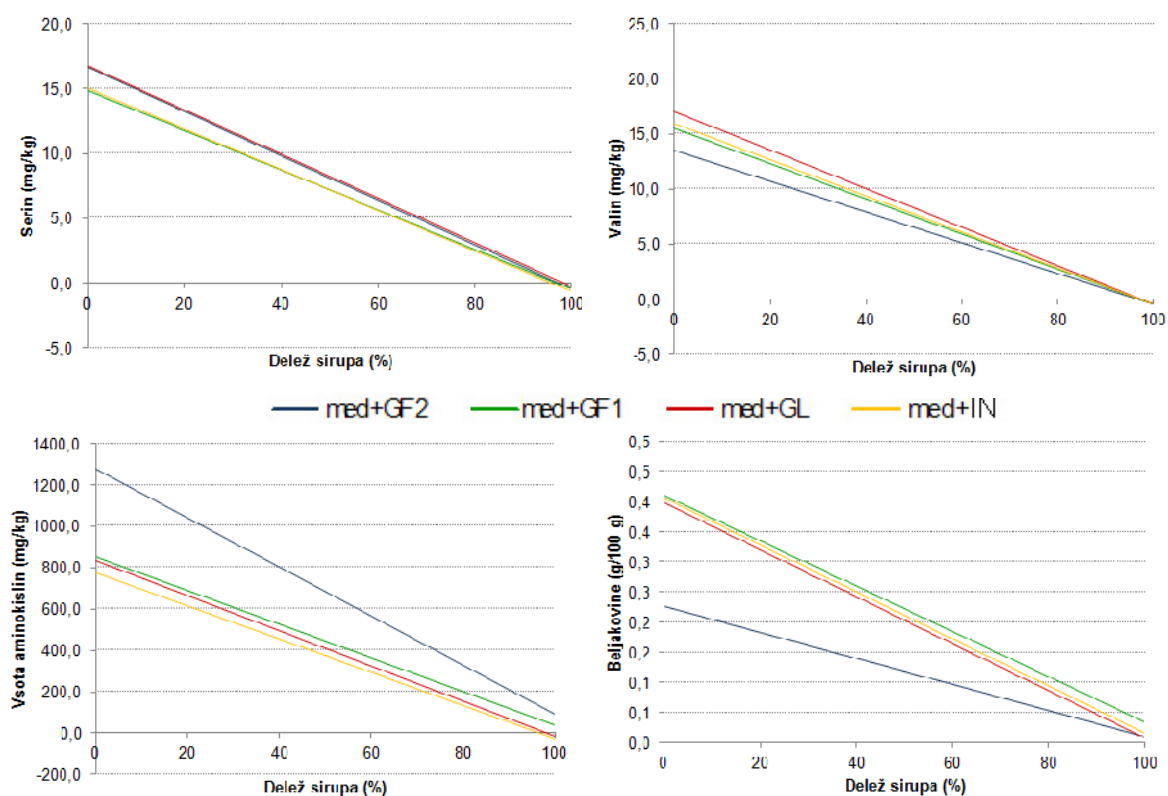
**Table 29. Linear regression equation and determination coefficient for relation between added syrup type and amount and the content of proline, valine, total amino acids and protein in acacia, multifloral and forest honey**

Fizikalno-kemijski parameter	Vrsta sirupa	Ena ba linearne regresije	$r^2$
vsebnost serina (mg/kg)	GF1	$y = -0,1532x + 14,899$	0,894
	GF2	$y = -0,1717x + 16,696$	0,929
	GL	$y = -0,1708x + 16,795$	0,933
	IN	$y = -0,1567x + 15,007$	0,868
vsebnost valina (mg/kg)	GF1	$y = -0,1591x + 15,519$	0,857
	GF2	$y = -0,1398x + 13,509$	0,900
	GL	$y = -0,175x + 17,063$	0,815
	IN	$y = -0,1639x + 15,959$	0,939
vsota aminokislin (mg/kg)	GF1	$y = -8,1407x + 852,69$	0,744
	GF2	$y = -11,879x + 1279,1$	0,951
	GL	$y = -8,5298x + 835,02$	0,727
	IN	$y = -8,0586x + 776,77$	0,682
vsebnost beljakovin (g/100 g)	GF1	$y = -0,0038x + 0,4104$	0,924
	GF2	$y = -0,0021x + 0,226$	0,999
	GL	$y = -0,0039x + 0,3982$	0,935
	IN	$y = -0,0039x + 0,4074$	0,938

Legenda: x – vrednost fizikalno-kemijskega parametra; y – koli ina dodanega sirupa (v %);  
 $r^2$  – koeficient determinacije regresijske ena be

Zna ilne odvisne zveze, vendar z nižjimi koeficienti determinacije ena be linearne regresije, smo ugotovili tudi med koli ino dodanega sirupa in:

- vsebnostjo glutamina (povpre en  $r^2 = 0,624$ ),
- vsebnostjo histidina (povpre en  $r^2 = 0,497$ ),
- vsebnostjo arginina (povpre en  $r^2 = 0,629$ ),
- vsebnostjo glicina (povpre en  $r^2 = 0,545$ ),
- vsebnostjo treonina (povpre en  $r^2 = 0,563$ ),
- vsebnostjo prolina (povpre en  $r^2 = 0,638$ ) in
- vsebnostjo tirozina (povpre en  $r^2 = 0,542$ ) v vzorcih medu petih vrst, ki smo jim dodali sirup GF1, GF2, GL oziroma IN.



Slika 24. Odvisna zveza med deležem sirupa in vsebnostjo serina, valina, skupnih aminokislin in beljakovin v vzorcih potvorjenega medu.

Figure 24. Regression between the amount of added syrup and the content of proline, valine, total amino acids and protein in samples of deliberately adulterated honey.

V preglednici 30 so predstavljene povprečne vsebnosti analiziranih parametrov v štirih sirupih. Vrednosti prolina, ki smo jih dobili s spektrofotometrično metodo, so se gibale med 20,7 (invertni sirup) in 1953 mg/kg (glukozni sirup). Nasprotno pri analizi aminokislin z metodo HPLC prolina nismo detektirali, marve smo v sirupih določili alanin. Njegova vsebnost je bila najmanjša v invertnem sirupu in največja v fruktozno-glukoznem sirupu GF2. Količina beljakovin, ki smo jih določili z metodo po Kjeldahlu je bila zelo majhna, in sicer od 0,011 do 0,033 g/100 g. Največ beljakovin je vseboval fruktozno-glukozni sirup GF1, in sicer kar trikrat več kot sirup GF2 in GL.

Preglednica 30. Povprečne vsebnosti prolina, alanina in beljakovin v štirih sirupih, uporabljenih pri pripravi namerno potvorjenih vzorcev medu

Table 30. Average content of proline, alanine and proteins in four types of syrups used in preparation of deliberately adulterated honey samples

Parameter	Enota	Oznaka sirupa			
		GF1	GF2	GL	IN
prolin (spektrofotom.)	mg/kg	23,4	476	1953	20,7
alanin (HPLC)	mg/kg	80,0	119	15,7	12,8
beljakovine	g/100 g	0,033	0,011	0,011	0,017

#### 4.5 REZULTATI DOLOČENJA VSEBNOSTI ELEMENTOV Z METODO TXRF

Z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije s totalnim odbojem (TXRF) smo v vzorcih medu določili vsebnost žvepla, klora, kalija, kalcija, mangana, železa, niklja, bakra, cinka, svinca, broma, rubidija in stroncija. V analizo je bilo vključenih 162 vzorcev medu, ki smo jih dobili neposredno od slovenskih čebelarjev in 24 vzorcev medu, vzorci pa so bili v trgovinah po Sloveniji.

##### 4.5.1 Vsebnost elementov v vzorcih pristnega medu

Z metodo TXRF smo določili vsebnost makro in mikro elementov v 162 vzorcih medu desetih vrst: v akacijevem, cvetli nem, lipovem, kostanjevem, gozdnem, hojevem, smrekovem, rešeljikovem in ajdovem medu ter v medu oljne ogršice. Opisne statistike za vsebnosti posameznih elementov v različnih vrstah slovenskega medu so zbrane v preglednicah 31 in 32.

Akacijev, cvetli ni, lipov, kostanjev, gozdni, hojev, smrekov, rešeljikov, ajdov med in med oljne ogršice so se statistično značilno razlikovali v povprečni vsebnosti klora in bakra. Razlike smo dokazali z analizo variance, v kateri ni bil vključen vzorec škrdatovega medu. Naštete vrste medu so se razlikovale tudi v medianah vsebnosti kalija, kalcija, mangana, cinka, niklja in rubidija. Stopnja značilnosti ( $p$ ), ki smo jo dobili s Kruskal-Wallisovim testom, je predstavljena v zadnji vrstici preglednic 31 in 32.

Povprečna vsebnost kalija je v vzorcih medu znašala od 0,27 do 4,0 g/kg. Najmanj ga je bilo v akacijevem medu, sledili so med oljne ogršice < cvetli ni < lipov < ajdov < rešeljikov < gozdni < smrekov < hojev < kostanjev in škrdatov med.

Akacijev med je vseboval tudi najmanj kalcija, podobne povprečne vsebnosti pa smo določili v cvetli nem, lipovem, gozdnem, smrekovem, rešeljikovem in ajdovem medu ter v medu oljne ogršice. Največja povprečna vsebnost tega elementa je bila v kostanjevem medu.

Vsebnost železa je bila v medu oljne ogršice in lipu manjša od 1 mg/kg, v škrdatovem in ajdovem medu pa večja od 5 mg/kg. V ostalih vrstah medu so bile povprečne vrednosti med 1,69 in 3,07 mg/kg. Vsebnost železa se med vrstami medu ni značilno razlikovala.

Značilnih razlik med vrstami ni bilo tudi v vsebnosti žvepla. Najnižjo povprečno vrednost tega elementa smo določili v škrdatovem medu, najvišjo pa v akacijevem.

Glede na povprečno vsebnost klora smo z Duncanovim testom vrste medu razdelili v tri skupine (indeksi a, b, c). Skupino z najmanjšo vsebnostjo tega elementa predstavlja akacijev med, ki se značilno razlikuje od ostalih vrst, razen od medu oljne ogršice in smreke. Največjo povprečno vsebnost klora smo določili v gozdnem medu, ki se je značilno razlikoval od medu oljne ogršice in akacije.

Količine mangana v vzorcih medu so bile nizke, določili smo jih v območju med 0,84 (akacijev med) in 6,78 mg/kg v smrekovem medu.

Mediana vsebnosti cinka je bila odvisna od vrste medu. Najnižje povprečne vrednosti, manjše od 1 mg/kg, smo določili v akacijevem in lipovem medu, kar osemkrat višjo pa v ajdovem medu.



**Preglednica 31. Opisne statistike za vsebnost K, Ca, Fe, S, Cl, Mn in Zn v slovenskem medu, določene z metodo TXRF**

**Table 31. Descriptive statistics for K, Ca, Fe, S, Cl, Mn and Zn content determined by TXRF method, in Slovenian honey**

Vrsta medu	Statistični parameter	Vsebnost elementov (mg/kg)						
		K	Ca	Fe	S	Cl	Mn	Zn
akacijev (n = 20)	$\bar{x}$	269	16,8	2,51	70,7	131 <sup>a</sup>	0,84	0,82
	SD	101	7,7	3,05	60,8	69,0	0,29	0,58
	KV (%)	37,6	45,7	121	86,1	52,6	34,6	70,9
cvetli ni (n = 33)	$\bar{x}$	1278	82,4	1,69	51,8	328 <sup>b,c</sup>	4,10	1,40
	SD	573	28,5	1,23	34,8	142	4,02	1,00
	KV (%)	44,8	34,6	73,0	67,3	43,4	98,2	71,4
lipov (n = 18)	$\bar{x}$	1728	87,3	0,93	53,4	297 <sup>b,c</sup>	2,75	0,99
	SD	418	27,5	0,76	52,5	83,9	2,32	0,57
	KV (%)	24,2	31,5	81,6	98,4	28,2	84,5	57,5
kostanjev (n = 26)	$\bar{x}$	3896	190	2,55	40,4	318 <sup>b,c</sup>	31,1	1,47
	SD	822	57,0	2,87	18,6	167	13,6	1,35
	KV (%)	21,1	30,0	112	45,9	52,6	43,7	91,8
gozdni (n = 36)	$\bar{x}$	2745	87,5	1,95	58,1	399 <sup>c</sup>	4,87	2,02
	SD	793	40,4	1,55	19,5	134	2,98	1,55
	KV (%)	28,9	46,2	79,8	33,5	33,8	61,2	76,5
hojev (n = 4)	$\bar{x}$	3304	58,6	2,33	65,0	368 <sup>b,c</sup>	4,95	1,80
	SD	531	30,2	1,88	11,5	98,2	2,52	0,37
	KV (%)	16,1	51,5	80,5	17,7	26,7	50,9	20,8
smrekov (n = 4)	$\bar{x}$	3176	78,8	3,07	58,9	401 <sup>c</sup>	6,78	2,52
	SD	606	30,9	1,31	8,9	134	0,74	0,76
	KV (%)	19,1	39,2	42,6	15,0	33,4	10,9	30,1
m. oljne ogršice (n = 5)	$\bar{x}$	563	74,4	0,53	39,5	235 <sup>a,b</sup>	1,57	1,36
	SD	302	21,7	0,24	12,1	72,9	1,12	0,66
	KV (%)	53,7	29,2	44,5	25,2	31,1	71,3	48,2
škržatov (n = 1)	$\bar{x}$	4000	78,8	5,92	35,7	390,5	1,83	1,04
rešeljikov (n = 13)	$\bar{x}$	1917	79,7	2,09	37,8	297 <sup>b,c</sup>	1,44	1,81
	SD	581	19,4	1,39	15,9	75,3	0,64	0,81
	KV (%)	30,3	24,4	66,2	42,0	25,3	44,3	44,6
ajdov (n = 2)	$\bar{x}$	1511	83,7	5,87	40,6	369 <sup>b,c</sup>	4,86	8,53
	SD	805	20,2	2,96	15,9	85,6	1,15	9,15
	KV (%)	53,3	24,1	35,3	25,4	23,2	23,6	107
Kruskal-W. test (p)*		0,000	0,000	0,081	0,062	0,000	0,000	0,000

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povprečna vrednost), označenem z enakim nadpisanim indeksom statistično značilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statistično značilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je označena  $p < 0,05$

Kot je razvidno iz podatkov v preglednici 32, smo svinec določili le v posameznih vzorcih treh vrst medu. Podane so le izmerjene vrednosti, brez opisnih statistik.

Obravnane vrste medu so se statistično značilno razlikovale ( $p < 0,05$ ) v povprečnih vsebnostih. Najmanj ga je vseboval lipov med, ki se je značilno razlikoval od smrekovega in hojevega medu. V slednjem je bilo tega mikroelementa največ, in sicer značilno več kot v ostalih vrstah medu.

**Preglednica 32. Opisne statistike za vsebnost Cu, Ni, Pb, Br in Rb v slovenskem medu, dolo ene z metodo TXRF**

**Table 32. Descriptive statistics for Cu, Ni, Pb, Br and Rb content determined by TXRF method, in Slovenian honey**

Vrsta medu	Statisti ni parameter	Vsebnost elementov (mg/kg)				
		Cu	Ni	Pb	Br	Rb
akacijev (n = 20)	$\bar{x}$	0,43 <sup>a,b</sup>	0,36	2,27	0,72	0,73
	SD	0,23	0,26		0,35	0,37
	KV (%)	53,8	72,8		48,9	50,9
cvetli ni (n = 33)	$\bar{x}$	0,53 <sup>a,b</sup>	0,27		0,87	3,70
	SD	0,42	0,19		0,44	2,60
	KV (%)	79,0	69,5		51,2	70,3
lipov (n = 18)	$\bar{x}$	0,31 <sup>a</sup>	0,28		0,89	5,01
	SD	0,26	0,20		0,35	2,55
	KV (%)	82,3	69,9		39,1	50,9
kostanjev (n = 26)	$\bar{x}$	0,65 <sup>a,b</sup>	0,35	0,11	0,84	17,3
	SD	0,37	0,34		0,41	6,33
	KV (%)	57,4	97,6		48,9	36,6
gozdni (n = 36)	$\bar{x}$	0,81 <sup>a,b</sup>	0,46		1,02	8,55
	SD	0,70	0,25		0,73	5,82
	KV (%)	86,5	54,0		72,2	68,0
hojev (n = 4)	$\bar{x}$	2,17 <sup>c</sup>	0,68		0,62	18,5
	SD	0,87	0,54		0,17	2,20
	KV (%)	40,1	80,3		27,5	11,9
smrekov (n = 4)	$\bar{x}$	1,00 <sup>b</sup>	0,58		0,61	13,7
	SD	0,22	0,28		0,06	7,7
	KV (%)	21,8	49,0		9,5	56,3
m.oljne ogrš ice (n = 5)	$\bar{x}$	0,78 <sup>a,b</sup>	0,39	0,82	0,56	2,82
	SD	0,45	0,33		0,35	2,42
	KV (%)	58,1	85,9		63,2	85,9
škržatov (n = 1)	$\bar{x}$	1,61	0,28		1,05	3,46
rešeljnikov (n = 13)	$\bar{x}$	0,58 <sup>a,b</sup>	0,44		0,67	3,61
	SD	0,31	0,59		0,29	1,65
	KV (%)	53,7	132		43,5	45,8
ajdov (n = 2)	$\bar{x}$	0,55 <sup>a,b</sup>	1,55		0,68	4,49
	SD	0,69	1,51		0,03	1,48
	KV (%)	125	97,5		4,2	33,1
Kruskal-W. test (p)*		0,000	0,044	0,107	0,474	0,000

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povpre na vrednost), ozna enem z enakim nadpisanim indeksom statisti no zna ilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statisti no zna ilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je ozna ena  $p < 0,05$

Povpre na koli ina niklja je bila v ve ini vrst medu manjša od 1 mg/kg in je naraš ala v naslednjem zaporedju: cvetli ni < lipov = škržatov < kostanjev < akacijev < med oljne ogrš ice < rešeljnikov < gozdni < smrekov < hojev < ajdov med (1,55 mg/kg). Med medianami vsebnosti niklja v razli nih vrstah medu so bile zna ilne razlike.

Nasprotno smo ugotovili za brom, vrste medu se v vsebnosti tega mikroelementa niso razlikovale. Njegova povprečna količina je znašala od 0,67 mg/kg v rešeljškem medu do 1 mg/kg v kostanjevem in škržatovem.

Povprečna vsebnost rubidija v različnih vrstah slovenskega medu je bila zelo raznolika. Akacijev med ga je vseboval povprečno manj kot 1 mg/kg, povprečna vsebnost v smrekovem, kostanjevem in hojevem medu pa so presegle 10 mg/kg. Vrste medu so se značilno razlikovale v medianah vsebnosti rubidija.

Za vrednosti vseh elementov v vzorcih iste vrste so bili značilni visoki koeficienti variabilnosti, ki so pri nekaterih vrstah in posameznih elementih dosegli tudi več kot 100 %. Izredno mojih povezav med vsebnostjo posameznih elementov v medu nismo ugotovili, mojih zvezi pa sta obstajali med vsebnostjo K in Ca ( $r = 0,701$ ) ter Ca in Mn ( $r = 0,768$ ).

#### **4.5.2 Vsebnost elementov v vzorcih medu iz trgovin**

Z metodo TXRF smo vsebnost makro in mikro elementov določili ali v treh vzorcih akacijevga, enajstih vzorcih cvetličnega, osmih vzorcih gozdnega ter v enem vzorcu lipovega in kostanjevega medu iz trgovin.

V preglednici 33 so predstavljene povprečne vrednosti kalija, kalcija, železa, žvepla, klora, mangana in cinka v analiziranih vzorcih iz trgovin. Z analizo variance smo ugotovili statistično značilne razlike v povprečni vsebnosti K in Cl med akacijevim, cvetličnim in gozdnim medom iz trgovin. Slednji se je v vsebnosti obeh elementov razlikoval od akacijevga in cvetličnega medu. Največjo vsebnost kalija smo določili v vzorcu kostanjevega medu, klora pa je bilo največ v gozdnem medu.

Vzorci predstavljenih petih vrst medu so se razlikovali v mediani vsebnosti Ca, S in Mn, kar smo potrdili z neparametričnim testom. Povprečna vsebnost kalcija je bila najmanjša v akacijevem medu, po vsebnosti so mu sledili cvetlični, lipov, kostanjev in gozdni med z največjo količino. V letem je bilo tudi največ žvepla, 76,1 mg/kg, najmanj pa sta ga vsebovala kostanjev (28,0 mg/kg) in akacijev med (23,7 mg/kg). Povprečna vsebnost mangana je bila v vzorcih akacijevga, cvetličnega in lipovega medu manjša od 2 mg/kg. V gozdnem medu ga je bilo povprečno 10,6 mg/kg, v vzorcu kostanjevega medu pa celo 15,2 mg/kg.

Med analiziranimi vzorci ni bilo značilnih razlik v srednji vrednosti Fe in Zn. Povprečna vsebnost železa je bila najmanjša v lipovem medu (2,6 mg/kg) in največja v gozdnem medu (10,2 mg/kg). Največ cinka je vseboval gozdni med, med povprečnimi vrednostmi v posameznih vrstah medu pa so bile razlike majhne. Najmanj cinka, 0,90 mg/kg, je bilo v vzorcu kostanjevega medu.

**Preglednica 33. Opisne statistike za vsebnost K, Ca, Fe, S, Cl, Mn in Zn v trgovinskih vzorcih medu, določene z metodo TXRF**

**Table 33. Descriptive statistics for K, Ca, Fe, S, Cl, Mn and Zn content determined by TXRF method, in commercial honey samples**

Vrsta medu	Statistični parameter	Vsebnost elementov (mg/kg)						
		K	Ca	Fe	S	Cl	Mn	Zn
akacijev (n = 3)	$\bar{x}$	331 <sup>a</sup>	53,6	3,27	23,7	234 <sup>a</sup>	1,44	1,62
	SD	114	24,8	0,97	2,5	117	0,32	0,53
	KV (%)	34,5	46,3	29,7	10,6	50,2	22,1	32,5
cvetli ni (n = 11)	$\bar{x}$	748 <sup>a</sup>	74,6	2,66	31,5	328 <sup>a</sup>	1,99	1,91
	SD	397	24,7	1,01	11,4	114	1,37	1,10
	KV (%)	53,0	33,1	37,8	36,3	34,9	68,5	57,6
lipov (n = 1)	$\bar{x}$	377	96,0	2,60	58,6	262	1,90	1,26
kostanjev (n = 1)	$\bar{x}$	3960	151	2,97	28,0	405	15,2	0,90
gozdni (n = 8)	$\bar{x}$	2535 <sup>b</sup>	162,4	10,2	76,1	563 <sup>b</sup>	10,6	2,71
	SD	951	97,6	17,5	88,2	154	7,4	1,66
	KV (%)	37,5	60,1	172	115	27,3	70	61,2
Kruskal-W. test (p)*		0,001	0,022	0,070	0,046	0,005	0,002	0,315

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povprečna vrednost), označenem z enakim nadpisanim indeksom statistično značilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statistično značilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je označena  $p < 0,05$

V preglednici 34 so prikazane povprečne vsebnosti bakra, niklja, svinca, broma in rubidija v analiziranih vzorcih medu iz trgovin. Vsebnost nobenega od naštetih elementov se v nobeni od petih vrst ni razlikovala od ostalih.

Svinec je bil prisoten v vseh analiziranih vzorcih, vrednosti so znašale od 0,40 do 56 mg/kg, vendar njegova vsebnost ni bila povezana z botaničnim izvorom medu.

Povprečna vsebnost bakra v komercialnih vzorcih je bila med 0,40 mg/kg v kostanjevem medu in 1,12 mg/kg v gozdnem. Najmanj niklja smo določili v vzorcu kostanjevega medu, v akacijevem medu pa ga je bilo največ. Za povprečno vsebnost broma v medu iz trgovin so bile značilne vrednosti med 0,30 v lipovem medu in 1,10 mg/kg v gozdnem medu.

Rubidija je bilo v akacijevem, cvetličnem in lipovem medu manj kot 2 mg/kg, vsebnosti v gozdnem in kostanjevem medu pa so presegle 8 mg/kg.

V vzorcih medu iz trgovin smo analizirali še stroncij. Povprečne vsebnosti so bile majhne, med vrednostmi v vzorcih iste vrste pa je bila velika variabilnost. Najmanj stroncija smo določili v vzorcu kostanjevega medu, nekoliko več so ga vsebovali akacijev, lipov in cvetlični med. V gozdnem medu je bila vsebnost tega elementa skoraj trikrat večja kot v vzorcih ostalih vrst medu.

**Preglednica 34. Opisne statistike za vsebnost Cu, Ni, Pb, Br, Rb in Sr v komercialnih vzorcih medu, določene z metodo TXRF**

**Table 34. Descriptive statistics for Cu, Ni, Pb, Br, Rb and Sr content determined by TXRF method, in commercial honey samples**

Vrsta medu	Statistični parameter	Vsebnost elementov (mg/kg)					
		Cu	Ni	Pb	Br	Rb	Sr
akacijev ( <i>n</i> = 3)	$\bar{x}$	0,44	0,73	0,53	0,40	1,19	0,47
	SD	0,20	0,12	0,15	0,10	0,68	0,15
	KV (%)	44,8	15,8	28,6	25,0	57,4	32,7
cvetli ni ( <i>n</i> = 11)	$\bar{x}$	0,57	0,50	0,54	0,68	1,50	0,73
	SD	0,23	0,18	0,24	0,39	0,80	0,63
	KV (%)	39,6	36,0	44,1	56,9	52,9	85,7
lipov ( <i>n</i> = 1)	$\bar{x}$	0,92	0,55	0,50	0,30	0,65	0,50
kostanjev ( <i>n</i> = 1)	$\bar{x}$	0,40	0,22	0,40	1,10	8,80	0,40
gozdni ( <i>n</i> = 8)	$\bar{x}$	1,12	0,62	0,56	0,59	8,31	2,85
	SD	0,75	0,34	0,16	0,17	5,95	6,57
	KV (%)	67,1	54,6	29,4	29,6	71,6	230
Kruskal-W. test ( <i>p</i> )*		0,229	0,183	0,770	0,474	0,060	0,694

<sup>a,b,c</sup> – ANOVA: vrste medu se v parametru (povprečna vrednost), označenem z enakim nadpisanim indeksom statistično značilno ne razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

\* – vrste medu se statistično značilno razlikujejo med seboj v parametru (mediana), kjer je označena  $p < 0,05$

Vsi analizirani vzorci akacijevga (3) in cvetli nega medu (11), ki smo jih vzorili v trgovinah, so bili po izvoru mešanica medu, pridelanega v državah Evropske skupnosti in v državah, ki niso članice EU. Enako je veljalo tudi za sedem vzorcev gozdnega medu, osmi pa je izviral iz Slovenije.

Zanimalo nas je, ali se vzorci teh treh vrst v vsebnosti elementov razlikujejo od medu, pridelanega v Sloveniji. Analizo podatkov smo izvedli s *t*-testom (analiza variance in Levenov test homogenosti varianc) in ugotovili, da se vzorci akacijevga medu slovenskih čebelarjev in vzorci, pridelani drugod, statistično razlikujejo v vsebnosti Mn ( $p = 0,005$ ), Ni ( $p = 0,029$ ) in Zn ( $p = 0,037$ ). Slovenski cvetli ni med se je od vzorcev, ki so bili mešanica cvetli nega medu iz EU in drugih držav, razlikoval v vsebnosti K ( $p = 0,007$ ), Fe ( $p = 0,037$ ) in Ni ( $p = 0,002$ ). Vzorci gozdnega medu slovenskih čebelarjev in tisti, ki so izviral od drugod, so se razlikovali v vsebnosti Cl ( $p = 0,004$ ).

#### 4.6 REZULTATI MULTIVARIATNE ANALIZE VSEH ANALIZIRANIH PARAMETROV

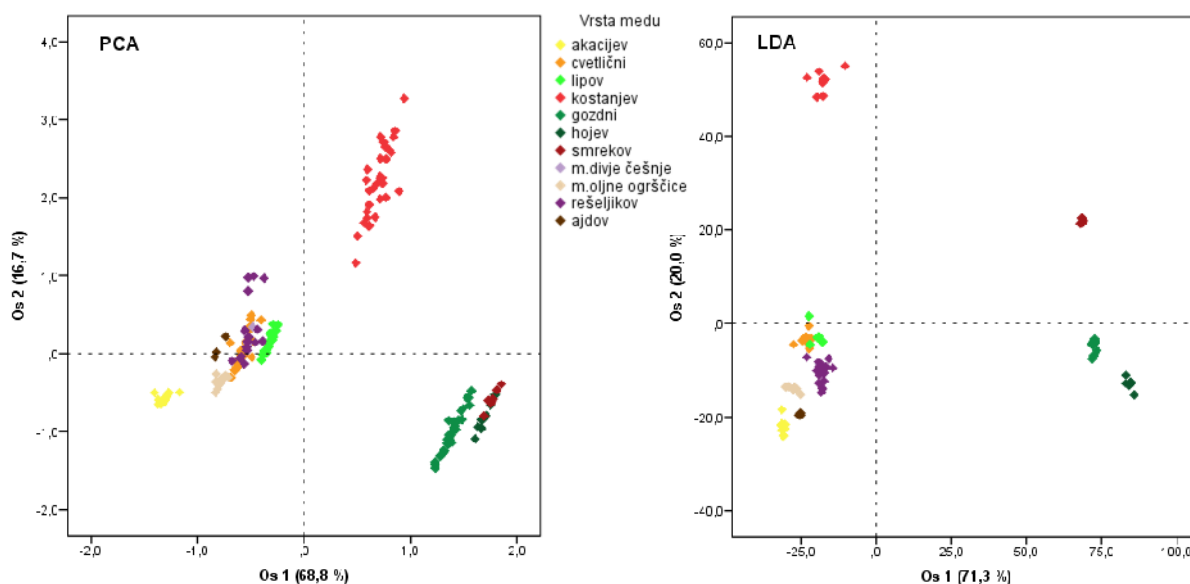
V multivariatno analizo smo vključili vrednosti vseh analiziranih parametrov v 229 vzorcih medu slovenskih čebelarjev, 79 vzorcih namerno potvorjenega medu in 70 vzorcih, ki smo jih vzorili v slovenskih trgovinah. Skupaj je bilo zajetih 73 različnih parametrov, saj smo poleg parametrov, ki smo jim vrednosti določili z analizo, vključili tudi nekatere, ki smo jih ovrednotili z izražanjem.

Pri obdelavi smo uporabili dve metodi, in sicer:

- metodo glavnih osi (PCA), s katero smo definirali tiste parametre, ki so največ prispevali k razlikovanju med vzorci glede na izbrani kriterij:
  - botani no poreklo,
  - pristnost medu,
  - geografski izvor.
- izbrane parametre in njihove vrednosti smo nato obravnavali z linearno diskriminantno analizo (LDA). Uporabljamo jo za razvrščanje vzorcev v skupine podobnosti, pokaže pa nam tudi, kako uspešno bi na osnovi izbranih parametrov klasificirali vzorec neznanega izvora.

#### 4.6.1 Botani no poreklo

Vse zbrane analitske in izražene parametre, določene v vzorcih enajstih vrst medu, ki smo jih dobili neposredno od slovenskih čebelarjev, smo obdelali z dvema multivariatnima metodama. Z metodo analize glavnih osi (PCA) smo zmanjšali število parametrov in izbrali tiste, ki največ prispevajo k razlikam med vrstami medu glede na njihovo botani no poreklo. Izbrane parametre smo nato obravnavali z linearno diskriminantno analizo, s katero preverimo tudi uporabnost izbranih parametrov za razvrščanje vzorcev glede na botani ni izvor.



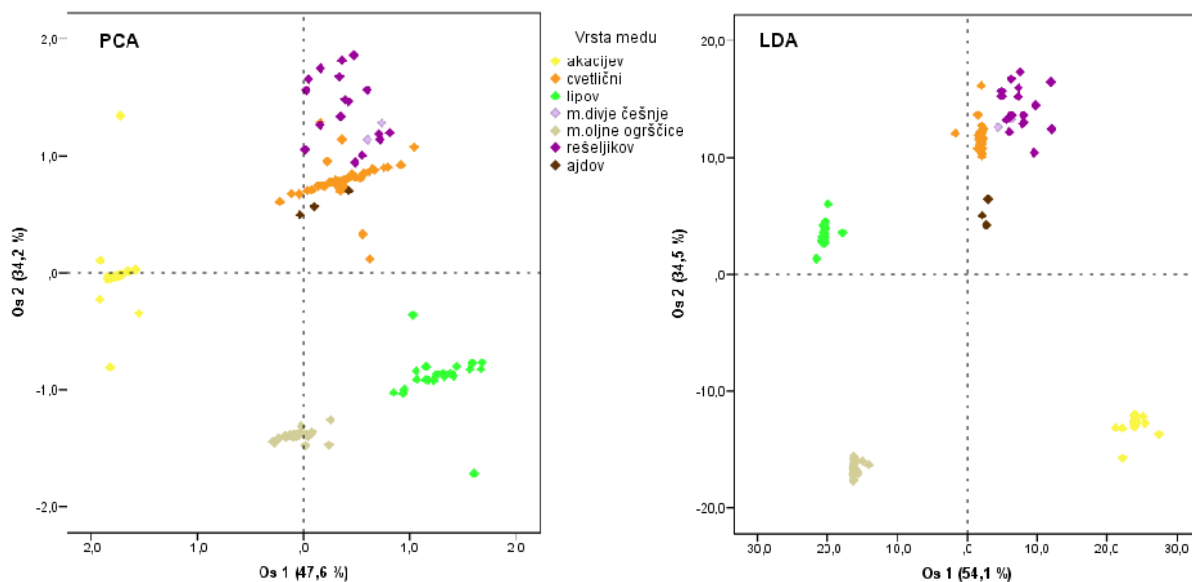
**Slika 25. Razlikovanje med 11 vrstami medu slovenskih čebelarjev z metodama PCA in LDA**  
**Figure 25. Discrimination among 11 types of honey from Slovenian beekeepers applying PCA and LDA method**

Na sliki 25 sta prikazani razporeditvi vzorcev medu glede na botani no poreklo. S parametri, ki predstavljajo prvi dve funkciji (os x in y) PCA, smo pojasnili 85,5 % variabilnosti med botani nimi vrstami medu. Parametri so bili naslednji: elektri na prevodnost, palatinoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, monosaharidi, trisaharidi, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur, K in Mn.

Razlikovanje med vrstami je bilo še boljše z LDA. Z izbranimi parametri je bilo glede na botani no poreklo pravilno uvrš enih 98,7 % vzorcev. Vzorci ve ine vrst so bili pravilno uvrš eni v celoti, medtem ko je bila polovica vzorcev medu divje ešnje uvrš ena med rešeljikov med, 11,8 % vzorcev rešeljikovega medu pa kot med divje ešnje.

### • Vrste medu iz nektarja

Kot je vidno na sliki 25, se je kostanjev med jasno lo il od ostalih vrst. Jasna je bila tudi lo itev maninih vrst medu od preostalih nektarnih, med slednjimi pa je bila lo ba nekoliko slabša. Zato smo opravili PCA in LDA s parametri vzorcev medu akacijevega, cvetli nega, lipovega, rešeljikovega in ajdovega medu ter medu divje ešnje in oljne ogrš ice. Razlikovanje med vzorci je prikazano na sliki 26. Na osnovi najvplivnejš ih parametrov (EP, SR, fruktoza, palatinoza, maltoza, melicitoza, K, Ca, Rb, monosaharidi, disaharidi, trisaharidi, Mono/Di, Mono/Tri, Di/Tri, Di/OH, Tri/OH) smo s PCA dosegli dobro razlikovanje med vzorci medu akacije, lipe in oljne ogrš ice. Vzorci divje ešnje in rešeljike so bili porazdeljeni na širšem obmo ju in v bližini cvetli nega in ajdovega medu. LDA test je v primerjavi s PCA osredoto en predvsem na razrede vzorcev in manj na celostno sliko izvornih podatkov, zato smo z njim dobili jasnejše razlikovanje med nektarnimi vrstami medu. Vzorci ajdovega medu so se lo ili od cvetli nega, od katerega so bili bolj oddaljeni tudi vzorci medu rešeljike.

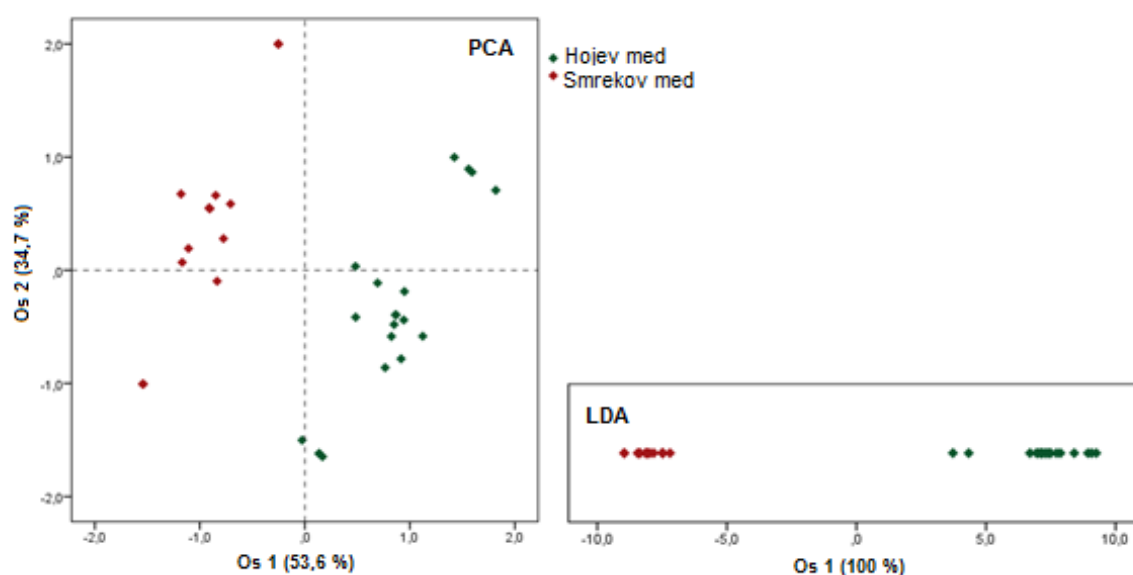


Slika 26. Razlikovanje med vrstami medu iz nektarja z uporabo metod PCA in LDA  
Figure 26. Discrimination among nectariferous honey types applying PCA and LDA test

### • Razlikovanje med smrekovim in hojevim medom

Na sliki 25 je razvidno, da se smrekov in hojev med na osnovi izbranih parametrov loita od gozdnega medu, razlikovanje med njima pa je bilo slabše. Vrednosti parametrov dolo enih v obeh vrstah smo dopolnili s podatki Kropfove (2009), da smo poveali število vzorcev, in opravili multivariatno analizo. Porazdelitev vzorcev hojevega in smrekovega medu je prikazano na sliki 27.

Uspešno razlikovanje med vzorci obeh vrst smo dosegli z naslednjimi parametri: erloza, fruktoza, maltoza, maltotrioza, palatinoza, pH, proste in skupne kisline, K, Rb,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ,  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , parameter barve  $a^*$ . Z izbranimi parametri, obravnavanimi z LDA, so bili vsi vzorci pravilno uvršeni glede na botanični izvor (hojev oziroma smrekov med).



Slika 27. Razlikovanje med vzorci hojevega in smrekovega medu na osnovi testov PCA in LDA  
Figure 27. Discrimination among fir and spruce honey samples applying PCA and LDA test

### 4.6.2 Geografsko poreklo

Na podoben način kot smo obravnavali parametre, določene v vzorcih medu, za iskanje razlik med vrstami in razvrščanje vzorcev v vrste, smo se lotili ugotavljanja morebitnih razlik med vzorci glede na njihovo poreklo. Pri trgovinskih vzorcih smo upoštevali poreklo kot je bilo navedeno na deklaraciji. Na osnovi tega smo oblikovali štiri skupine za poimenovanje geografskega izvora medu: Slovenija (sem so bili všteti tudi trgovinski vzorci z deklariranim slovenskim poreklom ter namerno potvorjeni vzorci), EU, druge države ter EU in druge države.

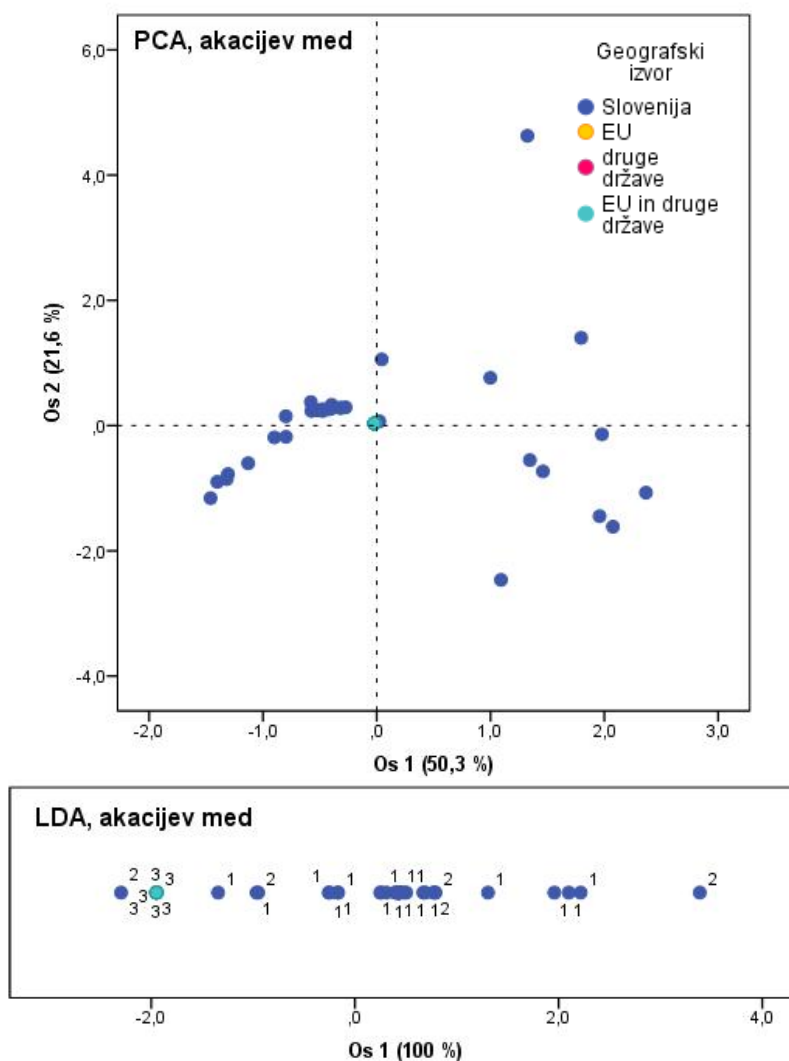
Podatke smo obravnavali ločeno za vsako botanično vrsto medu.

### • Akacijev med

Na sliki 28 je prikazana delitev vzorcev akacijevega medu glede na njihovo geografsko poreklo. Vzorci akacijevega medu so imeli deklarirano poreklo pridelave v državah EU, v državah izven EU, mešano poreklo (EU in izven EU), ter v Sloveniji. Vključili smo tako



pristine kot laboratorijsko potvorjene vzorce akacijevga medu. Na prikazu rezultatov analize LDA smo za boljšo primerjavo vzorce označili z indeksi 1 (slo. ebelarji), 2 (potvorjeni), 3 (trgovinski).

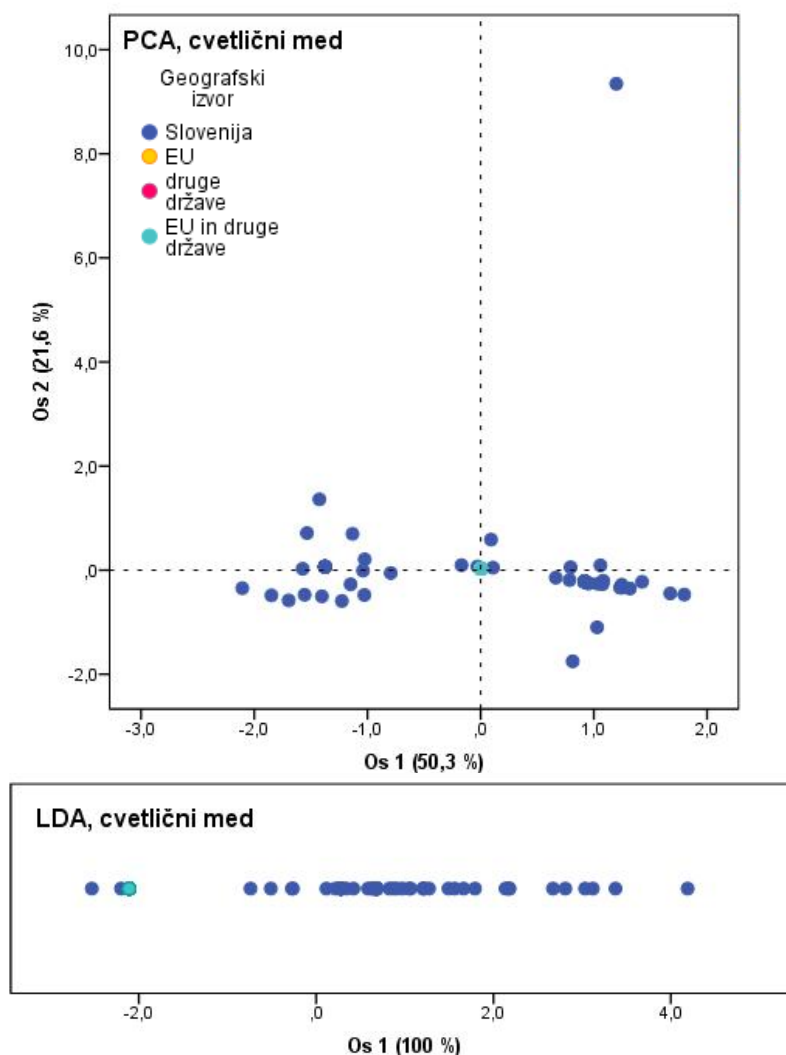


Slika 28. Razdelitev vzorcev akacijevga medu glede na geografsko področje pridelave  
Figure 28. Distribution of acacia honey samples according to the geographical region of production

V analizo smo vključili tudi laboratorijsko potvorjene vzorce medu, da bi ugotovili, kakšna je možnost razlikovanja med pristnimi, trgovinskimi in potvorjenimi vzorci akacijevga medu. Izbrani parametri: beljakovine, glukoza, palatinoza, erloza, maltotrioza, Glu, Asn, Gln, His, Ser, Gly, Thr, Val, Phe, VsotaAK, Tri/OH, Maltotri/Tur omogočajo ajo 79,5 % pravilno razvrščanje vzorcev. Na osnovi testa LDA s predstavljenimi parametri je bilo 5,4 % slovenskih vzorcev uvrščenih med vzorce deklarirane »proizvedeni v EU«, 8,1 % pa med vzorce, ki so imeli deklarirano poreklo proizvodnje v državah izven EU, medtem ko v skupino akacijevga medu mešanega porekla ni bil uvrščen nobeden od slovenskih vzorcev.

### • Cvetli ni med

Vzorci cvetli nega medu so se glede na področje pridelave, ki je bilo v skladu z zakonodajo, navedeno na embalaži, delili na: slovenske, med pridelan v državah EU, med mešanega porekla – iz držav EU in držav, ki niso članice Skupnosti ter med, pridelan izven EU. Na osnovi najvplivnejših parametrov: glukoze, palatinoze, gentibioze z melibiozo, melicitoze, erloze, rafinoze, maltotrioze, Asp, Asn, Gln, Ser, Pro, Lys, VsotaAK, monosaharidov, trisaharidov, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Maltotri/Tur so bili vzorci mešanega porekla uvrščeni v sredino, med pristne slovenske vzorce na eni strani in potvrjene, na drugi strani.



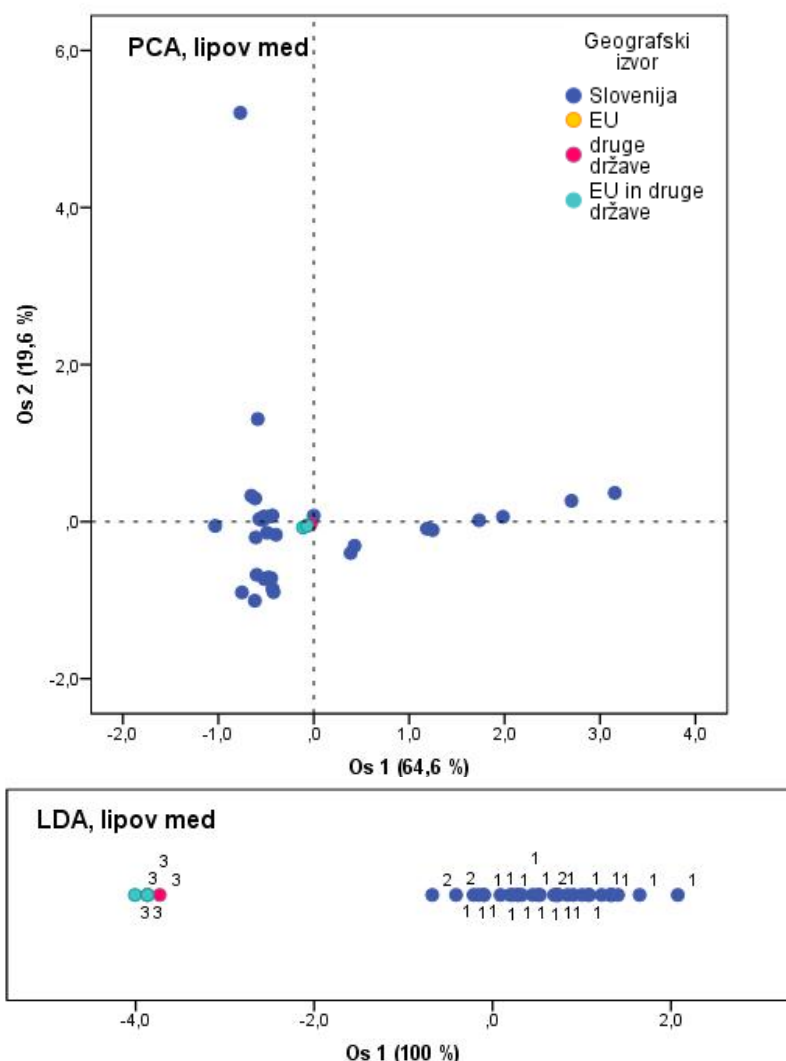
Slika 29. Razporeditev vzorcev cvetli nega medu glede na geografsko področje pridelave  
Figure 29. Distribution of multifloral honey samples according to the geographical region of production

Klasifikacija vzorcev cvetli nega medu po skupinah glede na geografski izvor, je bila uspešna v 73 %. Podobno kot pri akacijevem medu, je bilo skupno 5 vzorcev slovenskega cvetli nega medu uvrščenih v eno od preostalih treh skupin.

### • Lipov med

Vzorci lipovega medu so imeli deklarirano poreklo proizvodnje v državah izven EU oziroma so bili mešanica medu, proizvedenega v državah EU in izven njih. Preostali vzorci so izvirali iz Slovenije in smo jih pridobili neposredno od čebelarjev.

Na prikazu rezultatov analize PCA (slika 30) so trgovinski vzorci ponovno uvrščeni na sredini, med pristnimi in potrjenimi slovenskimi vzorci lipovega medu. Z izbranimi parametri: fruktoza, maltoza, melicitoza, erloza, maltotrioza, panoza, Val, Met, Allolle, Phe, VsotaAK,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , delež potvorbe, monosaharidi, disaharidi, Mono/Di, Di/Tri, Di/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur na prvih dveh oseh smo pojasnili 84,2 % variabilnosti med vzorci glede na njihovo poreklo proizvodnje.



Slika 30. Razporeditev vzorcev lipovega medu glede na geografsko področje pridelave

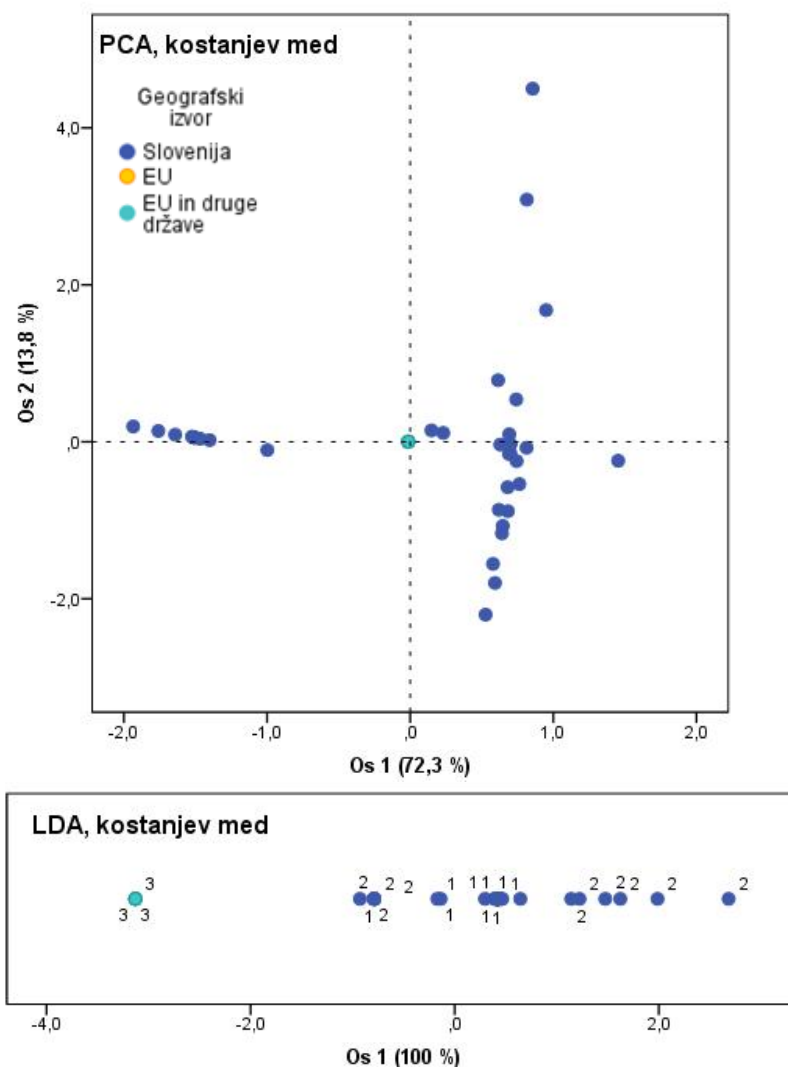
Figure 30. Distribution of linden honey samples according to the geographical region of production

Z LDA izbranih parametrov smo dobili uspešno razdelitev vzorcev z eno samo osjo. V tem primeru ni jasnega razlikovanja med slovenskimi potrjenimi in pristnimi vzorci (zato so

ozna eni z indeksom 1 oz. 2), jasno pa se lo ijo vzorci, pridelani drugod (indeks 3). Razlike med lipovim medom pridelanim v državah izven EU oziroma tistim z mešanim poreklom, niso opazne. Ugotovili smo, da izbrani parametri omogo ajo 94,4 % pravilno klasifikacijo vzorcev. 3,1 % slovenskih vzorcev lipovega medu je bil na osnovi izbranih parametrov uvrš en kot lipov med pridelan v EU, kamor je bilo uvrš eno tudi 50 % vzorcev z »mešanim« poreklom.

### • **Kostanjev med**

Vzorci kostanjevega medu so bili slovenskega izvora, trgovinski pa so imeli navedeno poreklo pridelave v državah Evropske skupnosti oziroma so bili mešanega izvora (iz držav EU in drugih držav).



**Slika 31. Razporeditev vzorcev kostanjevega medu glede na geografsko podro je pridelave**  
**Figure 31. Distribution of chestnut honey samples according to the geographical region of production**

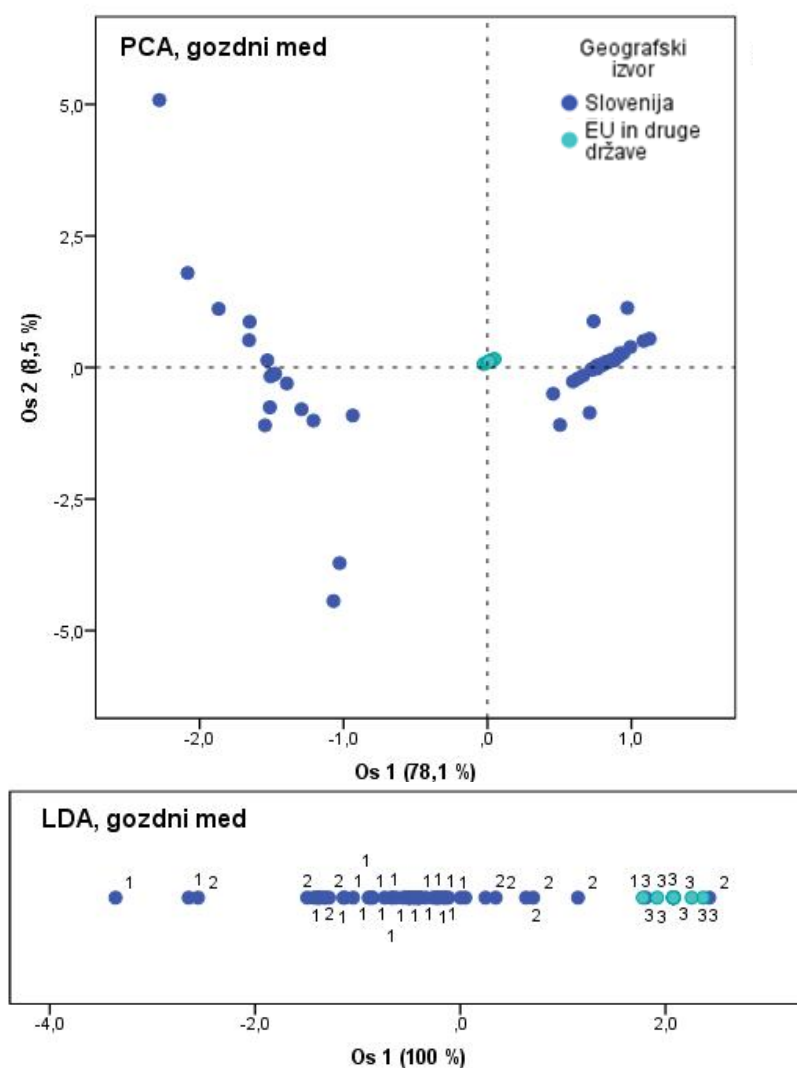
Z analizo glavnih osi smo izbrali najvplivnejše parametre: fruktozo, glukozo, turanozo, maltozo, melicitozo, erlozo, rafinozo, maltotriozo, Asp, Asn, His, Allolle, trisaharide,

Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur in dobili porazdelitev vzorcev kot je prikazana na sliki 31. Tudi v tem primeru so bili vzorci tujega porekla uvršeni med pristnimi, ki so zasedali desno polovico podroja grafa, in potvorjenimi slovenskimi vzorci.

Na prikazu rezultatov LDA je vidna jasna ločitev vzorcev tujega porekla (indeks 3) od slovenskih pristnih (indeks 1) in namerno potvorjenih (indeks 2) vzorcev že na prvi osi. Na osnovi izbranih parametrov je bilo 92 % vzorcev pravilno uvrščeno v skupino glede na področje pridelave. Tuji vzorci so bili v celoti pravilno uvrščeni, med slovenskimi vzorci kostanjevega medu pa je bilo 4,3 % uvrščenih kot med, pridelan v EU.

### • Gozdni med

Vzorci gozdnega medu so bili, glede na deklarirano poreklo, mešanega izvora, torej pridelani v državah EU in v državah, ki niso članice EU, ter v Sloveniji. S funkcijama na oseh 1 in 2 smo s PCA pojasnili 86,6 % variabilnosti med vzorci glede na geografski izvor.



Slika 32. Razporeditev vzorcev gozdnega medu glede na geografsko področje pridelave  
Figure 32. Distribution of forest honey samples according to the geographical region of production

Funkciji so predstavljali naslednji parametri: palatinoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, panoza, Asp, Asn, Gly, Thr, monosaharidi, disaharidi, trisaharidi, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur, Mono/Di, Di/OH, pH. Tuji vzorci so na prikazu v dvodimenzionalnem prostoru (vrhnji graf na sliki 32) uvršeni med pristne in potvorjene vzorce slovenskega porekla.

Z izbranimi parametri smo z LDA dobili 90,8 % pravilno uvršeno enost vzorcev. Med 64 slovenskimi vzorci jih je bilo 7 uvršeno kot med, pridelan v državah EU in izven njih. Vzorca gozdnega medu tujega porekla in kupljeni v trgovini (indeks 3) so se vsi, razen enega, ločili od vseh slovenskih pristnih vzorcev (indeks 1) te vrste medu, ter od vzorcev laboratorijsko potvorjenega gozdnega medu (indeks 2).

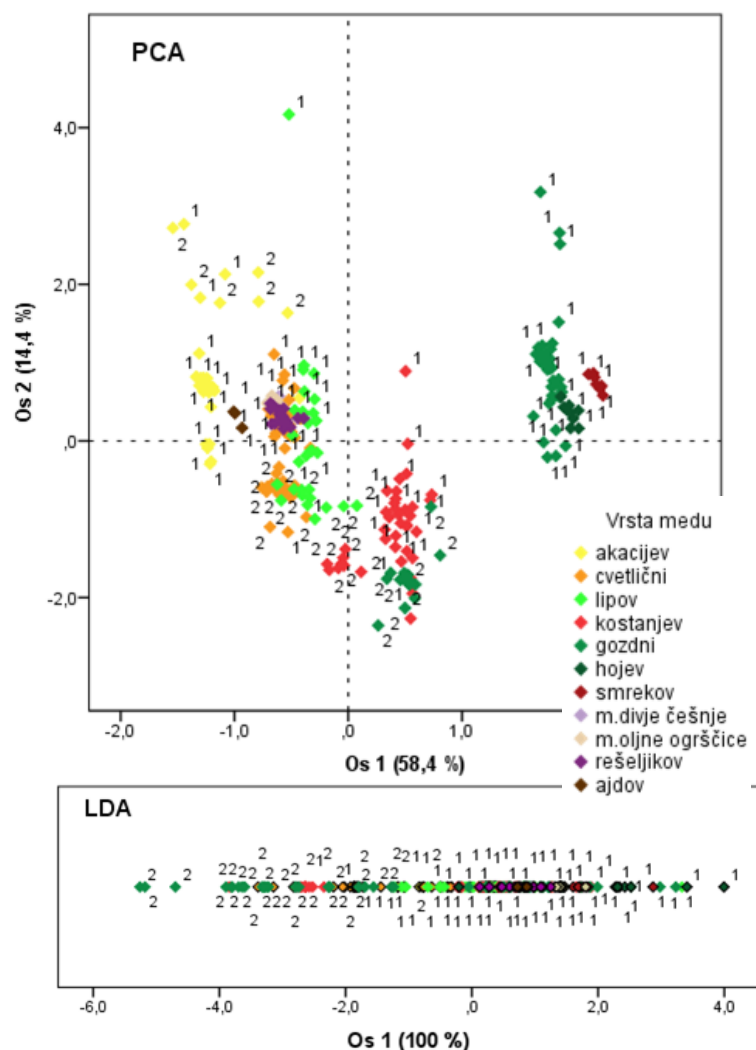
#### 4.6.3 Pristnost

Z multivariatnima metodama smo preverjali, ali se in kako se razlikujejo namerno potvorjeni vzorci medu od vzorcev pristnega medu. Najprej smo obravnavali podatke za vse vrste medu skupaj in nato v nadaljevanju ločeno glede na botanično poreklo medu. Pri obdelavi so bili vključeni vsi podatki, torej vključno s trgovinskimi vzorci medu.

Parametri, ki so najpomembneje prispevali k razlikovanju med pristnim in potvorjenim medom so bili: EP, gentibioza z melibiozo, maltoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, Asn, VsotaAK, monosaharidi, trisaharidi, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur. Rezultati porazdelitve vzorcev na prvih dveh oseh (PCA) so prikazani na sliki 33. S prvima dvema osemama smo pojasnili 72,8 % variabilnosti med pristnim in namerno potvorjenim medom. Ker je bilo v obravnavo vključeno 11 vrst medu, smo pristne (1) in potvorjene (2) vzorce dodatno označili s indeksom.

Podatke za izbrane parametre medu smo vključili v LDA analizo in ugotovili, da omogoča pravilnost klasifikacije vzorca glede na pristnost v višini 93,5 %. Od 229 vzorcev pristnega medu jih je bilo 9 uvršeno med potvorjene in 11 od 79 potvorjenih vzorcev je bilo uvršeno med pristne. Z linearno diskriminantno analizo parametrov, ki smo jih izbrali s PCA, smo že na prvi osi pojasnili celotno varibilnost med pristnimi in namerno potvorjenimi vzorci medu enajstih vrst, kot je to prikazano na spodnjem grafu na sliki 33.

Razlikovanje med pristnimi in potvorjenimi vzorci iste vrste je slabo razvidno, zato smo vzorce obravnavali še ločeno, glede na njihovo botanično poreklo.

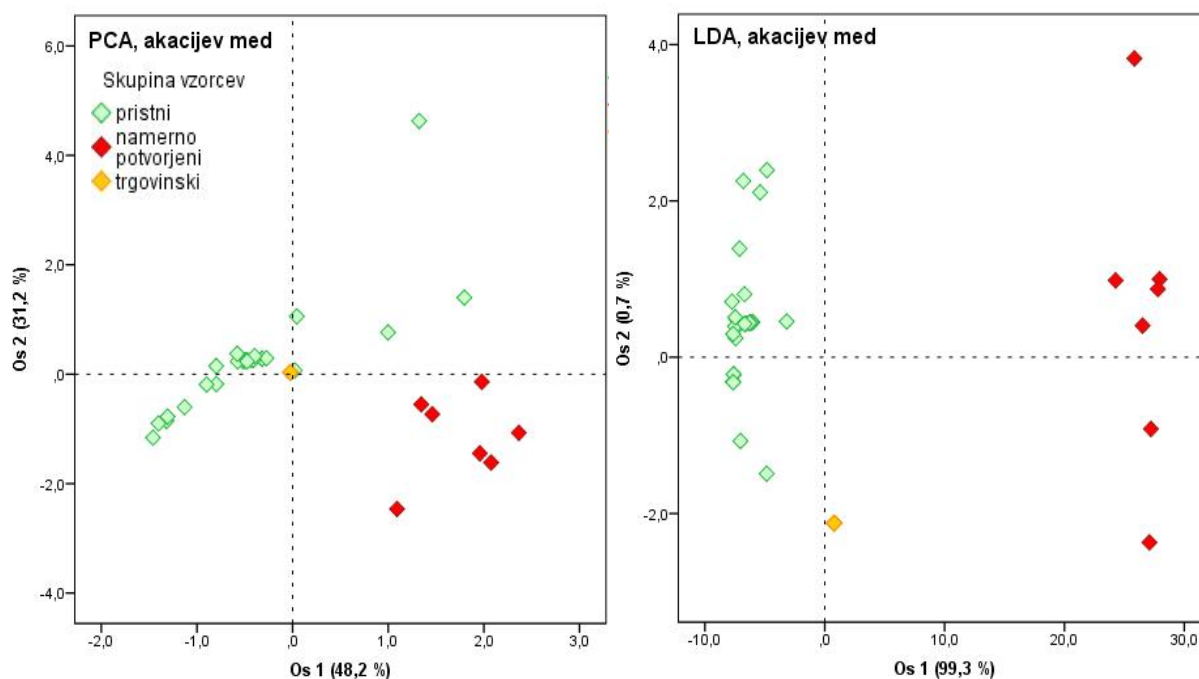


Slika 33. Porazdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev medu različnih vrst z metodo PCA in LDA  
Figure 33. Distribution of authentic and adulterated honey samples of different types applying PCA in LDA method

- **Akacijev med**

Na sliki 34 je prikazana porazdelitev vzorcev akacijevnega medu na osnovi najvplivnejših parametrov, ki so predstavljali prvi dve funkciji PCA. Z namenom, da se ohrani tudi informacija o tem, kako smo vzorce pridobili (od čebelarjev, v trgovini, potvorjeni), so vzorci ustrezno obarvani.

S parametri: glukoza, palatinoza, erloza, Asn, Glu, Thr, Tyr, Phe, Lys, VsotaAK, Maltotri/Tur, voda, pH, skupne kisline, laktoni, proste kisline, beljakovine smo na prvih dveh oseh pojasnili 79,4 % variabilnosti med pristnimi in potvorjenimi vzorci akacijevnega medu. Z metodo klasifikacije (LDA) smo z izbranimi parametri dosegli 100 % uvrstitev vzorcev med pristne oz. potvorjene.



Slika 34. Razdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev akacijevga medu z metodo PCA in LDA

Figure 34. Distribution of authentic and adulterated samples of acacia honey by PCA and LDA

#### • Cvetli ni med

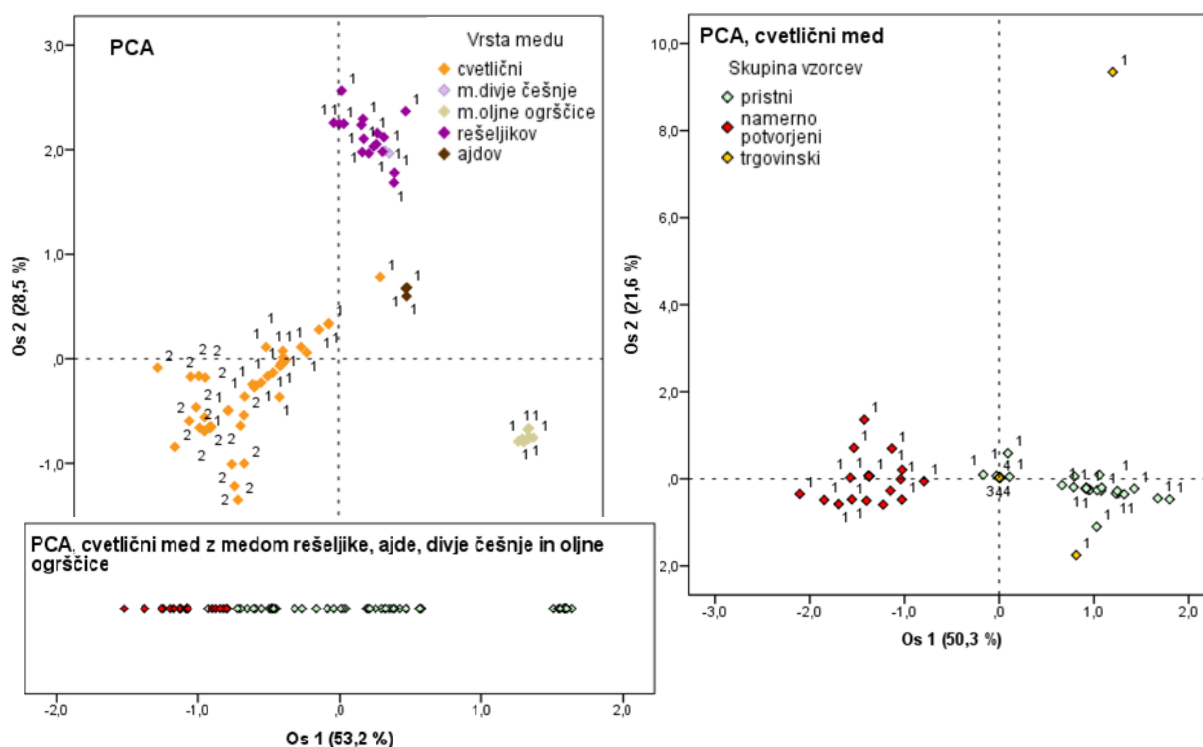
Pri obravnavi vzorcev cvetli nega medu smo vklju ili podatke za nektarne vrste medu, razen lipovega in kostanjevega, ki se od cvetli nega medu zna ilno razlikujeta že v senzori nih lastnostih. Na sliki 35 so prikazi razporeditev vzorcev glede na botani no poreklo (zgoraj levo), pri emer smo pristne vzorce ozna ili z indeksom 1 in potvorjene z 2.

Na desnem prikazu slike 35 so vzorci obarvani glede na skupino (pristni slovenski, namerno potvorjeni in trgovinski) ter ozna eni z indeksom, ki ozna uje njihov geografski izvor (1: Slovenija, 2: EU, 3: druge države, 4: EU in druge države).

S PCA smo izbrali naslednje najvplivnejše parametre: HMF, fruktozo, glukoza, palatinozo, maltozo, gentibiozo z melibiozo, melicitozo, erlozo, rafinozo, His, Ser, Arg, Trp, Ile, Mono/Di, Di/Tri. Ko smo podatke za izbrane parametre obdelali z LDA, smo dobili 100 % pravilno uvrstitev vzorcev. Razporeditev, z barvno ozna bo pristnih (zelena) in potvorjenih (rde a) je predstavljena v spodnjem delu slike 35.

Najpomembnejši parametri, ki so prispevali k razlikovanju med samimi cvetli nimi vzorci so bili: fruktoza, glukoza, palatinoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, saharoza, maltotrioza, Ser, Asp, Asn, Gln, Lys, VsotaAK, trisaharidi, Mono/Tri, Gent/Malt, Maltotri/Tur. Tudi v tem primeru smo z LDA dobili 100 % pravilno klasifikacijo vzorcev na pristne in potvorjene.



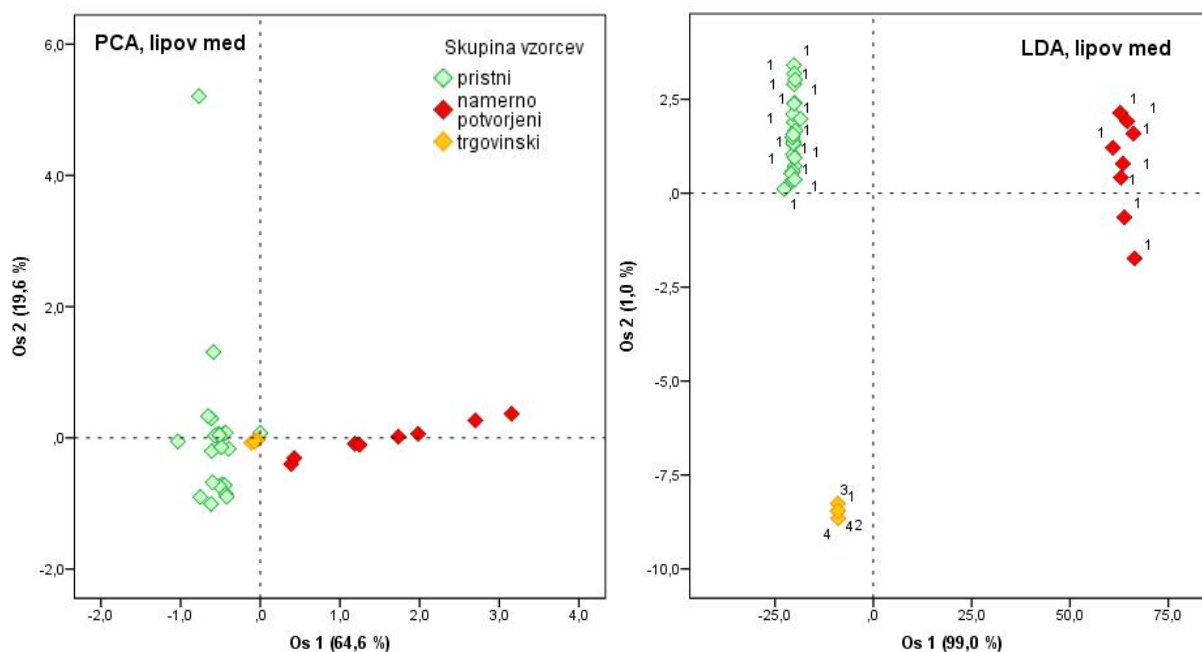


Slika 35. Razdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev cvetličnega medu z metodo PCA in LDA  
 Figure 35. Distribution of authentic and adulterated samples of multifloral honey by PCA and LDA

- **Lipov med**

Maltoza, melicitoza, maltotrioza, panoza, Val, Met, Allolle, Phe, VsotaAK,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , delež potvorbe, disaharidi, Mono/Di, Di/Tri, Di/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur so bili parametri, ki so predstavljali funkciji 1 in 2 PCA analize podatkov za vzorce lipovega medu. Na dveh oseh smo z njimi pojasnili 84,2 % variabilnosti med pristnim in potvorjenim lipovim medom. Porazdelitev vzorcev, med katere so vključeni tudi vzorci iz trgovin, je prikazana na sliki 36. Z LDA izbranih parametrov smo dosegli še boljše ločbo med pristnimi in namerno potvorjenimi vzorci, kot je razvidno na desnem prikazu slike 36. Za informacijo o geografskem poreklu vzorcev smo uporabili indekse 1 (Slovenija), 2 (EU), 3 (druge države) in 4 (EU in druge države).

Pri klasifikaciji vzorcev lipovega medu s podatki za izbrane parametre, so bili vsi vzorci pravilno uvrščeni v skupino pristnih oziroma potvorjenih.

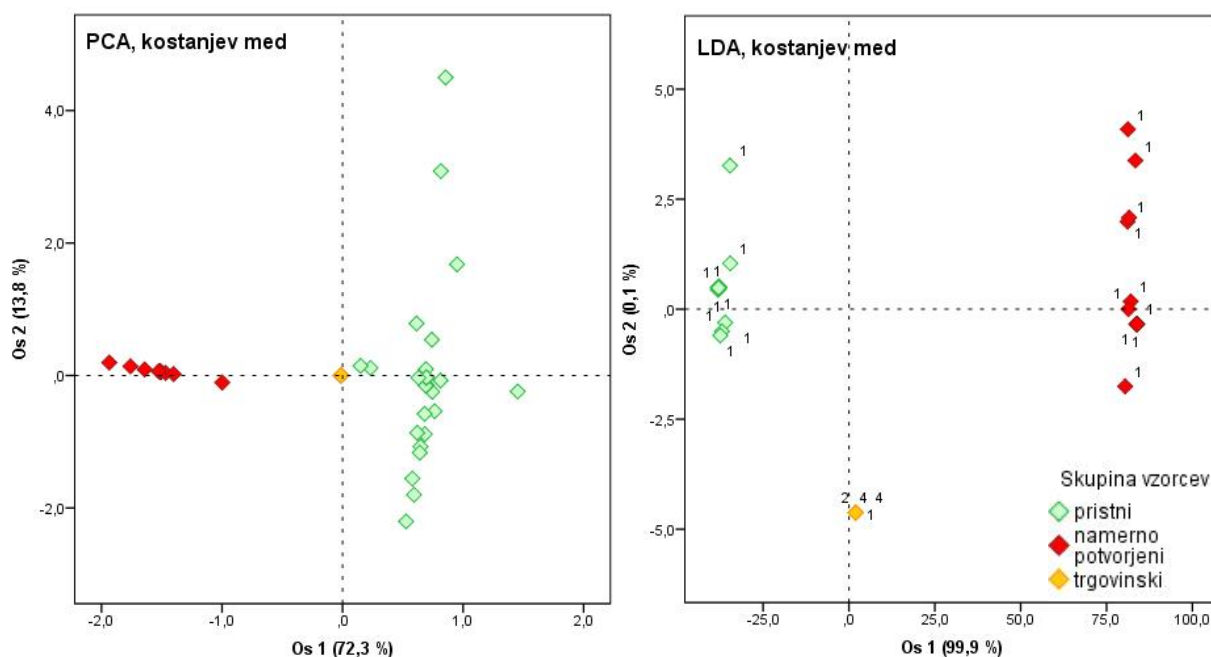


Slika 36. Razdelitev pristnih in potvorjenih vzorcev lipovega medu z metodo PCA in LDA  
Figure 36. Distribution of authentic and adulterated samples of linden honey by PCA and LDA

#### • **Kostanjev med**

Pri obravnavi vzorcev kostanjevega medu smo s PCA izbrali naslednje parametre: fruktozo, glukozo, turanozo, maltozo, melicitozo, erlozo, rafinozo, maltotriozo, trisaharide, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Maltotri/Tur, Asn, His, Phe. Pri klasifikaciji z LDA smo z uporabljenimi izbranimi parametri dosegli 100 % pravilno klasifikacijo vzorcev. Razporeditev vzorcev z obema multivariatnima metodama je prikazana na sliki 37. S PCA analizo in izbranimi parametri smo na dveh oseh pojasnili 86,1 % in z LDA 100 % variabilnosti med pristnimi in namerno potvorjenimi vzorci kostanjevega medu.

Ozna ba vzorcev na desnem prikazu slike 37 kaže, da je bil med trgovinskimi vzorci kostanjevega medu tudi vzorec, pridelan v Sloveniji (indeks 1), vendar se je na osnovi izbranih parametrov lo il tako od pristnih vzorcev, ki smo jih dobili neposredno od slovenskih ebelarjev, kot tudi od namerno potvorjenih vzorcev. Ostali trgovinski vzorci so bili pridelani v EU (indeks 2) oziroma so bili mešanica kostanjevega medu iz EU in drugih držav (indeks 4).

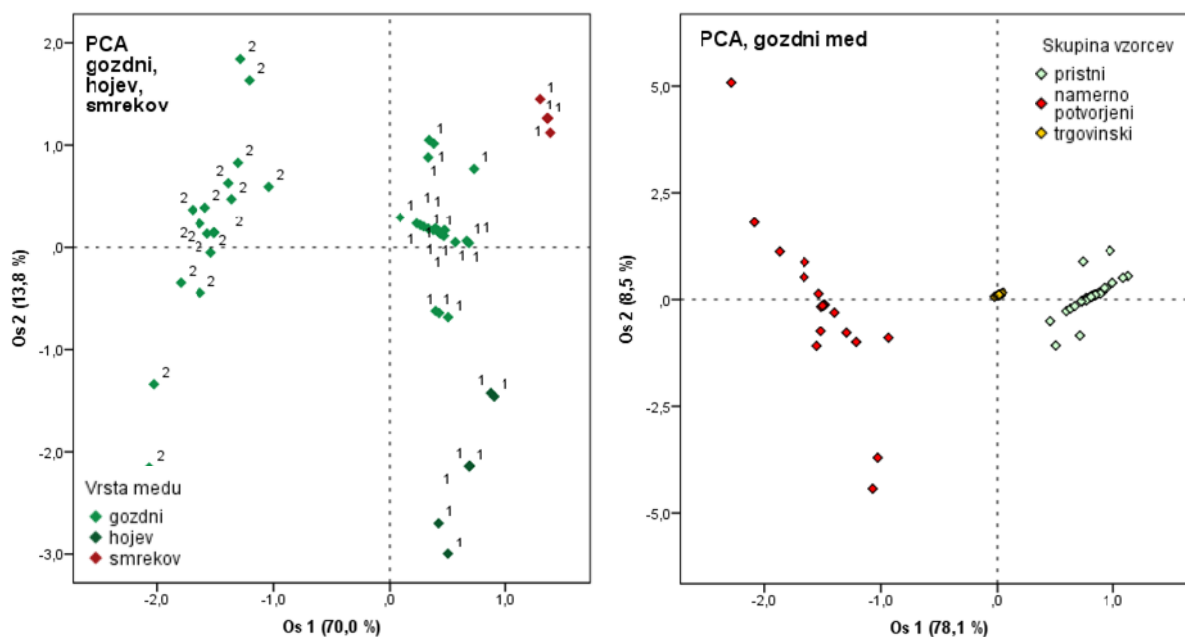


**Slika 37. Razporeditev pristnih in potvorjenih vzorcev kostanjevega medu z metodo PCA in LDA**  
**Figure 37. Distribution of authentic and adulterated samples of chestnut honey by PCA and LDA**

### • Gozdni med

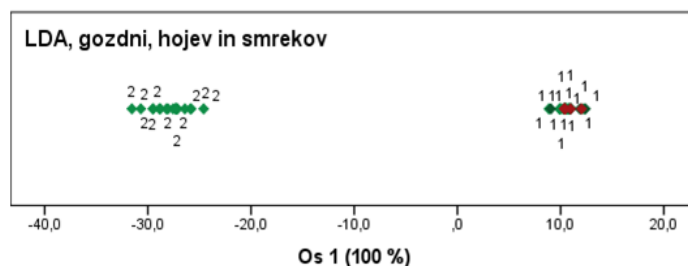
Podatke za vzorce gozdnega medu smo obravnavali skupaj z rezultati analiz za vzorce hojevega in smrekovega medu. Parametri z največjim vplivom na razlikovanje med pristnimi in potvorjenimi vzorci medu iz mane so bili: HMF, fruktoza, palatinoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, panoza, Asp, Asn, Gly, monosaharidi, disaharidi, trisaharidi, Mono/Tri, Di/Tri, Di/OH, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur. Na prvih dveh oseh smo s PCA pojasnili 83,8 % razlik med pristnimi in namerno potvorjenimi vzorci.

Na levem prikazu slike 38 je razporeditev pristnih (1) in potvorjenih (2) vzorcev z označenim botaničnim poreklom (gozdni, hojev, smrekov med). Desni prikaz predstavlja razporeditev vzorcev gozdnega medu, brez vzorcev smrekovega in hojevega medu, ki so obarvani glede na to, kako smo jih pridobili.



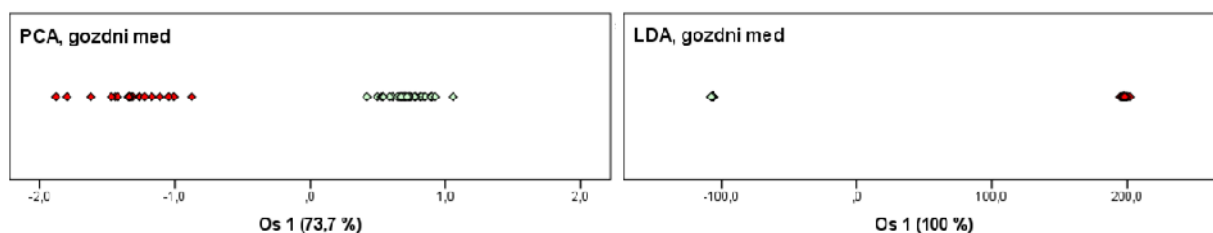
**Slika 38. Razporeditev pristnih in potvorjenih vzorcev gozdnega medu z metodo PCA**  
**Figure 38. Distribution of authentic and adulterated samples of forest honey by PCA**

Z LDA, pri kateri smo uporabili izbrane parametre za hojev, smrekov in gozdni med, je bila klasifikacija vzorcev na skupino pristnih in potvorjenih 100 % pravilna. Na sliki 39 je prikazana razporeditev vzorcev, pri kateri so botani ne vrste medu ozna ene z razli nimi barvami, pristnost pa z indeksoma 1 in 2.



**Slika 39. Razporeditev pristnih in potvorjenih vzorcev gozdnega medu z metodo LDA**  
**Figure 39. Distribution of authentic and adulterated samples of forest honey by LDA**

Pri obravnavi podatkov samo vzorcev gozdnega medu, smo s PCA izbrali naslednje vplivne parametre: HMF, palatinoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, panoza, disaharidi, trisaharidi, Mono/Di, Mono/Tri, Di/Tri, Di/OH, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur, Asp, Asn, Gly, Thr, VsotaAK, pH, laktoni,  $^{13}\text{C}$ , delež potvorbe. Zelo dobro razdelitev med pristnimi in potvorjenimi vzorci smo dobili že na prvi osi (73,7 %). Ko smo izbrane parametre obravnavali z LDA, je bilo vseh 39 pristnih in 21 potvorjenih vzorcev pravilno uvrš enih v svojo skupino. Porazdelitvi pristnih in namerno potvorjenih vzorcev z obema metodama sta prikazani na sliki 40.



**Slika 40. Razporeditev vzorcev gozdnega medu na prvi osi PCA in LDA**  
**Figure 40. Distribution of samples of forest honey on the first axis of PCA and LDA**

#### 4.7 OPIS SENZORI NIH LASTNOSTI REŠELJIKOVEGA MEDU

Za karakterizacijo senzori nih lastnosti rešeljikovega medu smo uporabili skupno 17 vzorcev medu te vrste letnikov 2008, 2009 in 2010. Senzori ni panel so sestavljali trije šolani preskuševalci, ki so ovrednotili senzori ne lastnosti medu rešeljike. Za opis videza smo uporabili opisnike za barvno lestvico medu, ovrednotili smo tudi bistrost medu. Vonj in aromo smo opisali s standardnimi opisniki, definiranimi v Kolesu vonjev in arom (Piana in sod., 2004). Pri okusu smo ovrednotili prisotnost in intenzivnost sladkega, kislega, grenkega in slanega okusa z naslednjimi opisniki: nezaznavno (oznaka 0), zaznavno (oznaka 1) šibko (oznaka 1), srednje (oznaka 2), mo no (oznaka 3) zaznavno. Podroben opis senzori nih lastnosti medu rešeljike je predstavljen v preglednici 35.

#### **Preglednica 35. Opis senzori nih lastnosti rešeljikovega medu**

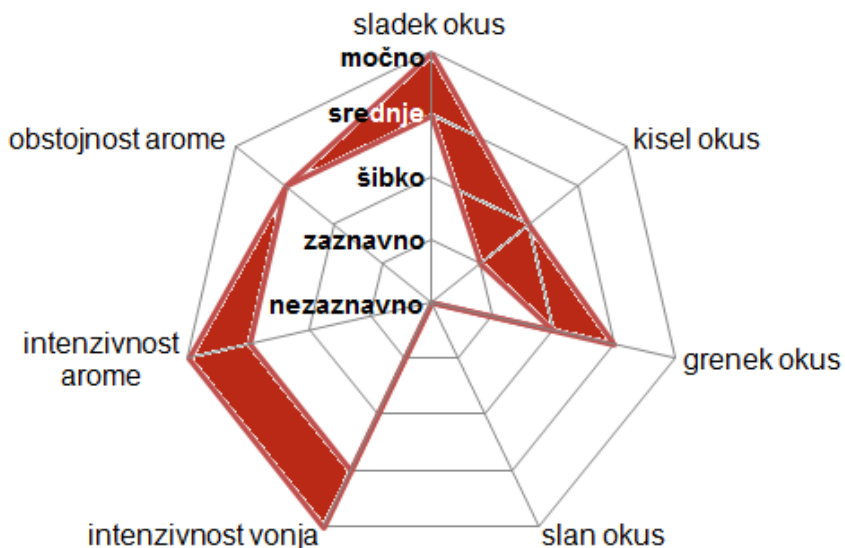
**Table 35. Description of sensory properties of *Prunus mahaleb* honey**

Senzori na lastnost	Opis	Oznaka intenzivnosti
Videz: barva	oranžno rjava do rde e rjava ali temno rde a	
bistrost	bister, v asih nekoliko moten *Kmalu za ne kristalizirati. Kristaliziran med je svetlejši in brez rde ega tona.	
Vonj: intenzivnost	srednja do mo na	2–3
opis	po grenkih mandljih, belem lepilu, ešnjevih cvetovih, karamelu	
Okus: sladek	srednje do mo no	2–3
kisel	zaznavno do šibko	)(–1
grenak	šibko do srednje	1–2
slan	nezaznavno	0
Aroma: intenzivnost	srednja do mo na	2–3
obstojnost	srednja	2
opis	po grenkih mandljih, pe enih ešnjah, ešnjevih cvetovih, zažganem sladkorju, karamelu	

Za rešeljikov med je zna ilna temnejša, rde e rjava ali temno rde a barva. Med je po to enju bister, vendar kmalu za ne kristalizirati v kompaktno strukturo z drobnimi kristali. Kristaliziran med je svetlejši, ima temno jantarno ali karamelno rjavo barvo. Vonj je srednje intenziven, po cvetovih ešnje in grenkih mandljih. Okus rešeljikovega medu je sladek, šibko kisel in šibko do srednje grenak grenak. Sladkost je manj intenzivna kot pri

akacijevem medu. Grenkoba je manj obstojna kot pri kostanjevem medu. Aroma je srednje do močno intenzivna in srednje dolgo obstojna. Spominja na ešnjeve cvetove, grenke mandlje, karamel, zažgan sladkor in pešnje.

Rezultate kvantitativne opisne analize vonja, okusa in arome običajno prikažemo s pajkogramom. Slika 41 prikazuje območja intenzivnosti naštetih senzoričnih lastnosti 17 vzorcev rešeljikovega medu, ki smo jih ovrednotili z metodo kvantitativne senzorične analize.



Slika 41. Prikaz značilnosti vonja, okusa in arome rešeljikovega medu, ovrednotenih s kvantitativno opisno analizo

Figure 41. Presentation of characteristics of odour, taste and aroma of *Prunus mahaleb* honey, determined with quantitative descriptive analysis

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Med je naravno živilo, zato se vsebnost posameznih sestavin v njem lahko spreminja, odvisno od botaničnega izvora, geografskega porekla in letine pridelave. Za ustrezno predstavitev značilnosti vrste medu je potrebno analizirati večje število vzorcev, različnih letnikov. Na ta način določimo povprečno vrednost nekega parametra in območja vrednosti, s katerimi lahko v nadaljevanju ocenjujemo kakovost posameznega vzorca medu te vrste. Kakovost medu v prvi vrsti ocenjujemo s parametri, ki jih predpisuje Pravilnik o medu (2011), ki je usklajen z evropsko direktivo o medu (Direktiva 2001/110/EC, 2002).

Po pravilniku lahko med, ki ima fizikalno-kemijske, senzorične in pelodne lastnosti medu določene botanične vrste, označimo z vrsto, na primer »Lipov med«. Zakonodajnih evropskih meril za lastnosti posamezne vrste medu ni, interna merila imajo le nekatere države, med katerimi ni Slovenije. Pri raziskavah in uradnem nadzoru kakovosti medu se zato sklicujemo na merila, dogovorjena v mednarodnih skupinah, kot je na primer Mednarodna komisija za med (IHC) ali merila posameznih držav, vendar to predstavlja veliko oviro v primeru vzorca, pri katerem so ugotovljena večja neskladja.

Zaradi velike vsebnosti sladkorjev se med v prvi vrsti uporablja kot sladilo, vendar pa ima zaradi svojih lastnosti tudi druge funkcije, npr. prebiotično, antimikrobno in antioksidativno. To naravno živilo, sladilo ima zaradi načina pridelave in svojih lastnosti veliko višjo ceno kot ostala sladila, ki jih uporabljamo v prehrani, zato je pogosto predmet potvorb z dodatki cenenejših snovi. Vsebnost vode v medu je s Pravilnikom o medu (2011) omejena na največ 20 g/100 g, poleg tega v medu z večjo vsebnostjo vode hitreje nastopi proces vrenja in je tak med zato manj obstojen. Namesto dodajanja vode, ki je dokaj enostavno dokazljivo, se zato pri goljufijah največkrat uporabljajo ceneni sladkorni sirupi: fruktozno-glukozni, koruzni sirup z visokim deležem fruktoze (HFCS), rižev, trsni, pesni sirup. Zaradi naravne variabilnosti medu, je dokazovanje prisotnosti sladkornega sirupa v medu v deležih, nižjih od 10 %, pogosto težavno. Dokazovanje prisotnosti sirupov, izdelanih iz rastlin s tako imenovanim C4 ciklom fiksacije ogljika, je zaradi večjih razlik v razmerju stabilnih izotopov ogljika med medom in sirupi zanesljivejše in bolj obutljivo. Težje pa z analizo stabilnih izotopov ogljika potrdimo prisotnost manjših količin in pesnega ali riževega sirupa v medu, saj je za te rastline, enako kot za medonosne rastline na našem področju, značilen Calvinov ali C3 cikel, v katerem iz CO<sub>2</sub> nastaja glukoza.

Sladkorni sirup lahko zaide v med tudi nenamerno, zaradi tehnologije ebelarjenja.

Ebelarji namreč lahko v obdobju, ko je paša za ebele skromna, npr. v začetku pomladi, ebelam dodajajo hrano, v kateri glavno surovino predstavljajo ogljikovi hidrati. Pogosto za krmljenje uporabljajo raztopino saharoze, ki jo, zaradi nižje cene in prisotnosti za uporabo, v zadnjih letih velikokrat zamenjajo s sladkornimi sirupi. Možnost za prenos ebelje krme (npr. sladkornega sirupa) iz plodišča v medišče je večja pri klasični slovenski tehnologiji ebelarjenja z AŽ panji, za katero je značilna metoda prevešanja. Tveganje za tovrstno tehnološko napako obstaja tudi pri ebelarjenju z nakladnimi panji, kadar se uporablja omenjena metoda (Nordin in Kandolf, 2012). Kljub temu, da je tovrstna tehnološka napaka bila storjena nenamerno, pridelan med, ki vsebuje sladkorni sirup, ni pristen, marveč ga smatramo za potvrjenega. O namernosti oziroma nenamernosti bi lahko razpravljali tudi v primeru neustrezno deklariranega botaničnega izvora medu. V primeru,

ko ugotovimo, da se senzori ne, fizikalno-kemijske in pelodne lastnosti medu ne skladajo z deklariranim botaničnim poreklom, je nedvoumno, da je tak med napačno označen, kar je v nasprotju z zakonodajo in zavajajoče za kupca. Tudi tako napako uvrščamo med potvorbe, saj so nekatere botanične vrste medu bolj cenjene od drugih. Večjo ceno pa dosegajo tudi živilski izdelki z zaščitnimi oznakami, zato je potvorba tudi, če je napačno naveden geografski izvor medu, oziroma je z zaščitno oznako opremljen med, ki v tistem področju sploh ni bil pridelan.

Potvorbe medu so zelo raznovrstne, zato je za njihovo odpravljanje in dokazovanje potrebno dobro poznavanje tako senzoričnih kot tudi fizikalno-kemijskih in pelodnih lastnosti medu. Dobro poznavanje posamezne vrste medu si lahko zagotovimo le z analizo večjega števila parametrov, ki jih določimo v reprezentativnem številu vzorcev medu vsake vrste iz več različnih let pridelave. Namen raziskave je bil analizirati večje število vzorcev najpogostejših vrst medu v Sloveniji, pridelanih v treh letih, in s podatki dopolniti bazo podatkov o sestavi slovenskega medu. Poleg tega smo z raziskavo želeli ugotoviti, ali lahko z dostopnimi analitskimi metodami in razpoložljivo opremo dokažemo potvorbe medu s sladkornim sirupom v deležih med 5 in 10 %. V ta namen smo izbrali značilne vzorce akacijevga, cvetličnega, lipovega, kostanjevega in gozdnega medu ter jim dodali znano količino fruktozno-glukoze, glukoze in invertnega sirupa. Tretji sklop raziskave je predstavljal določanje kakovosti medu, ki je na prodaj v slovenskih trgovinah. Večino so predstavljali vzorci, ki niso bili pridelani v Sloveniji. Trgovine namreč ponujajo med različnih proizvajalcev in trgovskih znamk v različnem cenovnem obsegu. Pogosto je tak med bistveno cenejši od medu, ki ga neposredno prodajajo slovenski čebelarji in za katerega veljajo priporočene cene od 6,60 € za 900 g cvetličnega medu do 8,30 € za isto količino smrekovega ali hojevega medu. Ob nekonkurenčnih cenah medu slabo definiranega geografskega izvora (sicer skladno z Direktivo Sveta 2001/110/ES o medu, 2002) se zato pogosto porajajo dvomi o kakovosti takšnega medu.

Z analizo uradno predpisanih parametrov kakovosti smo ugotovili, da je nekaj od 230 vzorcev medu, ki smo jih dobili neposredno od čebelarjev, odstopalo od predpisanih vrednosti. Trije vzorci cvetličnega medu so imeli previsoko električno prevodnost za med iz nektarja, v enem od vzorcev te vrste smo ugotovili prenizko aktivnost diastaze. Z ANOVO smo ugotovili, da so se vrste medu med seboj razlikovale v vsebnosti vode, prostih in skupnih kislin ter laktonov. Z neparametričnim testom smo ugotovili še razlike med vrstami medu v preostalih analiziranih parametrih: električni prevodnosti, diastaznem številu, vrednosti pH, vsebnosti fruktoze in glukoze, saharoze in HMF. Vsebnost HMF in diastazno število sta pokazatelja svežosti in nepregretosti medu. Za razlike v aktivnosti diastaze in vsebnosti HMF med različnimi vrstami medu ni odgovorno le njihovo botanično poreklo, marveč so lahko tudi posledica segrevanja kristaliziranega medu v procesu embaliranja (White, 1978). Značilne razlike v osnovnih fizikalno-kemijskih parametrih so ugotovili tudi Bentabol in sodelavci (2011) med medom iz mane in medom iz nektarja. Lazarevič s sodelavci (2012) je ugotovila, da se srbski akacijev, sončnični in lipov med značilno razlikujejo v vsebnosti vode in prostih kislin, električni prevodnosti, vrednosti pH in optični rotaciji. Šarič in sodelavci (2008) so dokazali, da je z analizo osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov, dopolnjeno z določanjem vsebnosti pepela in aktivnosti invertaze, in z uporabo statistične analize glavnih osi (PCA) mogoče zadovoljivo razlikovati med akacijevim, kostanjevim, cvetličnim in travniškim medom.



Vrednosti uradno predpisanih fizikalno-kemijskih parametrov smo določili tudi v 79 vzorcih laboratorijsko potvorjenega medu in v 70 vzorcih medu, ki smo jih kupili v trgovinah. Na osnovi analiziranih parametrov bi težko zaključili, da je bil kateri od vzorcev z dodanim sirupom resnično potvorjen. Od meril so odstopali edino vzorci gozdnega medu s 4 % in več dodanega invertnega sirupa, ki so vsebovali preveč saharoze. Med trgovinskimi vzorci so bila ugotovljena nekatera neskladja med deklaracijo in njihovimi lastnostmi. Osem jih je imelo za deklarirano vrsto neznačilne senzorične lastnosti, štiri vzorci previsoko ali prenizko električno prevodnost za svojo vrsto, pet jih je vsebovalo preveč saharoze. Vsebnost HMF je bila presežena v šestih vzorcih, eden pa je imel prenizko diastazno število. Podobno kot so ugotovili Nasiruddin Khan in sodelavci (2005), lahko tudi za med v Sloveniji zaključimo, da je tisti iz lokalne proizvodnje kakovostnejši (glede na osnovne fizikalno-kemijske parametre) od medu v trgovinah.

Merila za parametre kakovosti medu tako zakonodajno določene kot vse preostale, ki odražajo kakovost ali pristnost medu, temeljijo na velikem številu analiziranih vzorcev različnih vrst. Posamezni laboratoriji interno ali pa v nacionalnem merilu analitične podatke zbirajo v obsežnih nacionalnih podatkovnih bazah. S pomočjo teh podatkov in multivariatnih statističnih metod je mogoče razlikovanje med vzorci medu glede na botanično ali geografsko poreklo. Omogočajo tudi preverjanje pristnosti vzorca medu, ki je zaenkrat še premalo zanesljivo le z enim ali nekaj več parametri.

V vseh vzorcih, vključno s tistimi v raziskavo, smo določili še dodatne parametre, in sicer vsebnost mono-, di- in trisaharidov, posameznih elementov, aminokislin, skupnih beljakovin in razmerja izotopov ogljika v medu in v proteinih ter razmerje izotopov dušika v proteinih izoliranih iz medu. Analitične podatke smo obdelali s parametričnimi, z neparametričnimi ter multivariatnimi testi, s katerimi smo ugotavljali razlike med vrstami medu. Slovenski akacijev, cvetlični, lipov, kostanjev, gozdni, hojev, smrekov, rešeljikov med, med divječešnje in oljne ogrščice so se značilno razlikovali v sestavi posameznih saharidov, razen izomaltotrioze, katere vsebnost je bila v vseh vzorcih pod mejo kvantifikacije. Do podobnih ugotovitev smo prišli v predhodni raziskavi slovenskega medu (Korošec in sod., 2009) in o tem poročajo tudi različni tuji avtorji (Mateo in Bosch-Reig, 1998; Cotte in sod., 2004; Kukurova in sod., 2008; Ouchemoukh in sod., 2010; de la Fuente in sod., 2011). Podobno kot drugi avtorji (Cordella in sod., 2003; Cotte in sod., 2003; Nozal in sod., 2005) smo ugotovili, da se vrste medu razlikujejo v razmerjih med vsebnostmi posameznih sladkorjev ali skupin saharidov. Z multivariatnimi testi smo ugotovili, da se v vsebnosti posameznih saharidov kostanjev, gozdni, hojev in smrekov med zelo dobro ločijo od ostalih vrst medu.

V pristnih vzorcih medu smo določili tudi območja povprečnih vrednosti za razmerja izotopov ogljika v medu,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ , od  $-26,7$  do  $-22,4$  ‰. Zelo podobne vrednosti so določili tudi Kukurova in sodelavci (2008). Medtem ko je razmerje izotopov ogljika v medu odvisno predvsem od načina fiksacije ogljika v rastlini, je razmerje izotopov ogljika v proteinih medu odvisno od klimatskih in geografskih pogojev kot tudi letnega obdobja pridelave medu (Schellenberg in sod., 2010). Avtorji so v medu iz različnih področij Evrope določili območja  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ , od  $-26,8$  do  $-24,2$  ‰. V slovenskih vrstah medu smo določili tudi med  $-26,0$  v smrekovem medu in  $-22,9$  ‰ v medu divječešnje, s katerimi bi lahko potrdili teorijo, da vrednost  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  narašča s številom sončnih dni in povprečno temperaturo ter se

zmanjšuje z naraščanjem zračne vlage. Naš med divje čuje je namreč izviral s primorskega področja, medtem ko so vzorci smrekovega medu prišli iz alpskega in predalpskega območja.

Vsebnost maltoze bi lahko bila pokazatelj pristnosti medu (Abdel-Aal in sod., 1993; Kukurova in sod., 2008). Veje kolonije so posledica prisotnosti sladkornega sirupa, saj sirupi po vsebini vsebujejo več maltoze kot med. Zvezo med dodanim sirupom v medu in vsebnostjo maltoze smo opisali z eno bo regresije. Značilna je bila pozitivna zveza z močnim determinacijskim koeficientom, izjema je bil edino invertni sirup, ki tega disaharida ni vseboval.

Pri obdelavi podatkov za veliko število parametrov se pogosto poslužujemo multivariatnih metod, s katerimi zmanjšamo število parametrov na tiste, ki najpomembneje prispevajo k razlikovanju med vzorci oziroma lahko s pomočjo ustrezne metode in izbranih parametrov uvrstimo neznane vzorcev v naprej definirano skupino.

Ugotovili smo, da se vrste medu med seboj najbolj jasno ločijo na osnovi naslednjih parametrov: električna prevodnost, palatinoza, gentibioza z melibiozo, melicitoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, K, Mn, monosaharidi, trisaharidi, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Gent/Malt, Maltotri/Tur. Pri razlikovanju med posameznimi vrstami medu iz nektarja je bila pomembna tudi optična rotacija in vsebnost K, Ca, Rb, medtem ko smo kot najvplivnejše parametre za razlikovanje med hojevim in smrekovim medom izluščili naslednje: erloza, fruktoza, maltoza, maltotrioza, palatinoza, pH, proste in skupne kisline, K, Rb,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ,  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , parameter barve  $a^*$ .

Pri ugotavljanju razlik med medom slovenskih čebelarjev in medom, ki smo ga kupili v trgovinah (med katerim je bila večina vzorcev medu pridelanih izven Slovenije), smo določili naslednje parametre, v katerih se ti dve skupini medu najbolj ločita: melicitozo, rafinozo, Maltotri/Tur, Tri/OH, glukozo, erlozo, maltotrioza, Mono/Tri, Di/Tri, Gent/Malt,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Asn, Asp, ter vsoto aminokislin in vsoto monosaharidov.

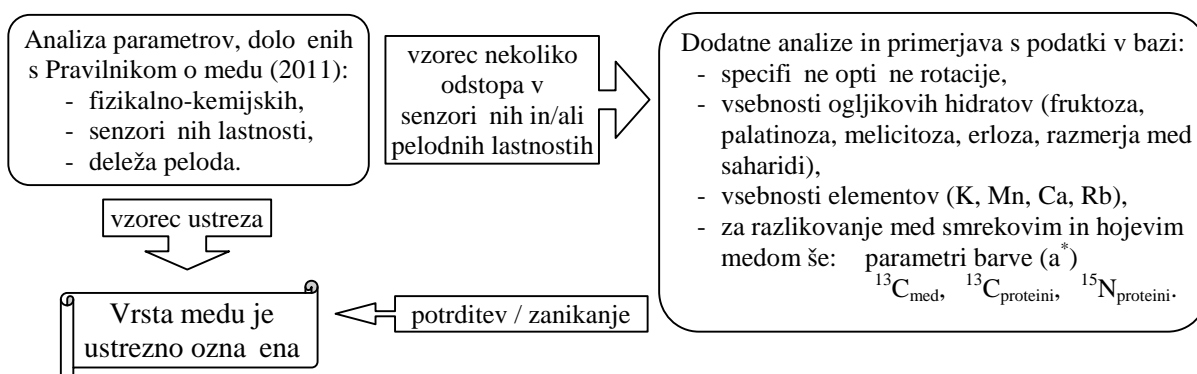
Kukurova in sodelavci (2008) so pri primerjavi pristnih in potvorjenih vzorcev medu kot parametre diskriminacije določili: proste kisline, EP, fruktozo, F+G, glukozo, HMF, maltozo, pH, prolin, F/G, razmerje glukoza/voda, lomni količnik, saharozo, vodo. V naši raziskavi smo za razlikovanje med pristnimi in potvorjenimi vzorci predlagali naslednje parametre: EP, gentibioza z melibiozo, maltoza, erloza, rafinoza, maltotrioza, Asn, VsotaAK,  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , monosaharidi, trisaharidi, Mono/Tri, Di/Tri, Tri/OH, Gent/Malt in Maltotri/Tur. Klasifikacijo vzorcev smo opravili z metodo LDA, ki sta jo za namen preverjanja čebelnega vzorca z deklaracijo določile vrste v to vrsto resnično sodi, predlagala tudi Oliveri in Downey (2012).

Preverjanje pristnosti medu s stališča prisotnosti sladkornih sirupov je zelo kompleksno, saj ni na voljo ene same metode, s katero bi lahko zanesljivo potrdili potvorjenost vzorca. Velikokrat vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov, ki so definirani s Pravilnikom o medu (2011) ne pokažejo odstopanj, ki jih morda s senzorično analizo zazna šolan panel preskuševalcev. Odstopanja se lahko kažejo tudi pri pregledu pelodne slike v (pre)majhnem številu pelodnih zrn. V vzorcu, ki ga sumimo, da je v njem prisoten sladkorni sirup, je potrebno določiti razmerje izotopov ogljika v medu in v izolatu proteinov. Poleg tega izrazimo še razliko med razmerjem izotopov v medu in proteinih. Glede na rezultate raziskave, se pristen in potvorjen med razlikujeta tudi v vsebnosti nekaterih saharidov in aminokislin. Zbrane vrednosti analiziranega vzorca primerjamo z

vrednostmi značilnih vzorcev za vrsto medu iz podatkovne baze in pri tem uporabimo multivariatne statistične metode. V preteklih letih je bilo v velikem številu vzorcev medu z dodanim sirupom ugotovljeno, da vsebujejo  $\alpha$ -fruktofuranozidazo – t.i. tujo invertazo, ki se uporablja pri razgradnji škroba v sladkorni sirup (Beckmann in sod., 2010). Poleg tega je bil velik napredek dosežen tudi na področju določanja razmerja izotopov ogljika v medu in njegovih sladkornih frakcijah, vendar pa pri tem strokovnjaki poudarjajo, da je zelo pomembno dobro poznavanje sestave pristinega medu različnih botaničnih vrst in naravne variabilnosti (Elflein in Raetzke, 2008).

Na osnovi analiziranih fizikalno-kemijskih parametrov in uporabe kemometrijskih metod, s katerimi smo določili parametre, v katerih se slovenske vrste medu med seboj najbolj razlikujejo, predlagamo za preverjanje pristnosti tri protokole analiz, in sicer protokol za preverjanje ustreznosti deklariranega botaničnega porekla, za preverjanje pravilnosti deklariranega geografskega izvora in za preverjanje morebitne prisotnosti tujih snovi v medu oziroma potrditev s sladkornim sirupom. Predlagani protokoli so bili oblikovani na osnovi vrednosti pristnih (slovenskih), trgovinskih in namerno potvorjenih vzorcev medu (skupaj 379 vzorcev), ki smo jih analizirali v sklopu raziskave. Ne glede na obravnavano področje preverjanja pristnosti, mora vzorec medu brezpogojno ustrezati zahtevam Pravilnika o medu (2011).

- o Pristnost z vidika označbe botaničnega porekla medu: Pravilnik o medu predpisuje označbo evanjskega medu, namenjenega potrošnikom, v 4. členu. Pogoji za navedbo botaničnega izvora medu oziroma vrste medu so navedeni v prvi alineji točke 2.b) tega člena: »Ime Med se lahko dopolni z navedbo oznake, ki se nanaša na izvor iz cvetov ali rastlin, če med izhaja v celoti ali pretežno iz navedenega izvora in ima njegove senzorične, fizikalno-kemijske in mikroskopske lastnosti«. Vrsten med mora tako vsebovati značilno delež peloda vodilne botanične vrste, imeti mora tipične senzorične lastnosti ter ustrezati z vrednostmi fizikalno-kemijskih parametrov, ki jih določa Pravilnik.



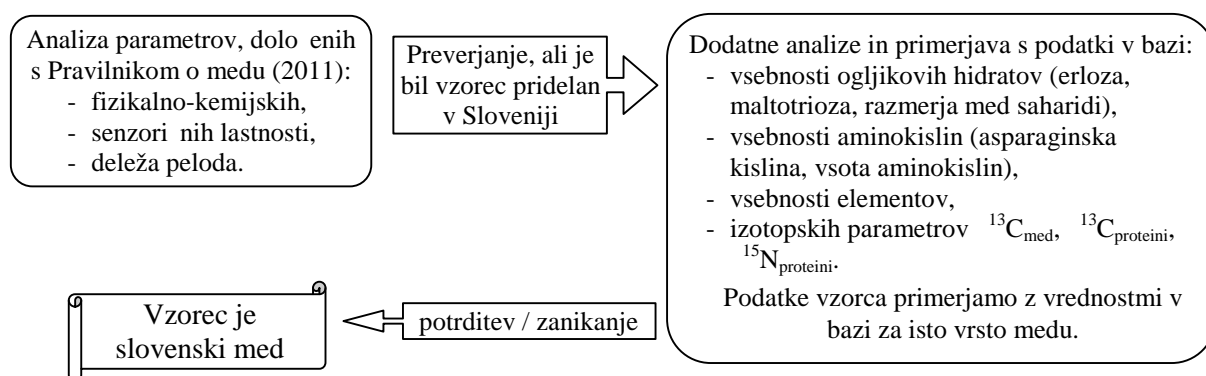
Slika 42. Predlog protokola analiz za preverjanje botaničnega porekla slovenskega medu

Figure 42. Proposal of the analysis protocol for verification of botanical origin of Slovenian honey

Opisov senzoričnih lastnosti in sestave peloda različnih vrst medu Pravilnik o medu (2011) ne vsebuje. Kljub temu, da se slovenske vrste medu razlikujejo v obeh naštetih vrstah lastnosti (za analizo katerih je potreben šolan panel preskuševalcev oziroma izkušen analitik), smo določili dodatne fizikalno-kemijske parametre, s katerimi lahko

razlike med vrstami še potrdimo. Analize le-teh so potrebne predvsem takrat, ko nam pelodna slika ne zagotavlja dovolj informacij, npr. pri vrstah medu iz mane ali vrstah medu, za katere je znana ilna majhna vsebnost peloda, oziroma senzori ne lastnosti medu niso najbolj tipične za deklarirano vrsto.

- Pristnost z vidika pravilne označbe geografskega izvora medu: V okviru naše raziskave smo proučevali možnosti razlikovanja določene vrste medu, pridelanega v Sloveniji od medu iste vrste, ki so ga pridelali v drugi evropski ali neevropski državi. Slovenskih vzorcev medu namerno nismo delili glede na geografsko regijo pridelave, saj imamo v Sloveniji med z zaščiteno geografsko označbo »Slovenski med«, kateremu je bilo to preverjanje tudi namenjeno. Uspešnost razlikovanja med medom iste vrste iz različnih geografskih regij Slovenije je predstavila Kropfova (2009) v svoji disertaciji.

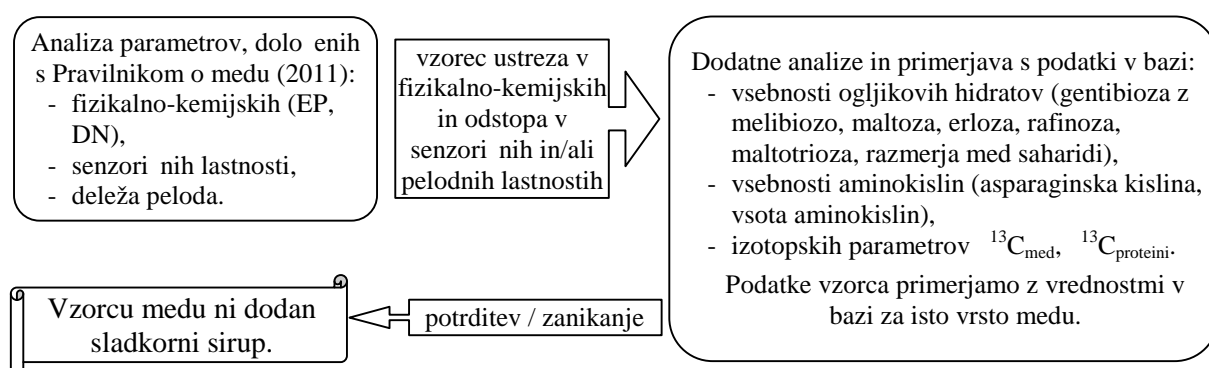


Slika 43. Predlog protokola analiz za preverjanje geografskega porekla medu v Sloveniji

Figure 43. Proposal of the analysis protocol for verification of the geographical origin of honey in Slovenia

- Pristnost v smislu nepotvorjenosti medu s tujimi snovmi oziroma s sladkornim sirupom: Pravilnik o medu (2011) ne določa parametrov, s katerimi najbolj zanesljivo odkrivamo prisotnost sladkornih sirupov (to je razmerje izotopov ogljika v medu in razmerje izotopov ogljika v proteinih, izoliranih iz medu) in njihovih vrednosti. Kljub temu so intervali vrednosti razmerja izotopov ogljika v medu in v proteinih, izoliranih iz medu, znani, saj se s problematiko potvorjenosti medu s sladkornimi sirupi ukvarjajo v številnih laboratorijih. Intervali vrednosti razmerij stabilnih izotopov temeljijo na analizi številnih vzorcev pristnega medu. Intervali vrednosti so lahko dokaj široki, prav veljajo za pristen med, kar je posledica naravne raznolikosti različnih vrst medu. Vrednosti razmerij stabilnih izotopov ogljika v sladkornih sirupih iz rastlin C<sub>4</sub> se od vrednosti, ki veljajo za med, razlikujejo, nasprotno pa velja za sirupe iz rastlin C<sub>3</sub>. Podobno kot pri preverjanju geografskega porekla medu, tudi prisotnosti sladkornega sirupa v medu ne moremo preveriti le z eno metodo. Poleg analize izotopskih parametrov uporabljamo še druge metode za npr. določanje vsebnosti ogljikovih hidratov, aminokislin ali specifičnih snovi ali encimov. Sirupi z invertnim sladkorjem lahko vsebujejo sledi encimov, ki se uporabljajo za razgradnjo saharoze (-fruktofuranozidaza) ali škroba (- ali -amilaza), v naravnem medu pa niso prisotni. Encime lahko detektiramo z analizo, ki obsega inkubacijo s substratom, ki je specifičen

za encim, in nato določanje produkta reakcije s tekoinsko kromatografijo z UV ali RI detekcijo (Beckmann in sod., 2010). V raziskavi smo preverili, če uporabljeni sirupi vsebujejo sledi »tujih« encimov. Vzorce akacijevega, cvetličnega, lipovega, kostanjevega in gozdnega medu z namerno dodanim 1, 2 in 4 % fruktozno-glukoznega sirupa smo poslali v referenčni laboratorij applica-Intertek v Bremen, saj omenjene analize pri nas ne opravljamo. Rezultati so pokazali, da v analiziranih vzorcih ni bil prisoten tuj encim. Poleg tega so bili na osnovi analize stabilnih izotopov  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{fruktoza}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{glukoza}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{disaharidi}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{trisaharidi}}$  in  $^{13}\text{C}_{\text{oligosaharidi}}$  vsi vzorci priznani za pristne. Vzorce gozdnega medu so imeli še opombo, da vsebujejo več količino disaharidov, kot je običajno. Prisotnost tujega encima smo preverili tudi v sirupih. Kvalitativno analizo so opravili v kemijskem laboratoriju Medexa, v Ljubljani. Ker tuji encimi v sirupih, ki smo jih uporabili v raziskavi, niso bili prisotni, te analize nismo vključili v predlog protokola, saj tudi v podatkovni bazi slovenskega medu tovrstnih informacij (še) nimamo.



Slika 44. Predlog protokola analiz za preverjanje pristnosti medu, pridelanega v Sloveniji

Figure 44. Proposal of the analysis protocol for verification of the authenticity of honey, produced in Slovenia

Ob začetku raziskave smo postavili več hipotez o vplivu dodanih sirupov na vsebnost pomembnih snovi v medu. Predpostavili smo, da dodajanje sladkorja oziroma sladkornega sirupa v med vpliva tako na vsebnost nekaterih naravno prisotnih snovi v medu kot na razmerja med njimi.

- Hipotezo, da se vsebnost dušika in posledično vsebnost beljakovin v medu zmanjšata z višjim deležem dodanega sirupa, smo potrdili. Zveze med vsebnostjo beljakovin v medu in količino dodanega fruktozno-glukoznega, glukoznega in invertnega sirupa smo opisali z eno bami regresije, za katere so bili značilni visoki determinacijski koeficienti.
- Potrdili smo tudi hipotezo, da se vsebnost aminokislina prolina zmanjša s povečanjem deleža dodanega sladkornega sirupa. Z analizo korelacij smo ugotovili močno zvezo ( $r = 0,799$ ) med vsebnostjo prolina, določeno z metodo HPLC, in deležem dodanega sladkornega sirupa.
- Hipotezo, da dodani sladkorni sirupi vplivajo na razmerje med posameznimi ogljikovimi hidrati v medu ter na zmanjšanje vsebnosti oligosaharidov, lahko potrdimo le v prvem delu. Najmojše zveze smo ugotovili med količino dodanega sirupa in razmerjem med palatinozo in skupno količino disaharidov ter razmerjem med fruktozo

in glukozo. Ti dve razmerji sta se zmanjšali v primeru vseh štirih dodanih sirupov. Z dodajanjem kateregakoli od štirih sirupov sta se zmanjšali tudi vsebnosti fruktoze in turanoze, nasprotno pa sta se povečali vsebnosti saharoze in maltotrioze. Za vse naštet zveze smo izračunali visoke korelacijske koeficiente. Hipotezo smo zavrnil v drugem delu, saj smo ugotovili zmerno pozitivno povezanost med deležem dodanega sirupa in vsebnostjo di- oziroma trisaharidov. Vsebnost monosaharidov v medu je bila zmerno padajoča in povezana z deležem sirupa.

- o Potrjeno hipotezo, in sicer, da se z dodanim sladkornim sirupom spremeni razmerje stabilnih izotopov ogljika v medu, ogljika v proteinih medu in izotopska sestava ogljika v posameznih sladkorjih v medu, smo potrdili. Vrednosti razmerja  $^{13}\text{C}$  v medu in razmerja  $^{13}\text{C}$  v proteinih iz medu so se povečevale z večanjem deleža dodanega sirupa. V primeru vseh treh vrst sirupov in razmerja  $^{13}\text{C}$  v akacijevem, cvetli nem, lipovem, kostanjevem in gozdnem medu je bila zveza statistično značilna in močna. Opisali smo jo z enačbo regresije:  $^{13}\text{C}_{\text{med}} = 0,148 \cdot \%_{\text{sirup}} - 24,901$ . Zveze med količinami dodanih sirupov in razmerjem  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  so bile šibke in statistično niso bile značilne. Podobno smo ugotovili tudi pri obravnavanju zvez med posameznimi izotopskimi parametri in deleži posameznih sladkornih sirupov v vseh petih vrstah medu. Statistično značilno, zmerno povezanost smo določili le še med  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in deleži fruktozo-glukoznega sirupa v lipovem medu (enačba regresije:  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}} = 0,020 \cdot \%_{\text{sirup}} - 24,869$ ).

Na začetku raziskave smo predvideli tudi, da bomo z uporabljenimi metodami določili ali nizke deleže dodanega sladkornega sirupa, 2 % v primeru sirupa iz rastlin  $\text{C}_4$  in 5 %, izvirajo iz rastlin  $\text{C}_3$ . Na primeru namerno potvorjenih vzorcev akacijevega, lipovega in kostanjevega medu s fruktozo-glukoznim sirupom GF2, ki ga je prodajalec oglaševal kot primerno krmo za čebele, smo na modelno pripravljenih vzorcih z analizo stabilnih izotopov ogljika v medu ter ogljika v izolatu proteinov iz medu potrdili potvorbo s 4 % in več dodanega tovrstnega sirupa. Uporabljeni sirup je bil mešanega izvora, izdelan iz škroba rastlin  $\text{C}_3$  (pšenica) in  $\text{C}_4$  (koruza). Sladkornega sirupa izključno iz rastlin  $\text{C}_3$ , ki bi bil v prosti prodaji, v času raziskave nismo uspeli dobiti.

Z rezultati raziskave, ki je bila v Sloveniji prvič izpeljana, smo izpolnili pričakovanja o njenem prispevku na področju boljšega poznavanja fizikalno-kemijskih lastnosti značilnih vrst slovenskega medu in preverjanja njegove pristnosti.

- o Z določitvijo vsebnosti posameznih fizikalno-kemijskih parametrov in uporabo statističnih metod smo določili tiste parametre, s katerimi najbolj uspešno določimo pristnost slovenskega medu z vidika botanike, porekla, geografskega izvora in odsotnosti tujih sestavin. Kot ugotavljajo tudi tuji avtorji, je teh parametrov več, zaradi naravne variabilnosti sestavin v medu pa je potrebno tudi dobro poznavanje medu, ki ga lahko zagotovimo le z obsežno podatkovno bazo o sestavi reprezentativnih vzorcev različnih vrst medu iz različnih let. Tako bazo je potrebno tudi neprestano dopolnjevati z novimi podatki.
- o V okviru raziskave smo na osnovi analiziranih parametrov in kemometrijskih metod predlagali tri protokole analiz za kontrolo pristnosti medu.
- o Kjeldahlova metoda za določanje vsebnosti skupnih beljakovin je ena od metod, ki se najpogosteje uporablja za kompleksne vzorce, kot so živila. Potrdili smo, da je

- primerna tudi za analizo vzorcev z veliko vsebnostjo mono-, di- in trisaharidov, kot je med.
- Na področju analitike saharidov v medu smo z raziskavo prispevali z vpeljavo metode tekoinske kromatografije visoke loljivosti HILIC, s katero smo uspešno dokazali in ovrednotili vsebnost dveh monosaharidov, štirih disaharidov in šestih trisaharidov. Disaharida gentibiozo in melibiozo smo detektirali kot dva vrhova, vendar ju nismo uspeli loeno kvantificirati, marve smo kot rezultat podali njuno skupno vsebnost.
  - Z rezultati analiz različnih vrst slovenskega medu smo prispevali k dopolnitvi podatkovne baze o sestavi slovenskega medu. Pomembni so predvsem podatki o vsebnosti aminokislin ter mono-, di- in trisaharidov. Pred tem je namreč baza vsebovala podatke o vsebnosti saharidov le za manjše število vzorcev in nekatere vrste medu, medtem ko podatkov o vsebnosti posameznih aminokislin v medu sploh nismo imeli. Podatke o vsebnosti beljakovin in aminokislina prolina ter vrednosti osnovnih izotopskih parametrov, ki jih je določila Kropfova (2009), smo dopolnili z vrednostmi, določenimi v vzorcih medu letnika 2008, 2009 in 2010.
  - V okviru raziskave smo opravili karakterizacijo fizikalno-kemijskih in senzoričnih lastnosti rešljivega medu, vrste, ki je značilna za Slovenski Kras. S tem smo z raziskavo prispevali k boljšemu poznavanju različnih vrst slovenskega medu in njihovih značilnosti.
  - Eden od ciljev raziskave je bil preveriti, ali je mogoče z analizo izotopske sestave ogljika v medu in ogljika v proteinih medu v kombinaciji z drugimi analizami določiti dodatek sladkorja ali sladkornega sirupa iz rastlin. Kot smo navedli v zgornjem odstavku, smo bili pri tem uspešni, vendar smo preverjanje izvedli le v sirupu mešanega izvora, izdelanega iz škroba rastlin C<sub>3</sub> in C<sub>4</sub>. Naslednji cilj je bil preveriti, ali je z razpoložljivo opremo (sistem HPLC in elementni analizator) lahko uspešno izoliramo sladkorne frakcije medu, v njih določimo izotopsko sestavo ogljika in določimo prisotnost sladkornega sirupa C<sub>3</sub>. Pri realizaciji tega cilja zaradi razpoložljive opreme nismo bili uspešni, saj smo ugotovili, da je analiza mogoča le z metodo, pri kateri se uporablja sklopljeni sistem tekoinske kromatografije z masnim spektrometrom za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (<sup>13</sup>C-EA/LC-IRMS), kot so jo opisali Elflein in Ræzke (2008) ter Cabañero in sodelavci (2006).

Menimo, da predstavljeni rezultati za različne vrste slovenskega medu skupaj z rezultati predhodnih raziskav slovenskega medu (Bertoncelj, 2008; Kropf, 2009) omogočajo trdne temelje za certificiranje botanikega in geografskega porekla medu, kot tudi smernice za preverjanje pravilnosti certificiranih vzorcev slovenskega medu. Na ta način prispevamo h krepitvi konkurenčne sposobnosti Slovenije z vidika kakovosti različnih vrst medu iz različnih slovenskih regij, kot tudi z vidika poznavanja kriterijev za razlikovanje med temi vrstami medu. Slednje predstavlja podporo za razvoj oziroma implementacijo analitskih metod za izvajanje uradne kontrole živil in sistema za zagotavljanje sledljivosti surovin oziroma kmetijskih proizvodov, med drugim tudi medu.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi predstavljenih rezultatov opravljenih analiz na skupno 379 vzorcih medu treh letnikov, med katerimi je bilo 230 pristnih, 70 vzorcev iz trgovin in 79 namerno potvorjenih z dodatkom enega od štirih sladkornih sirupov ter hipotezah, ki so jih izpostavili ob začetku raziskave, povzemamo naslednje sklepe:

- Z večanjem količine dodanega sirupa se je zmanjševala vsebnost dušika in skupnih beljakovin v medu. Zveze med vsebnostjo beljakovin in nekaterih aminokislin ter vrsto in količino dodanega sirupa smo opisali z enačbami regresije.
- Vsebnost aminokislinske prolina je bila z večanjem količine dodanega sirupa manjša. Vsebnost prolina smo določili ali z dvema metodama, in sicer spektrofotometrično z reakcijo z ninhidrinom in s tekoinsko kromatografijo z masno detekcijo, ki se je izkazala za bolj utljljivejšo.
- Z dodajanjem sladkornih sirupov v med se spremeni razmerje med sladkorji v medu ter vsebnost posameznih sladkorjev. Zveze med vsebnostjo posameznega sladkorja ali med razmerjem sladkorjev ter vrsto in deležem sladkornega sirupa smo opisali z enačbami regresije.
- Z dodajanjem sladkornih sirupov v med se spremeni izotopska sestava celokupnega ogljika in ogljika v proteinih medu, povečala se razlika med tema dvema parametroma.
- Dodatno, kar ni bilo predvideno v začetku raziskave, je bila opravljena karakterizacija rešljivkevega medu: določili smo območja vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov in senzorične lastnosti te vrste medu.

Z raziskavo, ki je bila na slovenskem medu prvič izpeljana, smo potrdili pri akovanju, da je:

- določili anje glavnih parametrov za kontrolo kakovosti medu kompleksno in odvisno od namena same kontrole. Poleg parametrov, ki so definirani s Pravilnikom o medu (2011) in so predmet obvezne kontrole, so bili kot najpomembnejši določili eni naslednji:  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ ,  $^{13}\text{C}$ , posamezni di- in tri-saharidi, razmerja med skupinami saharidov, nekatere aminokislinske, skupna vsebnost aminokislin in nekateri elementi.
- na osnovi rezultatov mogoče postaviti protokol analiz za kontrolo pristnosti medu glede na botanično poreklo, geografsko poreklo ali nepotvorjenost.
- Kjeldahlova metoda dovolj občutljiva in primerna tudi za določanje vsebnosti skupnih beljakovin v medu.
- metoda tekoinske kromatografije visoke ločljivosti HILIC z masno detekcijo primerna za določanje mono-, di- in trisaharidov v medu. Metoda ne zahteva predhodne derivatizacije vzorcev in zagotavlja ponovljive in pravilne rezultate. Ob razpoložljivosti analitske opreme je primerna zamenjava za ionsko izmenjevalno kromatografijo z elektrokemijskim detektorjem (HPLC-PAD).
- z analizo izotopske sestave ogljika v medu in ogljika v proteinih medu v kombinaciji z analizami drugih parametrov in z obdelavo podatkov z multivariatnimi statističnimi metodami mogoče zanesljivo določiti dodatek sladkornega sirupa iz rastlin  $\text{C}_4$  ali mešanega izvora (iz rastlin  $\text{C}_4$  in  $\text{C}_3$ ) v višini 4 % in več.



- o na osnovi predstavljenih fizikalno-kemijskih in senzoričnih parametrov mogoče certificiranje in preverjanje pravilnosti deklariranega botanika in geografskega porekla medu kot tudi njegove pristnosti. Določitev kriterijev za razlikovanje med vrstami medu iz različnih slovenskih pokrajin omogoča krepitev konkurenčne sposobnosti Slovenije na področju čebeljih pridelkov. Določitev teh kriterijev pomeni tudi izziv za vpeljavo metod za izvajanje uradne kontrole živil in sistema za zagotavljanje sledljivosti, kakovosti in pristnosti kmetijskih proizvodov.

Podatkovno bazo o sestavi slovenskega medu, ki predstavlja osnovno orodje pri preverjanju pristnosti slovenskega medu, smo dopolnili s podatki o vsebnosti mono- in oligosaharidov, beljakovin, posameznih aminokislin, in z vrednostmi izotopskih parametrov ogljika v medu in izolatu proteinov ter dušika v izolatu proteinov. Kot dopolnilo bazi smo vključili tudi podatke analiz laboratorijsko potvrjenih vzorcev.

## 6 POVZETEK

Med je naravno živilo, zato je njegova sestava lahko precej različna, odvisno od botaničnega izvora, geografskega porekla in leta pridelave. V Sloveniji poznamo več različnih vrst medu, akacijevoga, lipovega, kostanjevega, smrekovega in hojevega. V nekoliko manjših količinah čebelarji pridelujejo tudi med divje češnje, oljne ogrščice, rešeljke in ajde, medtem ko škrdatovega medu v zadnjih letih ne pridelujejo več. Poleg omenjenih vrst sta znana za Slovenijo še mešan nektarni – cvetlični med in med iz mešanice manj – gozdni med. Lastnosti vrste medu spoznamo šele s podrobno karakterizacijo fizikalno-kemijskih, senzoričnih in pelodnih lastnosti, za katero potrebujemo večje število vzorcev, pridelanih v različnih letih.

Zaradi cenjenosti je med pogosto predmet potvorb z dodajanjem cenjenih snovi. Ker je vsebnost vode zakonsko omejena in enostavno dokazljiva, se za goljufanje uporabljajo predvsem ceneni sladkorni sirupi. Kot potvorbo, ki je v tem primeru lahko nenamerna, obravnavamo tudi napačno deklarirano botanično poreklo, saj so nekatere vrste medu bolj cenjene kot druge. Večjo ceno dosegajo tudi izdelki z zaščiteno označbo porekla, zato gre tudi v primeru napačnega navajanja geografskega izvora za potvorbo. Potvorbe medu so torej raznolike in zato je za njihovo dokazovanje potrebno zelo dobro poznavanje medu – analiza več parametrov, določena na reprezentativnem številu vzorcev vsake vrste.

S tem namenom smo v raziskavo vključili skupno 379 vzorcev medu. 230 vzorcev smo dobili pri slovenskih čebelarjih, 70 vzorcev smo kupili na domačem trgu in so večinoma izvirali od drugod, 79 vzorcev medu pa smo pripravili v laboratoriju, in sicer smo znanim pristnim vzorcem petih vrst dodali sladkorni sirup v višini od 1 do 20 %. Pri tem smo uporabili dva različna fruktozno-glukozna sirupa, glukozni in invertni sirup. Vsi sirupi, razen invertnega, so bili na voljo v prosti prodaji.

V vzorcih smo določili osnovne fizikalno-kemijske parametre, ki jih predpisuje Pravilnik o medu (2011). Z metodo tekočinske kromatografije visoke loljivosti HILIC z masno detekcijo smo določili vsebnost posameznih mono-, di- in trisaharidov, in z nekoliko drugačno tehniko HPLC-MS ter s predhodno derivatizacijo vzorcev profil aminokislin. Za določanje vsebnosti beljakovin smo uporabili metodo po Kjeldahlu. Elementno sestavo vzorcev smo določili ali z metodo rentgenske spektroskopije s totalnim odbojem, TXRF, sestavo izotopov ogljika v medu in proteinih ter dušika v proteinih pa z metodama SCIRA in ISCIRA. Pri obdelavi rezultatov smo uporabili parametrične statistične teste (ANOVA in *t*-test), neparametrični Kruskal-Wallisov test in multivariatni metodi PCA in LDA.

Ugotovili smo, da se vrste slovenskega medu med seboj razlikujejo v osnovnih fizikalno-kemijskih parametrih, sestavi saharidov in aminokislin, vsebnosti beljakovin, izotopskih parametrih in vsebnosti posameznih elementov. Na osnovi multivariatnih testov z izbranimi parametri smo dosegli jasno razlikovanje med vrstami medu in uspešno uvrstili vzorcev v definirane skupine.

Vzorci, ki smo jih vzorčili v trgovinah, v nekaterih parametrih niso ustrezali zahtevam Pravilnika oziroma so bili neustrezno deklarirani. Ugotovili smo, da se v fizikalno-kemijskih parametrih ločijo od vzorcev medu iste vrste, ki so ga pridelali slovenski čebelarji, na splošno pa je bila njihova kakovost slabša. Multivariatni testi so pokazali, da so se na osnovi obravnavanih parametrov uvrstili med slovenske pristne in potvorjene vzorce.

Z analizo uradno predpisanih parametrov kakovosti v vzorcih potvorjenega medu smo ugotovili, da bi težko zaklju ili, da je bil kateri od njih resni no potvorjen. Od meril so odstopali edino vzorci gozdnega medu s 4 % in ve dodanega invertnega sirupa, ki so vsebovali preve saharoze. Ne glede na to smo ugotovili, da delež dodanega sirupa in tudi njegova vrsta vplivata na spremembo vsebnosti nekaterih snovi v medu: saharidov, aminokislin, beljakovin in na izotopske parametre. Najbolj mo ne zveze smo predstavili z ena bo regresije.

Veliko število podatkov za vse analizirane in izra unane parametre smo skr ili s pomo jo analize glavne osi (PCA). Ugotovili smo, da se v vsebnosti posameznih saharidov kostanjev, gozdni, hojev in smrekov med zelo dobro lo ijo od ostalih vrst medu. Poleg tega sta se metodi PCA in LDA pokazali za uporabni pri izbiri najpomembnejših fizikalno-kemijskih parametrov za razlikovanje medu glede na botani ni izvor, geografsko poreklo in pristnost.

V raziskavo je bilo zajetih tudi 17 vzorcev rešeljikovega medu treh razli nih letnikov, kar je zadostovalo za prvo karakterizacijo fizikalno-kemijskih in senzori nih lastnosti te posebne vrste medu, ki jo pri nas pridelujejo le na Krasu. Rešeljikov med je registriran tudi pod nacionalno ozna bo Kraški med ZOP, zato ima ta karakterizacija še toliko ve ji pomen.

## 6.1 SUMMARY

Honey is a natural food, and its composition can vary slightly depending on the botanical origin, geographic origin and year of production. In Slovenia, there are several different types of honey, acacia, linden, chestnut, spruce and fir. In a somewhat smaller quantities beekeepers also produce honeys of wild cherry, rape, buckwheat and *Prunus mahaleb*, while Metcalfa honey has no longer been produced. In addition to these honey types, multifloral honey (a mixture of different nectars) and forest honey (a mixture of different honeydews from predominantly coniferous trees) are typical of Slovenia as well. For a good familiarity with a honey type the detailed characterization of physico-chemical, sensory and pollen properties is needed, for which we a large number of samples produced in different years have to be analysed.

Due to the appreciation honey is often subject to falsification by the addition of low-cost materials. As the water content is legally limited and easily demonstrable, cheap sugar syrups are primarily used for adulteration. As an adulteration, which in this case may be unintentional, is also considered a honey with incorrectly declared botanical origin, as some types of honey are valued higher than others. Products with protected designation of origin often attain higher prices, therefore a case of misstatement of the geographical origin is considered as adulteration as well. Falsifications of honey are so diverse and therefore a very good knowledge of honey - analysis of as many parameters on a representative number of samples of each honey type produced in different years – is essential in detecting and confirming the adulteration.

This study comprised analysis of a total of 379 honey samples. 230 samples were obtained from the Slovenian beekeepers, 70 samples, which mostly originated from elsewhere, were purchased in the stores in Slovenia, and 79 honey samples were prepared in the laboratory. For that authentic and type characteristic samples of five honey types were selected and

blended with sugar syrup in amount from 1 to 20% of sugar syrup in honey. Two different fructose-glucose syrups, a glucose and an invert sugar syrup were used. All syrups, excluding invert, were commercially available.

In the samples the basic physico-chemical parameters prescribed by the Rules of honey (2011) were determined. The HILIC high performance liquid chromatography method with mass detection was applied for determination of the content of individual mono-, di- and trisaccharides, and with a slightly different HPLC-MS technique with pre-derivatization of the sample a profile of amino acids was examined. Kjeldahl method was used for the determination the protein content. Elemental composition of the samples was determined by the X-ray spectroscopy with total reflection method, TXRF, and the carbon isotope composition of honey and isolated protein, and of nitrogen in proteins of SCIRA and ISCIRA methods were used. The analytical results were processed with parametric statistical tests (ANOVA and *t*-test), nonparametric Kruskal-Wallis test and multivariate methods PCA and LDA.

Slovenian honey types differed in the composition of the basic physico-chemical parameters, saccharides and in amino acid composition, the protein content, isotopic characteristics and in the content of individual elements. Based on the multivariate tests with selected parameters, a clear distinction among the types of honey and successful placement of samples in defined groups was achieved.

Samples that were sampled in stores in some parameters did not meet the requirements of the Rules or have been improperly declared. We found that honey samples from the market differed in some physico-chemical parameters from honey of the sample type produced locally, and were in general of lower quality than samples produced by Slovenian beekeepers. Multivariate tests have shown that on the basis of selected parameters the commercial samples were placed between the Slovenian genuine and adulterated honey samples.

By analyzing only officially required quality parameters it was found difficult to conclude that an adulterated sample was really fake. Some deviations from the criteria – too high sucrose content – were found only in samples of forest honey with 4% and more of added invert syrup. Notwithstanding this, we found that the proportion and type of added syrup had an impact on the change of levels of certain substances in honey, like saccharides, amino acids, proteins and isotopic parameters. The most powerful connections were presented with the regression equation.

A large number of data for all analyzed and calculated parameters were reduced by the means of the principal component analysis (PCA). On the basis of the content of individual saccharides the chestnut, forest, spruce and fir honeys clearly differed from other types of honey. Moreover, the PCA and LDA methods were proved to be useful in selecting the most important physico-chemical parameters to distinguish among honeys according to the botanical and geographic origin and authenticity.

Among the samples in this study there were also 17 samples of *Prunus mahaleb* honey from three different vintages. The number of these samples was sufficient to obtain the first characterization of physico-chemical and sensory properties of this special type of honey that is produced only on the Karst plateau. *Prunus mahaleb* honey is registered with the protected designation of origin Kraški med PDO at the national level, therefore this characterization is of even greater importance.

## 7 VIRI

- Abdel-Aal E.S.M., Ziena H.M., Youssef M.M. 1993. Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: Detection by different methods. *Food Chemistry*, 48, 2: 209-212
- Adams M. J. 1998. The principles of multivariate data analysis. V: Analytical methods of food authentication. Ashurst P. R., Dennis M. J. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 308-336
- Airborne Honey. 1999. Honey enzymes. Leeston, Airborne Honey Ltd: 2 str. <http://www.airborne.co.nz/enzymes.shtml> (november 2010)
- Alaiz M., Navarro J.L., Gir J. Vioque E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography A*, 591: 181-186
- Aliferis K.A., Tarantilis P.A., Harizanis P.C., Alissandrakis E. 2010. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography / mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chemistry*, 121, 3: 856-862
- Almeida-Silva M., Canha N., Galinha C., Dung H.M., Freitas M.C., Siteo T. 2011. Trace elements in wild and orchard honeys. *Applied Radiation and Isotopes*, 69, 11: 1592-1595
- Amin A.M., Rahman A.S., Ahsan S., Khan I.H. 2004. Eating away our health. *Star Weekend Magazine*, 4, 20: 5 str. <http://www.thedailystar.net/magazine/2004/11/01/cover.htm> (junij 2011)
- Angerosa F., Camera L., Cumitini S., Gleixner G., Reniero F. 1997. Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 8: 3044-3048
- 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., Li X., Robards K. 2001. Detection of adulteration in Australian orange juices by stable carbon isotope ratio analysis (SCIRA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5: 2623-2626
- AOAC 920.184. Sucrose in honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 22-22
- AOAC 958.09. Diastatic activity of honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 30-31
- AOAC 962.18. Nitrogen in honey. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 21-21
- AOAC 962.19. Acidity (free, lactone, and total) of honey: Titrimetric method. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 31-31

- AOAC 969.38. Moisture in honey: By means of refractometer. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 20-21
- AOAC 998.12. C-4 plant sugars in honey: Internal standard stable carbone isotope ratio method. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. Vol. 2. Cunniff P. (ed.). 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 44: 27-30
- Arvanitoyannis I.S., Chalhoub C., Gotsiou P., Lydakis-Simantiris N., Kefalas P. 2005. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 3: 193-203
- Azeredo L.D.C., Azeredo M.A.A., de Souza S.R., Dutra V.M.L. 2003. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, 80, 2: 249-254
- Barnes P.J. 1996. Adulteration and fraud threaten safety. *Nutrition & Food Science*, 96, 4: 23-26
- Beckmann K., Beckh G., Lüllmann C. 2009. <sup>13</sup>C-Stabilisotopen-Messungen von Zuckerfraktionen. Eine neue Möglichkeit zum Verfälschungsnachweis? *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 105: 304-308
- Beckmann K., Beckh G., Lüllmann C. 2010. Nachweis von Honigverfälschungen. Möglichkeiten und Grenzen. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 106, 9: 73-76
- Bentabol Manzanares A., García Z.H., Galdón B.R., Rodríguez E.R., Romero C.D. 2011. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*, 126, 2: 664-672
- Bentivenga G., D'Auria M., Fedeli P., Mauriello G., Racioppi R. 2004. SPME-GC-MS analysis of volatile organic compounds in honey from Basilicata. Evidence for the presence of pollutants from anthropogenic activities. *International Journal of Food Science & Technology*, 39, 10: 1079-1086
- Bernal J.L., Nozal M.J., Toribio L., Diego J.C., Ruiz A. 2005. A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *Journal of Separation Science*, 28, 9-10: 1039-1047
- Bertoncelj J. 2008. Identifikacija in vsebnost nekaterih antioksidantov v slovenskem medu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 124 str.
- Bertoncelj J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105, 2: 822-828
- Bertoncelj J., Polak T., Kropf U., Korošec M., Golob T. 2011. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 127, 1: 296-302
- Bianchi F., Careri M., Musci M. 2005. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 89, 4: 527-532
- Bogdanov S., Gallmann P. 2008. Authenticity of honey and other bee products state of the art. *ALP Science*, 520: 1-12

[http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/BeeProducts/BogdanovS\\_AuthenticityBeeProducts2008.pdf](http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/BeeProducts/BogdanovS_AuthenticityBeeProducts2008.pdf) (december 2010)

- Bogdanov S., Haldimann M., Luginbuhl W., Gallmann P. 2007. Minerals in honey: Environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46, 4: 269-275
- Bogdanov S., Lüllmann C., Martin P., von der Ohe W., Russmann H., Vorwohl G., Persano-Oddo L., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Piro R., Flamini C., Morlot M., Lheritier J., Borneck R., Marioleas P., Tsigouri A., Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T., D'Arcy B., Mossel B., Vit P. 1999. Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Honey Commission. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 90: 108-125
- Bogdanov S., Martin P. 2002. Honey authenticity. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93: 232-254
- Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C., Borneck R., Flamini C., Morlot M., Heretier J., Vorwohl G., Russmann H., Persano-Oddo L., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Marioleas P., Tsigouri K., Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T. 2009. Harmonised methods of the International honey commission. *Liebefeld, International Honey Commission, Bee Product Science*: 63 str.  
[http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/IHCPapers/IHC-methods\\_2009.pdf](http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/IHCPapers/IHC-methods_2009.pdf) (januar 2010)
- Bogdanov S., Ruoff K., Oddo L.P. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, Suppl. 1: S4-S17
- Cabañero A.I., Recio J.L., Rupérez M. 2006. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: A new perspective on honey adulteration detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 26: 9719-9727
- Cáceres A., Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M. 2000. A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. *Analytica Chimica Acta*, 404, 1: 121-129
- Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto M.C., de Torres C., Pérez-Coello M.S. 2010. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, 43, 10: 2335-2340
- Chen L., Xue X., Ye Z., Zhou J., Chen F., Zhao J. 2011. Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 128, 4: 1110-1114
- Ciulu M., Solinas S., Floris I., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Spano N., Sanna G. 2011. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83, 3: 924-929
- Codex STAN 12-1981. 2001. Codex Standard for Honey. Revised 2001. 2001: 8 str.
- Consonni R., Cagliani L.R. 2008. Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 16: 6873-6880
- Cordella C., Militão J.S.L.T., Clément M.-C., Drajnudel P., Cabrol-Bass D. 2005. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar

- syrops or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 531, 2: 239-248
- Cordella C.B.Y., Militão J.S.L.T., Clément M.-C., Cabrol-Bass D. 2003. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 11: 3234-3242
- Cotte J.F., Casabianca H., Chardon S., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F. 2003. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, 1021, 1-2: 145-155
- Cotte J.F., Casabianca H., Chardon S., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F. 2004. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 4: 698-705
- Cotte J.F., Casabianca H., Lhéritier J., Perrucchiotti C., Sanglar C., Waton H., Grenier-Loustalot M.F. 2007. Study and validity of <sup>13</sup>C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and <sup>2</sup>H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Analytica Chimica Acta*, 582, 1: 125-136
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12, 133-149
- Crane E. 1980. A book of honey. New York, Scribner: 193 str.
- Cuevas-Glory L.F., Pino J.A., Santiago L.S., Sauri-Duch E. 2007. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103, 3: 1032-1043
- ai F., Primorac L., Kenjeri D., Benedetti S., Mandi L.M. 2009. Application of electronic nose in honey geographical origin characterisation. *Journal of Central European Agriculture*, 10, 1: 19-26
- ZS. 2008. Specifikacija za "Slovenski med" ZGO. Lukovica, belarska zveza Slovenije: 23 str.
- Davies A.M.C. 1976. The application of amino acid analysis to the determination of the geographical origin of honey. *International Journal of Food Science & Technology*, 11, 5: 515-523
- de la Fuente E., Ruiz-Matute A.I., Valencia-Barrera R.M., Sanz J., Martínez Castro I. 2011. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129, 4: 1483-1489
- de la Fuente E., Sanz M.L., Martínez-Castro I., Sanz J., Ruiz-Matute A.I. 2007. Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105, 1: 84-93
- del Nozal M.J., Bernal J.L., Marinero P., Diego J.C., Frechilla J.I., Higes M., Llorente J. 1998. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in honeys from different botanical origin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 21, 20: 3197-3214



- Devillers J., Morlot M., Pham-Delegue M.H., Dore J.C. 2004. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, 86, 305-312
- Direktiva 2000/13/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 20. marca 2000 o približevanju zakonodaje državljanic o označevanju, predstavljanju in oglaševanju živil. 2000. Uradni list Evropskih skupnosti, 43, L109: 29-42
- Direktiva Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu. 2002. Uradni list Evropskih skupnosti, 45, L10: 47-52
- Donarski J.A., Jones S.A., Harrison M., Driffield M., Charlton A.J. 2010. Identification of botanical biomarkers found in Corsican honey. *Food Chemistry*, 118, 4: 987-994
- Doner L.W., White J.W., Jr. 1977. Carbon-13/carbon-12 ratio is relatively uniform among honeys. *Science*, 197, 4306: 891-892
- EC. 2011. Statistical evaluation of irregularities - Own resources, agriculture, cohesion policy, pre-accession funds and direct expenditure - Year 2010. Accompanying document to the Report from the Commission on the protection of the European Union's financial interests and the fight against fraud - 2010. Brussels, European Commission: 13-17  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=SWD:2012:0229:FIN:EN:PDF> (maj 2012)
- Elflein L., Raezke K.-P. 2008. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - isotope ratio mass spectrometry ( $^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie*, 39, 5: 574-587
- Gallardo-Velázquez T., Osorio-Revilla G., Loa M.Z., Rivera-Espinoza Y. 2009. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International*, 42, 3: 313-318
- 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
- Ghidini S., Ianieri A., Zanardi E., Conter M., Boschetti T., Iacumin P., Bracchi P.G. 2006. Stable isotopes determination in food authentication: a review. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, 26, 193-204
- Giraudon S., Danzart M., Merle M.H. 2000. Deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy and stable carbon isotope ratio analysis/mass spectrometry of certain monofloral honeys. *Journal of AOAC International*, 83, 6: 1401-1409
- Golob T., Bertonecelj J., Kropf U., Jamnik M., Troha N., Plestenjak A., Košmerl T., Gašperlin L. 2006. Senzori na analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Golob T., Doberšek U., Kump P., Ne emer M. 2005. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 91, 4: 593-600

- Golob T., Jamnik M., Bertoncej J., Kropf U., Kandolf A., Boži J., Zdešar P., Megli M., Goljat A. 2008. Med : značilnosti slovenskega medu. Lukovica, ebelarska zveza Slovenije: 84 str.
- Golob T., Plestenjak A. 1999. The physico-chemical characteristics of Slovenian honey = Fizikalno kemijske lastnosti slovenskega medu. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 73: 209-217
- González Martín I., Marqués Macías E., Sánchez Sánchez J., González Rivera B. 1998. Detection of honey adulteration with beet sugar using stable isotope methodology. Food Chemistry, 61, 3: 281-286
- Hermosín I., Chicón R.M., Dolores Cabezudo M. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. Food Chemistry, 83, 2: 263-268
- IBM SPSS. 2009. IBM SPSS 20.0 for Windows. Evaluation Version. New York, IBM: software
- ISO 13299:2003. Sensory analysis - Methodology - General guidance for establishing a sensory profile. 2003: 24 str.
- Jerkovi I., Masteli J., Marijanovi Z., Klein Z., Jeli M. 2007. Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. Ultrasonics Sonochemistry, 14, 6: 750-756
- Kahraman T., Buyukunal S.K., Vural A., Altunatmaz S.S. 2010. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. Food Chemistry, 123, 1: 41-44
- Karabournioti S., Thrasyvoulou A., Eleftheriou E.P. 2006. A model for predicting geographic origin of honey from the same floral source. Journal of Apicultural Research, 45, 3: 117-124
- Karoui R., Dufour E., Bosset J.O., De Baerdemaeker J. 2007. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. Food Chemistry, 101, 1: 314-323
- Kaškonien V., Venskutonis P.R., eksteryt V. 2008. Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. Food Chemistry, 111, 4: 988-997
- Kaškonien V., Venskutonis P.R., eksteryt V. 2010. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. LWT - Food Science and Technology, 43, 5: 801-807
- Kelly S. 2010. Detection technologies for intentionally added adulterants/contaminants. stable isotope & multi-element 'Finger printing'. Sand Hutton, The Food and Environment Research Agency: 52 str.  
<http://www.fera.defra.gov.uk/events/documents/jifsanSymposium/sKelly.pdf> (junij 2011)
- Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. 2005. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. Trends in Food Science & Technology, 16, 12: 555-567
- Kerkvliet J., D., Shrestha M., Tuladhar K., Manandhar H. 1995. Microscopic detection of adulteration of honey with cane sugar and cane sugar products. Apidologie, 26, 2: 131-139

- Kerkvliet J.D., Meijer H.A.J. 2000. Adulteration of honey: relation between microscopic analysis and  $^{13}\text{C}$  measurements. *Apidologie*, 31, 6: 717-726
- Korošec M., Bertoneclj J., Golob T. 2012. Autenti nost meda u svjetlu EU zakonodavstva = Pristnost medu v lu i evropske zakonodaje. V: Nacionalna konferencija o sigurnosti p elinjih proizvoda, Opatija, 13. travanj 2012. Luši D., Bilajac L. (eds.). Rijeka, Medicinski fakultet Sveu ilište u Rijeci: 14-19
- Korošec M., Bertoneclj J., Golob T., Kropf U. 2012. Functional and nutritional properties of different types of slovenian honey. V: Functional properties of traditional foods. Kristberg Kristbergsson (ed.). Berlin, Springer: poslano v objavo
- Korošec M., Bertoneclj J., Kropf U., Golob T. 2010. Oblikovanje baze podatkov o slovenskem medu. *Acta agriculturae Slovenica*, 95, 3: 261-267
- Korošec M., Bertoneclj J., Pereyra Gonzales A., Kropf U., Golob U., Golob T. 2009. Monosaccharides and oligosaccharides in four types of Slovenian honey. *Acta Alimentaria*, 38, 4: 459-469
- Košir I.J., Kocjan i M., Ogrinc N., Kidri J. 2001. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). *Analytica Chimica Acta*, 429, 2: 195-206
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 239 str.
- Košmelj K., Kastelec D. 2002. Osnove statisti ne analize za urejenostne spremenljivke. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 79, 1: 71-87
- Košmelj K., Kastelec D. 2003. Uporabna biostatistika. Na rtovanje in analiza poskusov, delovno gradivo 2003/2004 za podiplomski študij. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,: 187 str.
- Kropf U. 2009. Elementna in izotopska sestava medu iz razli nih geografskih regij Slovenije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 200 str.
- Kropf U., Bertoneclj J., Korošec M., Ne emer M., Kump P., Ogrinc N., Golob T. 2009. Geographical origin of Slovenian multifloral and forest honey. *Apiacta*, 44: 33-42
- Kropf U., Golob T., Nec□emer M., Kump P., Korošec M., Bertoneclj J., Ogrinc N. 2010b. Carbon and nitrogen natural stable isotopes in slovene honey: adulteration and botanical and geographical aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 24: 12794-12803
- Kropf U., Jamnik M., Bertoneclj J., Golob T. 2008. Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for Slovenian honey. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 3: 335-340
- Kropf U., Korošec M., Bertoneclj J., Ogrinc N., Ne emer M., Kump P., Golob T. 2010a. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. *Food Chemistry*, 121, 3: 839-846
- Küçük M., Kolayil S., Karaoglu S., 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

- Kukurova K., Karovicova J., Kohajdova Z., Bilikova K. 2008. Authentication of honey by multivariate analysis of its physico-chemical parameters. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47, 4: 170-180
- Lachman J., Kolihová D., Miholová D., Košata J., Tit ra D., Kult K. 2007. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*, 101, 3: 973-979
- Lazarevi K.B., Andri F., Trifkovi J., Teši Ž., Milojkovi -Opsenica D. 2012. Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, 132, 4: 2060-2064
- Lindner P., Bermann E., Gamarnik B. 1996. Characterization of citrus honey by deuterium NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1: 139-140
- Low N.I.H., Sporns P.E. 1988. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *Journal of Food Science*, 53, 2: 558-561
- Mar Cavia M., Fernández-Mui o M.A., Huidobro J.F., Álvarez C., Teresa Sancho M. 2009. Evolution of monosaccharides of honey over 3 years: influence of induced granulation. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 3: 623-628
- Mateo R., Bosch-Reig F. 1998. Classification of spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2: 393-400
- Mato I., Huidobro J., Simal-Lozano J., Sancho M.T. 2003. Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of Food Protection*, 66, 12: 2371-2376
- Molan P.C. 1996. Authenticity of honey. V: Food authentication. Ashurst P. R., Dennis M. J. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 259-303
- MoniQA. 2010. Food Authenticity - General considerations. Vienna, MoniQA. Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain: EU-funded Network of Excellence in the 6th framework programme: 1 str.  
<http://www.moniqa.org/authenticity> (junij, 2011)
- Moore J.C., Spink J., Lipp M. 2012. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77, 4: R118-R126
- Morales V., Corzo N., Sanz M.L. 2008. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chemistry*, 107, 2: 922-928
- Nasiruddin Khan M., Qaiser M., Raza S.M., Rehman M. 2006. Physicochemical properties and pollen spectrum of imported and local samples of blossom honey from the Pakistani market. *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 7: 775-781
- No B., Kandolf A. 2012. Skrb za varne in kakovostne ebelje pridelke. V: ApiSlovenija. 35. dnevi ebelarstva, Celje 16.-18. Marec 2012. Lukovica, ebelarska zveza Slovenije: 9-14
- Nozal M.J., Bernal J.L., Gómez L.A., Higes M., Meana A. 2003. Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, 34, 2: 181-188
- Nozal M.J., Bernal J.L., Toribio L., Alamo M., Diego J.C., Tapia J. 2005. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of

- identical geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8: 3095-3100
- Ogrinc N., Košir I., Spangenberg J., Kidri J. 2003. The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 4: 424-430
- Ogrinc N., Košir I.J., Kidri J. 2002. Use of modern NMR and MS methods in the analysis of beverages. V: *Research advances in agricultural and food chemistry*. Mohan R.M. (ed.). Kerala, Global research network: 1-15
- Ogrinc N., Košir I.J., Kocjan M., Kidri J. 2001a. Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3: 1432-1440
- Ogrinc N., Košir I.J., Kocjan M., Kidri J. 2001b. Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3: 1432-1440
- Ohe W.V.D., Oddo L.P., Piana M.L., Morlot M., Martin P. 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, Suppl. 1: S18-S25
- Oliveri P., Downey G. 2012. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35: 74-86
- Padovan G.J., De Jong D., Rodrigues L.P., Marchini J.S. 2003. Detection of adulteration of commercial honey samples by the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82, 4: 633-636
- Paradkar M.M., Irudayaraj J. 2002. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 76, 2: 231-239
- Pellerano R.G., Uñates M.A., Cantarelli M.A., Manuel Camiña J., Marchevsky E.J. 2012. Analysis of trace elements in multifloral Argentine honeys and their classification according to provenance. *Food Chemistry*, 134, 1: 578-582
- Persano Oddo L., Piazza M. G., Pulcini P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30, 1: 57-65
- Persano Oddo L., Piro R., Bruneau É., Guyot-Declerck C., Ivanov T., Piskulová 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, Andreas, 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, Suppl. 1: S38-S81
- Piana M.L., Oddo L.P., Bentabol A., Bruneau E., Bogdanov S., Declerck C.G. 2004. Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35, Suppl. 1: S26-S37
- Pisani A., Protano G., Riccobono F. 2008. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*, 107, 4: 1553-1560
- Plestenjak A., Golob T. 2000. Analiza kakovosti živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 102 str.
- Popravek Direktive Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu. 2007. Uradni list Evropske unije, 50, L52: 16-16
- Pravilnik o medu. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21, 4: 345-347

- Pravilnik o senzori nem ocenjevanju medu. 2010. Lukovica, belgarska zveza Slovenije: 12 str.
- Rebane R., Herodes K. 2010. A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta*, 672, 1–2: 79-84
- Resano H., Sanjuán A.I., Albisu L.M. 2012. Consumers' response to the EU quality policy allowing for heterogeneous preferences. *Food Policy*, 37, 4: 355-365
- Ruiz-Matute A.I., Brokl M., Soria A.C., Sanz M.L., Martínez-Castro I. 2010. Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemistry*, 120, 2: 637-642
- Ruiz-Matute A.I., Ramos L., Martínez-Castro I., Sanz M.L. 2008. Fractionation of honey carbohydrates using pressurized liquid extraction with activated charcoal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 18: 8309-8313
- Ruoff K. 2006. Authentication of the botanical origin of honey. Doctoral and habilitation theses. Zürich, ETHZ: 203 str.  
<http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:29417/eth-29417-02.pdf> (marec 2012)
- Ruoff K., Bogdanov S. 2004. Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta*, 38: 317-327
- Ruoff K., Luginbühl W., Bogdanov S., Bosset J.O., Estermann B., Ziolkó T., Amadó R. 2006. Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 18: 6867-6872
- Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Piana L., Lodesani M. 2008. *Conoscere il miele*. 6<sup>th</sup> ed. Bologna, CRA-API: 371 str.
- Saraiva M., Campos Cunha I., Costa Bonito C., Pena C., Toscano M.M., Teixeira Lopes T., Sousa I., Calhau M.A. 2012. First case of infant botulism in Portugal. *Food Control*, 26, 1: 79-80
- SAZU. 2000. Slovar slovenskega knjižnega jezika: pristnost. Spletna izdaja. Likar V. (ur.). Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 1 str.  
<http://bos.zrc-sazu.si/sskj.html> (februar, 2011)
- Schellenberg A., Chmielus S., Schlicht C., Camin F., Perini M., Bontempo L., Heinrich K., Kelly S.D., Rossmann A., Thomas F., Jamin E., Horacek M. 2010. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. *Food Chemistry*, 121, 3: 770-777
- Serrano S., Espejo R., Villarejo M., Jodral M.L. 2007. Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 1: 76-79
- Simsek A., Bilsel M., Goren A.C. 2012. <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chemistry*, 130, 4: 1115-1121
- Sivakesava S., Irudayaraj J. 2002. Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science & Technology*, 37, 4: 351-360

- Spink J., Moyer D.C. 2011. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76, 9: R157-R163
- Swallow K.W., Low N.H. 1994. Determination of honey authenticity by anion-exchange liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 77, 3: 695-702
- Šari G., Matkovi D., Hruškar M., Vahi N. 2008. Characterisation and classification of Croatian honey by physicochemical parameters. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 4: 355-367
- TARIC. 2012. Taxation and Customs Union Directorate-General. Online customs tariff database. Brussels, European Commission's Taxation and Customs Union Directorate-General: 5 str.  
[http://ec.europa.eu/taxation\\_customs/customs/customs\\_duties/tariff\\_aspects/customs\\_tariff/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/taxation_customs/customs/customs_duties/tariff_aspects/customs_tariff/index_en.htm) (februar 2012)
- The Great Olive Oil Scandal. 2012. 3 str.  
[http://web.mac.com/steve.middlehurst/fontemonache/Olive\\_Oil\\_Scandal.html](http://web.mac.com/steve.middlehurst/fontemonache/Olive_Oil_Scandal.html) (marec, 2012).
- TRACE. 2009. Food authentication by chemical profiling. Tracing the origin of food: a project funded by the European Commission through the Sixth Framework Programme. Sand Hutton, The Food and Environment Research Agency: 35 str.  
[http://www.trace.eu.org/ft/doc/Consumer\\_Booklet\\_Final.pdf](http://www.trace.eu.org/ft/doc/Consumer_Booklet_Final.pdf) (maj 2011)
- Tuberoso C.I.G., Bifulco E., Caboni P., Sarais G., Cottiglia F., Floris I. 2010. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1: 364-369
- Tyan Y.C., Yang M.H., Jong S.B., Wang C.K., Shiea J. 2009. Melamine contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 3: 729-735
- Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega parlamenta in sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih na el in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. 2002. Uradni list Evropske unije, 45 L31: 1-24
- Uredba o kombinirani nomenklaturi carinske tarife s carinsko tarifo. 1999. Uradni list Republike Slovenije, 9, 97: 14133-14209
- Uredba Sveta (ES) št. 509/2006 z dne 20. marca 2006 o zajam enih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil. 2006. Uradni list Evropske unije L 93: 1-11
- Uredba Sveta (ES) št. 510/2006 z dne 20. marca 2006 o zaš itih geografskih ozna b in ozna b porekla za kmetijske proizvode in živila. 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L93: 12-25
- van der Lans I.A., van Ittersum K., De Cicco A., Loseby M. 2001. The role of the region of origin and EU certificates of origin in consumer evaluation of food products. *European Review of Agricultural Economics*, 28, 4: 451-477
- Vit P. 2009. Expanded parameters to assess the quality of honey from Venezuelan bees (*Apis mellifera*). *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 3: 72-81
- Wang J., Kliks M.M., Qu W., Jun S., Shi G., Li Q.X. 2009. Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 21: 10081-10088

- Wang J., Li Q.X. 2011. Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. V: *Advances in food and nutrition research*. Vol. 62. Steve L. T. (ed.). London, Academic Press: 89-137.
- White J.W., Doner L.W. 1978. Mass spectrometric detection of high fructose corn syrup in honey by use of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 61, 746-750
- White J.W., Jr. 1978. Honey. *Advanced in Food Research*, 24: 287-374
- White J.W., Jr. 1980. Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 63, 1: 11-18
- White J.W., Jr., Siciliano J. 1980. Hydroxymethylfurfural and honey adulteration. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 63, 1: 7-10
- White J.W., Rudy O.N. 1978. The protein content of honey. *Journal of Apicultural Research*, 17, 4: 234-238
- White J.W., Winters K. 1989. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 72, 6: 907-911
- White J.W., Winters K., Martin P., Rossman A. 1998. Stable carbon ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. *Journal of AOAC International*, 81, 610-619
- Wiley H.W. 1899. Food adulteration in its relation to the public health. *Public Health Papers and Reports*, 25: 145-153
- Won S.-R., Lee D.-C., Ko S.H., Kim J.-W., Rhee H.-I. 2008. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 41, 10: 952-956
- Woodcock T., Downey G., Kelly J.D., O'Donnell C. 2007. Geographical classification of honey samples by near-infrared spectroscopy: A feasibility study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 22: 9128-9134
- Woodcock T., Downey G., O'Donnell C.P. 2009. Near infrared spectral fingerprinting for confirmation of claimed PDO provenance of honey. *Food Chemistry*, 114, 2: 742-746
- Zakon o izvajanju carinskih predpisov Evropske skupnosti (ZICPES). 2004. Uradni list Republike Slovenije, 25: 2821-2836
- Združenje Ko evski gozdni med. 2009. »Ko evski gozdni med« ZOP. Ko evje, Združenje Ko evski gozdni med: 49 str.



## ZAHVALA

Ni ni resni no, vse je dovoljeno.  
vrhovni izrek izmailcev  
Vladimir Bartol, Alamut

Ta izrek je žal vsepreve krat vodilo tudi v 21. stoletju. Z raziskavo smo na primeru medu želeli pokazati, da je vodilo zmotno. Pristen med se razlikuje od ponareodka, eprav to z le eno analizo trenutno še težko dokažemo. Toda, brez teh dokazov so nemo ni tudi pravni akti, ki nas potrošnike sicer š itijo pred zavajANJI in ponaredkI.

Na prvih straneh s podpisom potrjujem, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. To vsekakor drži, vendar pa vas je veliko, ki ste idejno ali fizi no prispevali k njenemu nastajanju. Vsem vam gre velika zahvala, da je naloga dobila kon no obliko.

Nekako v skladu z mojim zna ajem, je to delo raslo tudi v manj obi ajnih urah in okoljih. Zato se v prvi vrsti zahvaljujem moji družini; Niki, ki je potrpežljivo sprejela, da med drugim vsak ve er pred spanjem ne moreva brati pravljiC, in Matevžu, ki je prevzel marsikatero vlogo in opravilo ter stoji no prenašal samotne ve ere. Zanimivo, kakšne uporabne nasvete in odli ne ideje sem dobila od tebe, ki se v med spuš aš zgolj toliko, da ga zajameš z žlico. Hvala mojima staršema, Vesni za vso pomo in potrpežljivost, in Tomažu za to, ker kljub ob asno polžji hitrosti razpletanja raziskave, ni obupal nad mano. Ni dvoma, da sta vztrajnost in potrpežljivost v genih naše družine.

Raziskave medu so nekakšen sinonim za analitiko, ki timsko te e na naši katedri. Hvala, Zinka. Ne samo za to, ker ste mi dali priložnost, da postanem del katedre in tudi ne le za to, ker ste prevzeli mentorstvo disertacije ter ob pregledu opravljenih raziskav odprli kakšno vprašanje, ki bi sicer ostalo spregledano. Hvala predvsem za to, ker ste mi pokazali, kako biti vodja in ostati lovek.

Rešitev za marsikatero težavo smo našle med jutranjo kavo, pa naj se sliši še tako udno. Hvala, Jasna za predebatirane ideje, preposlušane težave v analitiki in potrpljenje. Urška, še vedno se ne morem navaditi, da zdaj rešujeva vprašanja, razpravljava in modrujeva le telefonsko ali prek elektronske pošte. Ne pogosto, vendar zelo u inkovito. Hvala tudi tebi, Marinka. Vedno si prisko ila na pomo , ko je bila panika v laboratoriju, ali pa pripravila aj, ko je bila kriza, in ne nazadnje Niki razkazala zanimivosti na Oddelku, da sem lahko v miru zaklju ila analize.

Somentorica, prof. dr. Nives Ogrinc, mi je z analizami stabilnih izotopov lahkih elementov omogo ila vpogled v pristnost medu onkraj klasi nih parametrov kakovosti medu. Hvala, Nives za posredovano znanje in vložen trud v disertacijo. Upam, da bomo odprta vprašanja raziskovali naprej in dopolnjevali podatkovne baze slovenskih živil.

lanoma komisije prof. dr. Rajku Vidrihu in prof. dr. Janku Boži u se zahvaljujem za pregled disertacije in pripombe, ki so jo še izboljšale, obenem pa odprla nova vprašanja, ki bi jih lahko pojasnili z nadaljnji raziskavami.

Med je zelo sladko živilo, vendar pa dolo anje sladkorjev v njem nikakor ni preprosto. Hvala dr. Tomažu Polaku za vztrajnost pri postavljanju metode in vložen as, da le-ta zdaj res izpiljena.

Obenem se zahvaljujem še Lini Burkan Makivi , ki je poskrbela za dokumentacijsko informacijo in skrbno preverila, da oblika naloge in navajanje virov ustrežata navodilom.

Ob koncu se zahvaljujem še slovenskim ebelarjem in ebelarskim društvom, ki so ve let zapored prispevali predmet raziskave - vzorce medu različnih vrst.

## PRILOGE

PRILOGA A: Referen ni standardi za dolo anje aminokislinske sestave in njihove karakteristike

Referen ni standard	Delež komponente (%)	Proizvajalec
alanin	100,00	Fluka
allo-izolevcin	100,00	Sigma
glutaminska kislina	99,00	Sigma
glutamin	99,50	Sigma
izolevcin	99,50	Sigma
serin	99,00	Sigma
triptofan	99,50	Sigma
arginin	98,70	USP
asparagin	100,08	USP
asparaginska kislina	100,00	USP
cistein	98,30	USP
glicin	100,00	USP
histidin	99,58	USP
levcin	100,00	USP
lizin	99,70	USP
metionin	100,00	USP
fenilalanin	100,00	USP
prolin	99,78	USP
treonin	100,00	USP
tirozin	100,00	USP
valin	100,00	USP

**PRILOGA B: Ustreznost kromatografskega sistema za določanje aminokislinske sestave medu (SST-test)**

Ustreznost sistema preverimo pred pričetkom dela tako, da raztopino delovnega standarda injiciramo 5-krat. Parametri ustreznosti in njihovi kriteriji:

- preciznost sistema (ponovljivost injiciranja) RS1: RSD (n = 5) = 2,0 %,
- število teoretskih podov kolone za RS1: N = 2000,
- faktor popačenja kolone: 0,7 % T = 2,0 %,
- ločljivost: R = 0,5,
- pokrivanje standardov RS1/RS2 = 2,0 %.

Priemer je:

- RSD - relativni standardni odklon  $RSD(\%) = s/X \cdot 100$  (enaba 6),
- N - razmerje med višino in površino gaussove krivulje,
- T - simetričnost kromatografskih vrhov, podajamo kot faktor popačenja (T),
- R - ločljivost sosednjih vrhov je merilo za kakovost separacije.

**PRILOGA B1: Kriteriji sprejemljivosti validacijskih parametrov**

<b>Validacijski parametri</b>	<b>Kriterij sprejemljivosti</b>
konc. območje analiziranih standardov	125 %, 100 %, 75 %, 25 %, 12,5 %
$r^2$	$r^2 = 0,99$
LOD (%) meja detekcije	
LOQ (%) meja kvantifikacije	
resolucija med standardi (R)	R = 0,5
ponovljivost injiciranja (RS1)	n = 5, RSD = 2,0 %
št. teoretičnih podov (N)	N = 2000
faktor popačenja (T)	0,7 % T = 2,0 %
pokrivanje standardov (S1/S2)	RS1/RS2 = 2,0 %

PRILOGA B2: Rezultati preiskovanih referenčnih standardov za ustreznost kromatografskega sistema za določanje aminokislinske sestave medu

		Konc. območje	Linear-nost	LOD	LOQ					Ponov-ljivost
SST ref.st.	Okraj-šava	(mg/ $\mu$ L)	$r^2$	(%)	(%)	R	N	T	RS1/RS2	RSD (%)
asparaginska kislina	Asp	0,2584-2,584	0,9933	1,4	2,7	0	4630	0,84	1,0	0,06
glutaminska kislina	Glu	0,3722-3,722	0,9969	1,2	2,5	4,83	6735	0,90	0,4	0,32
asparagin	Asn	0,4128-4,128	0,9968	1,2	2,1	20,09	10410	0,91	1,6	0,10
serin	Ser	0,3704-3,704	0,9951	1,2	2,3	1,77	10265	0,82	1,9	0,23
glutamin	Gln	0,7190-7,190	0,9969	1,2	2,6	2,81	9792	0,82	1,8	1,34
histidin	His	0,2766-2,766	0,9915	1,6	3,2	1,96	9713	0,78	1,1	1,78
glicin	Gly	0,2646-2,646	0,9968	1,1	2,1	5,30	18048	0,80	1,9	0,12
alanin	Ala	0,8036-8,036	0,9961	0,8	1,6	4,22	31792	0,88	1,4	0,12
treonin	Thr	0,2962-2,962	0,9973	1,3	2,4	2,27	37293	0,83	2,0	1,89
arginin	Arg	0,2860-2,860	0,9971	1,2	2,6	2,49	53741	0,83	0,3	0,59
prolin	Pro	3,3000-33,00	0,9993	0,6	1,2	15,29	109914	0,86	1,3	0,43
tirozin	Tyr	0,5708-5,708	0,9972	1,0	1,9	8,53	103739	0,81	0,9	0,20
valin	Val	0,3600-3,600	0,9976	1,3	2,3	21,01	72393	0,80	1,9	0,44
metionin	Met	0,3626-3,626	0,9983	1,4	2,7	2,79	63320	0,80	1,9	1,28
cistein	Cys	0,2484-2,484	0,9986	3,8	8,8	14,16	50813	0,82	1,4	1,59
triptofan	Trp	0,2438-2,438	0,9963	0,7	1,4	2,78	36292	0,84	0,8	1,65
alo-izolevcin	Allo- Ile	0,2196-2,196	0,9970	2,1	4,5	4,50	10914	0,80	2,0	1,25
izolevcin	Ile	0,3064-3,064	0,9908	2,9	5,2	0,46	42061	0,76	1,5	1,33
fenilalanin	Phe	3,0210-30,21	0,9988	1,2	2,4	2,45	42061	0,81	1,0	0,20
levcin	Leu	0,2954-2,954	0,9911	1,1	2,1	12,03	872774	0,81	1,0	1,14
lizin	Lys	0,3088-3,088	0,9975	1,5	2,9	2,79	2060690	0,83	0,2	0,32

Priprava standardnih raztopin za določanje linearne regresije:

Pripravljeno standardno raztopino S1 redimo (5mL/10, 4mL/10, 3mL/10 in 0,5mL/10) dodamo 0,5 mL 5M raztopine NaOH, ter dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH=9,2. Tako pripravimo 125 %, 100 %, 75 %, 25 % in 12,5 % raztopino, glede na delovni standard. Nato sledi derivatizacija po opisanem postopku v točki 3.5.

## PRILOGA C: Pregled parametrov validacije metode

Validacija metode je zadnji korak v postopku razvoja analizne metode. Validacija analitske metode je postopek, s katerim ovrednotimo karakteristike analitske metode in potrdimo, ali je metoda primerna. Je pomemben del analitskega postopka (Snyder in sod., 1997).

### Ponovljivost (angl. Repeatability)

Ponovljivost analiznega postopka je obseg ujemanja rezultatov v seriji meritev, pridobljenih z ve kratnim vzor enjem istega homogenega vzorca v predpisanih pogojih. Ponovljivost lahko podamo kot standardni odmik ( $s$ ) ali kot relativni standardni odmik (RSD).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - X_i)^2}{N - 1}} \quad \dots (5)$$

ali

$$\text{RSD} = \frac{s}{X} \cdot 100 \quad \dots (6)$$

$s$  = standardni odmik  
 $X$  = aritmetična sredina (povprečje)  
 $X_i$  =  $i$ -ti rezultat  
 $N$  = število meritev  
RSD = relativni standardni odmik

### Ponovljivost

Ponovljivost je ponovljivost analiznega postopka znotraj laboratorija. Med seboj smo primerjali ponovljivost rezultatov, ki smo jih dobili na dveh različnih HPLC sistemih. Za primerjavo smo vzeli isti vzorec kot pri preverjanju dnevne ponovljivosti. Kriteriji sprejemljivosti: natančnost (ponovljivost RSD = 10 %).

Pravilnost ali točnost analitske metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne (točne) rezultate. Eden od načinov je primerjanje rezultatov z referenčnim standardom, za katerega vemo, da nima sistemske napake. Čim manjša je razlika med povprečjem meritev in pravo (referenčno) vrednostjo, tem bolj je metoda točna (referenčni vzorec v našem primeru nimamo). Drugi način je metoda standardnih dodatkov – dodajanje znane koncentracije standarda v treh koncentracijskih nivojih v raztopino vzorca. Točnost izrazimo kot % izkoristka analita. Kriteriji sprejemljivosti točnosti: izkoristek (%) =  $100 \pm 20$  %

Izrazimo jo kot :

$$\text{izkoristek (\%)} = \frac{[c]_{\text{dobljeno}} * 100}{[c]_{\text{dodano}}} \quad \dots (7)$$

$c$  = koncentracija

### Linearnost

Linearnost je zmožnost analiznega postopka (znotraj definiranega območja), da daje rezultate, ki so neposredno sorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Linearnost moramo oceniti prek celotnega območja analiznega postopka. Določimo jo z analizo serije raztopin standardov v najmanj šestih različnih koncentracijah. Kot rezultate predložimo ena bo linearne regresije, koeficient determinacije ( $r^2$ ), odsek na y-osi in naklon regresijske krivulje. Metoda je linearna,  $r^2$  je koeficient korelacije vsaj 0,99. Kriteriji sprejemljivosti:  $r^2 \geq 0,990$ .

Kriteriji sprejemljivosti:  $t_{rst}(\text{standarda}) = t_{rvz}(\text{vzorca})$

$t_r$  = retencijski čas

Meja zaznave (LOD - angl. limit of detection) je najnižja koncentracija analizirane komponente, ki jo lahko določimo v vzorcu, vendar je ne moremo kvantitativno ovrednotiti. V kromatografiji je meja zaznave injicirana količina, katere višina vrha, oziroma ploščina, je trikrat višja od šuma bazne linije. Kriteriji sprejemljivosti • meja zaznave, odziv : šum = 3 : 1.

Meja kvantifikacije (LOQ - angl. limit of quantification)

Meja kvantifikacije analiznega postopka je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo je mogoče kvantitativno določiti z ustrezno natančnostjo in točnostjo. Običajno je meja določena najnižja točka umeritvene krivulje oziroma najnižja koncentracija standardne raztopine, ki smo jo merili in kvantificirali. Kriteriji sprejemljivosti • meja kvantifikacije, odziv : šum = 10 : 1. Opisuje jo naslednja enačba:

$$S/N = \frac{\text{signal}}{\text{šum}} = \frac{2H}{h} \quad \dots (8)$$

H = višina vrha

h = višina šuma (bazne linije)

PRILOGA D: Povpre ne vrednosti in opisne statistike osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu razli nih vrst in treh letnikov

PRILOGA D1: Povpre ne vrednosti in opisne statistike vsebnosti vode, F + G, saharoze, elektri ne prevodnosti in diastaznega števila v medu razli nih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statisti ni parameter	voda (g/100 g)	$\chi$ (mS/cm)	F + G (g/100 g)	saharozap (g/100 g)	saharozahPLC (g/100 g)	diastaza (DN)
akacijev	2008	<i>n</i>	3	3		3		3
		$\bar{x}$	14,8	0,16		2,96		9,7
		$x_{min}$	14,3	0,12		1,72		7,7
		$x_{max}$	15,3	0,19		3,58		11,4
		SD	0,5	0,04		1,07		1,9
	2009	KV (%)	3,52	22,0		36,3		19,3
		<i>n</i>	19	19		19		19
		$\bar{x}$	14,6	0,19		2,85		10,3
		$x_{min}$	13,7	0,13		0,86		5,9
		$x_{max}$	16,5	0,29		5,01		13,7
	2010	SD	0,7	0,05		1,18		2,5
		KV (%)	4,70	27,4		41,4		24,1
		<i>n</i>	7	7	6		6	5
		$\bar{x}$	16,1	0,23	68,3		1,78	14,4
		$x_{min}$	15,5	0,14	65,6		0,36	10,7
cvetli ni	2008	$x_{max}$	16,5	0,26	69,5		6,12	17,9
		SD	0,4	0,05	1,4		2,20	2,8
		KV (%)	2,71	22,7	2,05		123	19,2
		<i>n</i>	16	16		15		15
		$\bar{x}$	15,3	0,65		1,80		17,4
	2009	$x_{min}$	14,3	0,43		0,14		13,9
		$x_{max}$	17,4	0,86		5,30		24,3
		SD	0,9	0,14		1,40		3,0
		KV (%)	6,08	21,69		77,6		17,2
		<i>n</i>	18	18	1	18	1	18
	2010	$\bar{x}$	14,4	0,61	67,91	2,06	1,10	15,7
		$x_{min}$	12,8	0,30		0,43		6,4
		$x_{max}$	17,2	0,86		3,58		23,3
		SD	1,0	0,15		1,14		4,0
		KV (%)	6,70	23,9		55,3		25,7
lipov	2008	<i>n</i>	7	6	4		4	5
		$\bar{x}$	16,9	0,58	65,7		2,06	16,6
		$x_{min}$	15,2	0,38	63,4		0,89	10,1
		$x_{max}$	18,2	0,81	68,5		4,19	19,7
		SD	1,0	0,14	2,2		1,50	3,8
	2009	KV (%)	5,76	24,6	3,31		73,2	22,8
		<i>n</i>	6	6		3		4
		$\bar{x}$	15,3	0,78		2,58		15,8
		$x_{min}$	14,8	0,65		0,57		13,1
		$x_{max}$	16,2	0,87		4,01		20,7
	2010	SD	0,5	0,09		1,79		3,6
		KV (%)	3,37	11,0		69,5		22,7
		<i>n</i>	13	13		13		13
		$\bar{x}$	14,3	0,82		1,67		14,7
		$x_{min}$	13,7	0,56		0,43		9,9
2009	$x_{max}$	15,1	1,02		4,01		21,2	
	SD	0,4	0,16		1,15		3,6	
	KV (%)	2,84	19,4		68,6		24,3	



... nadaljevanje

PRILOGA D1: Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti vode, fruktoze in glukoze, saharoze, električne prevodnosti in diastaznega števila v medu različnih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statistični parameter	voda (g/100 g)	$\chi$ (mS/cm)	F + G (g/100 g)	saharozap (g/100 g)	saharozahPLC (g/100 g)	diastaza (DN)	
lipov	2010	$n$	4	4	4		4	3	
		$\bar{x}$	16,9	0,73	68,1		0,39	14,5	
		$x_{min}$	15,9	0,70	65,6		0,28	12,5	
		$x_{max}$	19,0	0,74	70,3		0,43	16,1	
		SD	1,41	0,02	1,9		0,07	1,9	
		KV (%)	8,4	2,53	2,85		18,5	12,9	
kostonjev	2008	$n$	11	11				6	
		$\bar{x}$	14,8	1,71				17,8	
		$x_{min}$	13,6	1,32				15,5	
		$x_{max}$	16,7	2,14				20,0	
		SD	1,0	0,27				1,7	
			KV (%)	6,7	15,9			9,5	
	2009	$n$	15	15		10		12	
		$\bar{x}$	14,6	1,58		1,77		21,1	
		$x_{min}$	13,3	1,03		0,43		15,2	
		$x_{max}$	16,4	2,00		2,72		27,4	
		SD	0,8	0,30		0,67		3,4	
			KV (%)	5,5	18,9		37,9	16,2	
	2010	$n$	5	5	5		5	5	
		$\bar{x}$	16,2	1,39	63,9		0,48	18,7	
		$x_{min}$	15,4	0,81	62,9		0,16	16,8	
$x_{max}$		16,9	1,85	64,8		1,10	20,4		
SD		0,5	0,45	0,8		0,36	1,5		
		KV (%)	3,3	32,6	1,27	75,4	7,8		
gozdni	2008	$n$	27	27		21		22	
		$\bar{x}$	14,5	1,13		2,10		18,5	
		$x_{min}$	13,2	0,65		0,29		12,5	
		$x_{max}$	16,2	1,75		4,58		25,3	
		SD	0,7	0,27		1,08		3,1	
			KV (%)	5,1	24,0		51,7	16,7	
	2009	$n$	11	11	1	10	1	10	
		$\bar{x}$	14,7	1,30	64,3	2,08	1,49	19,5	
		$x_{min}$	12,9	0,87		0,57		12,5	
		$x_{max}$	18,0	1,72		4,58		26,6	
		SD	1,5	0,30		1,30		4,1	
			KV (%)	10,3	23,0		62,7	0,00	21,2
	2010	$n$	1	1	1		1	1	
		$\bar{x}$	16,9	0,72	60,6		1,35	16,5	
		$x_{min}$							
$x_{max}$									
SD									
		KV (%)							

... nadaljevanje

PRILOGA D1: Povpre ne vrednosti in opisne statistike vsebnosti vode, fruktoze in glukoze, saharoze, elektri ne prevodnosti in diastaznega števila v medu razli nih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statisti ni parameter	voda (g/100 g)	$\chi$ (mS/cm)	F + G (g/100 g)	saharozap (g/100 g)	saharozahPLC (g/100 g)	diastaza (DN)
hojev	2008	<i>n</i>	5	5		5		5
		$\bar{x}$	14,8	1,38		1,92		21,5
		$x_{min}$	13,6	1,26		1,29		15,9
		$x_{max}$	15,7	1,65		3,15		34,1
		SD	0,9	0,17		0,84		7,2
	KV (%)	5,85	12,1		43,7		33,6	
	2010	<i>n</i>	4	4	4		4	2
		$\bar{x}$	15,9	1,19	58,6		1,75	14,6
		$x_{min}$	15,4	1,06	56,6		0,33	13,4
		$x_{max}$	16,2	1,36	60,8		3,33	15,7
SD		0,4	0,14	2,2		1,63	1,7	
KV (%)	2,26	12,2	3,78		93,4	11,4		
smrekov	2008	<i>n</i>	3	3		3		3
		$\bar{x}$	15,1	1,31		2,31		22,2
		$x_{min}$	14,3	1,00		1,14		21,0
		$x_{max}$	16,2	1,56		3,55		24,2
		SD	1,0	0,29		1,21		1,7
	KV (%)	6,34	21,8		52,3		7,71	
	2009	<i>n</i>	1	1		1		1
		$\bar{x}$	13,4	1,15		1,57		24,2
		$x_{min}$						
		$x_{max}$						
		SD						
	KV (%)							
	2010	<i>n</i>	3	3	2		2	1
		$\bar{x}$	15,7	1,19	63,7		1,28	9,4
		$x_{min}$	15,4	1,00	63,5		1,15	
$x_{max}$		15,9	1,32	64,0		1,40		
SD		0,3	0,17	0,3		0,18		
KV (%)	1,83	14,5	0,49		13,9			
m. divje ešnje	2009	<i>n</i>	1	1	1,00		1	
		$\bar{x}$	14,2	0,46	67,3		0,20	
		$x_{min}$						
		$x_{max}$						
		SD						
	KV (%)							
	2010	<i>n</i>	1	1	1		1	
$\bar{x}$	16,4	0,82	65,3		0,11			
$x_{min}$								
$x_{max}$								
SD								

... nadaljevanje

PRILOGA D1: Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti vode, fruktoze in glukoze, saharoze, električne prevodnosti in diastaznega števila v medu različnih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statistični parameter	voda (g/100 g)	$\chi$ (mS/cm)	F + G (g/100 g)	saharozap (g/100 g)	saharozahPLC (g/100 g)	diastaza (DN)
m. oljne ogrščice	2008	$n$	13	13	2		2	
		$\bar{x}$	16,3	0,42	69,9		0,52	
		$x_{min}$	15,1	0,30	69,7		0,23	
		$x_{max}$	17,5	0,56	70,0		0,80	
		SD	0,7	0,08	0,2		0,40	
	KV (%)	4,44	19,8	0,21		78,3		
	2009	$n$	15	15		2		
		$\bar{x}$	15,8	0,37		3,07		
		$x_{min}$	14,2	0,22		2,89		
		$x_{max}$	19,4	0,42		3,25		
SD		1,4	0,05		0,25			
KV (%)	9,13	12,9		8,29				
škrdatov	2009	$n$	1	1				
		$\bar{x}$	13,1	1,74				
		$x_{min}$						
		$x_{max}$						
		SD						
KV (%)								
rešeljnikov	2008	$n$	7	7	7		7	
		$\bar{x}$	15,6	0,81	66,1		0,79	
		$x_{min}$	14,6	0,67	65,1		0,29	
		$x_{max}$	16,6	0,97	67,5		1,35	
		SD	0,8	0,12	0,9		0,34	
	KV (%)	4,80	15,0	1,35		43,2		
	2009	$n$	6	6	6		6	
		$\bar{x}$	15,3	0,80	65,5		0,63	
		$x_{min}$	14,6	0,48	64,4		0,13	
		$x_{max}$	16,2	1,11	67,2		1,29	
		SD	0,8	0,27	1,2		0,51	
	KV (%)	5,09	33,9	1,84		81,1		
	2010	$n$	4	4	4		4	
		$\bar{x}$	16,3	0,73	65,4		1,40	
		$x_{min}$	15,5	0,56	64,5		0,80	
$x_{max}$		17,2	1,15	66,0		2,21		
SD		0,8	0,28	0,7		0,62		
KV (%)	4,58	38,4	1,13		44,2			
ajdov	2008	$n$	2	2				
		$\bar{x}$	15,5	0,82				
		$x_{min}$	13,8	0,65				
		$x_{max}$	17,2	1,00				
		SD	2,4	0,24				
	KV (%)	15,5	29,6					
	2010	$n$	1	1	1		1	
		$\bar{x}$	15,0	0,63	66,7		3,30	
		$x_{min}$						
		$x_{max}$						
SD								
KV (%)								

PRILOGA D2: Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti HMF, prostih, skupnih kislin in laktonov ter pH v medu različnih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statistični parameter	HMF (mg/kg)	proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH
akacijev	2008	<i>n</i>		3	3	3	3
		$\bar{x}$		9,9	5,64	15,6	4,10
		$x_{min}$		9,4	5,14	14,5	4,07
		$x_{max}$		10,6	6,29	16,2	4,15
		SD		0,6	0,59	0,9	0,04
		KV (%)		6,12	10,5	5,95	1,01
	2009	<i>n</i>		19	19	19	19
		$\bar{x}$		9,2	5,12	14,3	4,24
		$x_{min}$		6,5	0,39	9,2	4,00
		$x_{max}$		11,1	7,47	17,5	4,46
		SD		1,2	1,84	2,2	0,12
		KV (%)		13,1	36,0	15,4	2,92
	2010	<i>n</i>	5	7	7	7	7
		$\bar{x}$	3,36	13,5	5,86	19,3	3,91
		$x_{min}$	2,02	7,3	4,19	11,5	3,62
$x_{max}$		5,18	22,3	9,29	29,0	4,06	
SD		1,67	5,8	2,01	7,3	0,19	
	KV (%)	49,6	42,7	34,2	37,6	4,81	
cvetlični	2008	<i>n</i>		15	15	15	16
		$\bar{x}$		19,4	3,71	23,1	4,30
		$x_{min}$		8,7	0,13	12,8	3,88
		$x_{max}$		33,5	6,64	33,6	4,91
		SD		7,1	1,74	6,7	0,32
		KV (%)		36,7	47,0	29,1	7,54
	2009	<i>n</i>	1	18	18	18	18
		$\bar{x}$	2,81	17,5	3,15	20,6	4,51
		$x_{min}$		8,7	0,08	11,9	4,01
		$x_{max}$		42,7	5,41	43,7	5,16
		SD		8,0	1,68	7,3	0,36
		KV (%)		45,9	53,4	35,2	8,02
	2010	<i>n</i>	5	6	6	6	6
		$\bar{x}$	11,25	19,9	6,84	26,8	4,16
		$x_{min}$	7,01	15,7	3,55	19,2	3,88
$x_{max}$		20,9	24,0	9,01	32,6	4,71	
SD		5,54	3,6	1,97	5,4	0,31	
	KV (%)	49,2	18,0	28,8	20,3	7,36	
lipov	2008	<i>n</i>		5	5	5	5
		$\bar{x}$		20,8	4,32	25,1	4,85
		$x_{min}$		7,1	2,01	12,4	4,12
		$x_{max}$		38,4	6,54	45,0	5,16
		SD		13,7	1,83	14,0	0,43
		KV (%)		65,8	42,4	55,7	8,79
	2009	<i>n</i>		13	13	13	13
		$\bar{x}$		13,6	3,37	16,9	4,97
		$x_{min}$		7,1	1,23	10,2	4,11
		$x_{max}$		32,0	5,59	33,2	6,02
		SD		6,7	1,38	5,9	0,51
		KV (%)		49,0	40,8	34,9	10,2
	2010	<i>n</i>	3	4	4	4	4
		$\bar{x}$	1,60	12,4	3,50	15,9	4,90
		$x_{min}$	0,86	6,5	0,67	7,2	4,29
$x_{max}$		2,11	15,5	7,65	23,0	5,39	
SD		0,65	4,2	3,10	6,6	0,56	
	KV (%)	41,0	34,0	88,6	41,3	11,4	

... se nadaljuje

PRILOGA D2: Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti HMF, prostih, skupnih kislin in laktonov ter pH v medu različnih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statistični parameter	HMF (mg/kg)	proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH
kostonjev	2008	$n$		11	11	11	11
		$\bar{x}$		21,2	3,82	25,0	4,96
		$x_{min}$		11,1	0,00	11,1	4,45
		$x_{max}$		29,7	7,79	37,4	5,96
		SD		6,2	2,16	8,2	0,44
	2009	KV (%)		29,3	56,5	32,9	8,84
		$n$		10	10	10	15
		$\bar{x}$		11,5	2,91	14,4	5,17
		$x_{min}$		7,3	0,00	11,1	4,35
		$x_{max}$		14,5	5,49	19,9	6,10
	2010	SD		3,1	1,82	3,4	0,60
		KV (%)		27,3	62,7	23,3	11,6
		$n$	5	5	5	5	5
		$\bar{x}$	1,71	11,1	3,58	14,7	5,45
		$x_{min}$	0,67	6,1	1,90	8,5	4,47
gozdni	2008	$x_{max}$	2,40	18,3	6,31	22,7	6,42
		SD	0,64	5,2	1,80	6,5	0,85
		KV (%)	37,2	46,4	50,3	44,3	15,5
		$n$		17	17	18	18
		$\bar{x}$		27,0	3,17	28,5	4,60
	2009	$x_{min}$		18,3	1,50	0,0	4,28
		$x_{max}$		34,3	7,69	38,7	5,08
		SD		4,3	1,56	8,6	0,19
		KV (%)		15,8	49,2	30,2	4,24
		$n$	1	10	10	10	10
	2010	$\bar{x}$	0,21	21,2	2,96	24,1	4,91
		$x_{min}$		18,1	1,70	21,5	4,08
		$x_{max}$		24,2	4,07	28,3	5,37
		SD		2,2	0,84	2,3	0,45
		KV (%)		10,4	28,5	9,6	9,09
hojjev	2008	$n$	1	1	1	1	1
		$\bar{x}$	10,6	23,5	7,02	30,5	4,09
		$x_{min}$					
		$x_{max}$					
		SD					
	2009	KV (%)					
		$n$		5	5	5	5
		$\bar{x}$		20,0	3,14	19,2	5,26
		$x_{min}$		17,4	0,83	1,4	5,02
		$x_{max}$		25,4	5,05	30,5	5,43
	2010	SD		3,4	1,68	10,8	0,17
		KV (%)		16,8	53,5	56,2	3,32
		$n$	2	4	4	4	4
		$\bar{x}$	1,63	20,6	2,87	23,4	5,00
		$x_{min}$	1,44	13,8	2,20	16,3	4,85
2008	$x_{max}$	1,82	27,5	4,01	31,5	5,12	
	SD	0,27	5,6	0,79	6,3	0,11	
	KV (%)	16,4	27,4	27,5	26,8	2,27	

... se nadaljuje

PRILOGA D2: Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti HMF, prostih, skupnih kislin in laktonov ter pH v medu različnih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statistični parameter	HMF (mg/kg)	proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH	
smrekov	2008	<i>n</i>		3	3	3	3	
		$\bar{x}$		30,7	0,06	30,8	4,61	
		$x_{min}$		28,6	0,00	28,6	4,25	
		$x_{max}$		34,4	0,18	34,6	4,94	
		SD		3,2	0,10	3,3	0,35	
	KV (%)			10,5	173	10,8	7,50	
		2009	<i>n</i>		1	1	1	1
			$\bar{x}$		24,6	2,40	27,0	4,12
			$x_{min}$					
			$x_{max}$					
	SD							
	KV (%)							
		2010	<i>n</i>	1	3	3	3	3
			$\bar{x}$	0,48	23,4	5,54	28,9	5,08
			$x_{min}$		19,5	2,42	21,9	4,92
$x_{max}$				26,5	10,7	37,2	5,22	
SD			3,6	4,47	7,7	0,15		
KV (%)			15,3	80,8	26,6	2,97		
	m. divje češnje	2009	<i>n</i>		1	1	1	1
			$\bar{x}$		23,1	13,4	36,5	4,53
			$x_{min}$					
			$x_{max}$					
SD								
KV (%)								
	2010	<i>n</i>		1	1	1	1	
		$\bar{x}$		39,6	14,1	53,7	4,28	
		$x_{min}$						
		$x_{max}$						
SD								
KV (%)								
	m. oljne ogrščice	2008	<i>n</i>		4	4	4	12
			$\bar{x}$		24,2	4,45	19,7	4,11
			$x_{min}$		18,0	2,17	15,8	3,82
			$x_{max}$		28,7	6,20	22,5	4,33
SD				4,5	1,67	2,8	0,18	
KV (%)			18,6	37,7	14,3	4,42		
	2009	<i>n</i>		2,0	2	2	15	
		$\bar{x}$		16,5	6,50	23,0	4,13	
		$x_{min}$		14,3	6,25	21,0	3,72	
		$x_{max}$		18,7	6,75	25,0	4,34	
SD			3,2	0,35	2,8	0,16		
KV (%)			19,2	5,44	12,2	3,78		
	škržatov	2009	<i>n</i>		1	1	1	1
			$\bar{x}$		34,1	0,03	34,2	5,26
			$x_{min}$					
			$x_{max}$					
SD								
KV (%)								

... se nadaljuje

PRILOGA D2: Povprečne vrednosti in opisne statistike vsebnosti HMF, prostih, skupnih kislin in laktonov ter pH v medu različnih vrst treh letnikov

Vrsta medu	Letnik	Statistični parameter	HMF (mg/kg)	proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH
rešeljikov	2008	$n$		7	7	7	7
		$\bar{x}$		24,9	4,79	29,7	4,47
		$x_{min}$		22,9	3,07	26,9	4,31
		$x_{max}$		29,3	6,89	35,2	4,67
		SD		2,1	1,39	2,9	0,13
		KV (%)		8,3	29,1	9,6	2,85
	2009	$n$		5	5	5	6
		$\bar{x}$		22,8	4,94	27,8	4,52
		$x_{min}$		19,0	3,40	22,9	4,20
		$x_{max}$		27,2	6,64	31,5	4,90
		SD		3,3	1,50	3,1	0,25
		KV (%)		14,4	30,4	11,2	5,45
	2010	$n$		4	4	4	4
		$\bar{x}$		25,4	4,13	29,5	4,54
		$x_{min}$		14,5	2,53	17,0	4,31
$x_{max}$			47,8	5,83	53,7	4,70	
SD			15,3	1,49	16,6	0,18	
KV (%)			60,2	36,0	56,2	4,05	
ajdov	2008	$n$		1	1	1	1
		$\bar{x}$		44,3	10,4	54,7	3,74
		$x_{min}$					
		$x_{max}$					
		SD					
		KV (%)					
	2010	$n$		1	1	1	1
		$\bar{x}$		31,1	13,1	44,2	4,30
		$x_{min}$					
		SD					
	KV (%)						

PRILOGA E: Vrednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov, dolo enih v trgovinskih vzorcih medu.

Vrsta medu in oznaka vzorca	poreklo <sup>1</sup>	leto	senzori na ocena <sup>2</sup>	voda (g/100 g)	EP (mS/cm)	diastaza (DN)	HMF (mg/kg)	proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH
Akacijev med											
tA01	2	2008	-	17,7	0,934			23,7	6,70	30,4	4,95
tA02	2	2008	+	17,8	0,114			12,7	6,05	18,8	4,14
tA03	3	2008	+	18,1	0,147			10,9	5,55	16,5	4,25
tA04	4	2008	+	15,0	0,16	9,6	9,12	10,7	0,00	10,7	4,10
tA05	4	2008	o	15,9	0,27	7,1	51,7	18,9	1,56	20,5	4,21
tA06	4	2008	+	13,7	0,22	9,6	23,0	13,7	0,00	13,7	4,17
tA07	2	2009	+	18,1	0,16	9,7	3,74	18,4	0,15	18,6	4,21
tA08	1	2009	o	14,6	0,22	9,6	20,2	23,6	2,91	26,6	4,01
Cvetli ni med											
tC01	1	2010	-	19,6							
tC02	1	2010	-	18,7							
tC03	4	2008	+	17,6	0,445			16,9	7,03	24,0	4,53
tC04	4	2008	+	17,5	0,440			26,3	8,75	35,0	4,22
tC05	3	2008	+	18,9	0,220			8,7	4,55	13,3	4,88
tC06	4	2008	+	18,1	0,243			8,3	3,80	12,1	4,90
tC07	2	2008	+	17,9	0,450			27,9	9,13	37,0	4,21
tC08	4	2008	+	19,9	0,448			23,4	7,85	31,2	4,24
tC09	3	2008	+	17,7	0,449			23,3	9,98	33,3	4,33
tC10	2	2008	+	17,4	0,393			28,0	9,40	37,4	4,09
tC11	3	2008	+	18,2	0,249			24,5	8,90	33,4	4,07
tC12	4	2008	+	17,1	0,39	10,0	22,6				
tC13	4	2008	+	14,8	0,38	9,7	16,8	19,9	1,75	21,6	4,21
tC14	4	2008	+	15,5	0,31	10,7	17,8	17,1	1,61	18,7	4,08
tC15	4	2008	+	15,0	0,23	12,5	12,4	13,7	0,00	13,7	4,12
tC16	4	2008	+	13,1	0,79	13,5	15,7	21,9	2,48	24,4	3,98
tC17	4	2008	+	16,6	0,45	14,0	20,5				
tC18	4	2008	+	15,9	0,51	17,3	20,6	19,1	2,30	21,4	4,45
tC19	4	2008	+	15,2	0,44	14,6	30,2	27,0	2,46	29,4	3,95
tC20	4	2008	+	15,3	0,47	11,0	40,3	18,1	1,56	19,7	4,17
tC21	4	2008	+	16,1	0,40	14,2	6,5				4,06
tC22	3	2009	+	17,0	0,39	9,9	29,6	12,2	0,90	13,1	4,22
tC23	4	2009	+	17,9	0,38	15,2					
tC24	2	2009	+	17,6	0,45	14,9	7,58	20,5	0,09	20,6	4,13
tC25	1	2009	+	18,0	0,51	14,5	14,7	20,9	0,00	20,9	4,01
tC26	2	2009	o	18,9	0,28	7,1	1,54	18,8	0,00	18,8	4,25
tC27	4	2009	+	17,7	0,44	14,0	20,4	12,5	0,72	13,2	4,12
tC28	1	2009	+	16,9	0,48	10,8	62,9	20,6	2,65	23,2	4,30
tC29	4	2008	o	17,9	0,22	8,8	45,7	20,5	2,58	23,1	3,87
tC30	3	2008	+	17,7	0,501	4,6		28,7	9,65	38,3	4,21

<sup>1</sup> 1-Slovenija, 2-EU, 3-države izven EU, 4-mešanica (EU in države izven EU)

<sup>2</sup> +: zna ilne senzori ne lastnosti; o: manj zna ilne senzori ne lastnosti; -: nezna ilne senzori ne lastnosti



... nadaljevanje

Priloga E: Vrednosti osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov, dolo enih v trgovinskih vzorcih medu.

Vrsta medu in oznaka vzorca	poreklo	leto	senzori na ocena <sup>2</sup>	voda (g/100 g)	EP (mS/cm)	diastaza (DN)	HMF (mg/kg)	proste kisline (mekv/kg)	laktoni (mekv/kg)	skupne kisline (mekv/kg)	pH
Lipov med											
tL01	4	2008	o	17,5	0,440			27,0	7,85	34,9	4,21
tL02	3	2008	o	18,0	0,485			20,8	7,90	28,7	4,41
tL03	2	2009	+	18,1	0,82	10,2					
tL04	1	2009	-	15,7	0,24	11,5	4,61	21,7	0,00	21,7	4,36
tL05	4	2008	o	19,7	0,24	13,9	13,5	26,2	0,55	26,8	
Kostanjev med											
tK01	2	2008	-	17,4	0,976			24,4	6,48	30,8	4,92
tK02	4	2008	o	14,2	1,55	24,1	5,38	22,7	1,06	23,7	4,85
tK03	1	2009	+	16,2	1,16	18,1	71,3	8,63	0,00	8,63	5,02
tK04	4	2009	+	16,0	1,29	16,0	43,4	17,4	1,13	18,5	
tK05	1	2009	+	14,6	1,08	19,3	25,2	25,3	2,45	27,7	
Gozdni med											
tG01	4	2008	-	17,4	0,502			19,7	7,80	27,5	4,48
tG02	4	2008	+	17,6	1,024			18,5	7,40	25,9	5,11
tG03	4	2008	+	17,8	0,930			23,3	5,78	29,1	4,96
tG04	4	2008	+	17,3	0,903			42,6	7,33	50,0	4,60
tG05	4	2008	+	15,6	0,81	9,34	6,34	17,1	0,07	17,2	5,02
tG06	4	2008	+	14,4	1,09	13,6	9,50	30,4	0,00	30,4	4,65
tG07	4	2008	+	15,7	1,15	16,1	16,3	25,2	2,90	28,1	4,72
tG08	4	2008	+	14,5	1,29	16,5	12,5	21,6	0,00	21,6	4,43
tG09	4	2008	+	13,5	1,28	10,9	5,38	25,6	0,00	25,6	5,13
tG10	4	2008	+	13,6	1,07	17,0	9,12	22,7	0,00	22,7	4,76
tG11	1	2009	+	16,3	1,09	14,7	9,22	20,2	3,03	23,2	4,25
tG12	1	2009	+	14,1	0,79	14,9	41,5	14,2	1,75	16,0	
tG13	4	2009	-	17,5	0,40	16,6	36,7	18,3	0,00	18,3	
tG14	1	2009	+	15,2	1,51	22,0	12,4	15,7	0,00	15,7	
tG15	4	2008	-	19,3	0,36	11,7	31,2	10,2	0,00	10,2	
tG16	1	2008	+	18,5	0,94	13,0	33,9	16,4	3,20	19,6	
Hojev med											
tH01	1	2009	+	16,7	1,26	5,79	23,0	22,1	0,99	23,1	4,58
Med pomaran evca											
tP01	4	2008	o	18,5	0,159	3,43	28,9	13,5	5,60	19,1	4,14
Rožmarinov med											
tRM01	2	2008	+	18,2	0,220	3,43	16,2	18,0	6,60	24,6	4,14
Žajbljev med											
tZ01	2	2008	o	18,0	0,533	2,43	35,7	21,2	7,08	28,3	4,93
Timijanov med											
tT01	2	2008	o	18,1	0,286	3,86	27,4	26,2	8,40	34,6	4,08
Sivkin med											
tLA01	2	2008	+	18,3	0,245	3,58	17,5	12,43	5,75	18,2	4,45

<sup>1</sup> 1-Slovenija, 2-EU, 3-države izven EU, 4-mešanica (EU in države izven EU)

<sup>2</sup> +: zna ilne senzori ne lastnosti; o: manj zna ilne senzori ne lastnosti; -: nezna ilne senzori ne lastnosti

PRILOGA F: Pearsonov korelacijski koeficient za zveze med analiziranimi in izra unanimi parametri ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu

	SR	fruktoza	glukoza	saharozna	palatinoza	maltoza	gent+melib	melcitoza	erloza	rafinoza	maltotrioza	panoza	izo-malto3
SR													
fruktoza													
glukoza													
saharozna													
palatinoza													
maltoza													
gent+melib													
melcitoza													
erloza													
rafinoza													
maltotrioza													
panoza													
izo-Malto3													
Mono													
Di													
Tri													
F/G													
Mono/Di													
Mono/Tri													
Di/Tri													
Sab/Malt													
Sab/Tur													
Malto3/Tri													
Malto3/Tur													
Palat/Di													
Malt/Di													
Di/OH													
Tri/OH													
Gent/Malt													
Palat/Malt													

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Zelo mo ne zveze ( $r > 0,9$ ) so obarvane zeleno, mo ne zveze ( $r = 0,7-0,89$ ) so obarvane rumeno.

... nadaljevanje

Priloga F: Pearsonov korelacijski koeficient za zveze med analiziranimi in izra unanimi parametri ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu

	Mono	Di	Tri	F/G	Mono/ Di	Mono/ Tri	Di/Tri	Sah/ Malt	Sah/ Tur	Malto3/ Tri	Malto3/ Tur	Palat/Di	Malt/Di	Di/OH	Tri/OH	Gent/ Malt	Palat/ Malt
SR	-,581**	,175	,761**	-,514**	-,259	-,605**	-,565**	,016	,143	-,555**	,547**	-,216	-,095	,115	,760**	,781**	,213
fruktoza	,596**	-,010	-,698**	,847**	,089	,730**	,692**	-,044	-,140	,429**	-,393**	-,349**	,322	,031	-,703**	-,585**	-,393**
glukoza	,490**	-,642**	-,100	-,824**	,687**	-,046	-,277**	-,181	-,225	-,335**	-,169	,274	-,198	-,664**	-,108	-,030	,336
saharaza	-,303	,374**	,061	,111	-,348**	,066	,231	,957**	,971**	-,283**	,026	-,506**	-,431**	,360	,056	,022	-,214
palatinoza	-,476**	,505**	,354**	-,092	-,554**	-,650**	-,394**	-,382**	-,191	,054	,308**	,745**	,181	,478	,390	,233	,450**
maltoza	-,240	,828**	-,261	,385**	-,763**	,100	,453**	-,297**	-,036	,062	-,202	-,152	,842**	,836**	-,245	-,233	-,533**
gent-melib	-,702**	,277**	,774**	-,264	-,394**	-,600**	-,463**	-,015	,129	-,255	,708**	,218	-,049	,246	,773**	,896**	,163
melcitoza	-,679**	,029	,890**	-,214	-,173	-,794**	-,769**	-,035	-,066	,129	,713**	,416	-,376	-,011	,892**	,660	,451**
erfoza	-,631**	,023	,846**	-,441**	-,169	-,666**	-,657**	,232	,305**	-,329**	,715**	,258	-,472	-,011	,840**	,834**	,390**
rafinoza	-,709**	-,005	,912**	-,526**	-,122	-,703**	-,721**	,166	,236	-,310	,673**	,228	-,419	-,039	,911**	,807**	,327**
maltorioza	-,514**	,005	,781**	-,035	-,140	-,739**	-,727**	-,016	-,075	,471**	,889**	,366**	-,371**	-,026	,768**	,627**	-,389**
panoza	-,535**	,290	,535**	-,251	-,347**	-,372**	-,209	,037	,188	-,377**	,461**	-,008	,113	,265	,529**	,696**	-,073
Izo-Maltod	,462	-,410	-,362	-,115	,422	,413	,385	,093	-,080	-,759**	-,551	-,335	,112	-,399	-,413	,160	-,172
Mono	-,575**	-,575**	-,755**	,084	,689**	,656**	,417**	-,201	-,332**	,115	-,524**	-,092	,133	-,555**	-,766**	-,585**	-,079
Di	-,575**		,030	,349**	-,967**	-,148	,286	,158	,393**	-,007	-,014	-,163	,409**	,992**	,047	-,043	-,362**
Tri	,755**	,030		-,370**	-,189	-,835**	-,819**	,096	,121	-,074	,836**	,361**	-,454**	-,011	,996**	,858**	,442**
F/G	,084	,349**	-,370**		-,321**	,477**	,579**	,085	,038	,484**	-,146	-,395**	,297**	,389**	-,371**	-,354**	-,449**
MonoDi	,689**	-,967**	-,189	-,321**		,268**	-,160	-,154	-,373**	,017	-,149	,095	-,335**	-,957**	-,207	-,109	,291**
MonoTri	,656**	-,148	-,835**	,477**	,268**		,883**	,163	,172	-,036	-,721**	-,646**	,332**	-,094	-,837**	-,645**	-,602**
DiTri	,417**	,286	-,819**	,579**	-,160	,883**		,163	,076	-,016	-,698**	-,648**	,483**	,328**	-,814**	-,620**	-,689**
SahMalt	-,201	,158	,096	,085	-,154	,076	,163		,911**	-,267**	,078	-,466**	-,598**	,140	,085	,090	-,096
SahTur	-,332**	,393**	,121	,038	-,373**	,002	,172	,911**		-,391**	,093	-,436**	-,384**	,371**	,118	,097	-,189
MaltodTri	,115	-,007	-,074	,484**	,017	,036	-,016	-,267**	-,391**	,221	,221	-,012	,126	,026	-,084	-,187	-,120
MaltodTur	-,524**	,014	,836**	-,146	-,149	,731**	-,698**	,078	,093	,221		,305**	-,353**	-,022	,818**	,828**	,343**
PalatDi	-,092	-,163	,361**	-,395**	,095	-,646**	-,648**	-,466**	-,436**	-,012	,305**	-,169	-,169	-,196	,389**	,278**	,858**
MaltDi	,133	,409**	-,454**	,297**	-,335**	,332**	,483**	-,598**	-,384**	,126	-,353**	-,169	-,169	,436**	-,444**	-,367**	-,607**
Di/OH	-,555**	,992**	-,011	,389**	-,957**	-,094	,328**	,140	,371**	,026	-,022	-,196	,436**		,007	-,082	-,402**
Tri/OH	-,766**	,047	,996**	-,371**	-,207	-,837**	-,814**	,085	,118	-,084	,818**	,389**	-,444**	,007		,846**	,458**
GentMalt	-,585**	-,043	,858**	-,354**	-,109	-,645**	-,620**	,090	,097	-,187	,828**	,278**	-,367**	-,082	,846**		,376**
PalatMalt	-,079	-,362	,442**	-,449**	,291**	-,602**	-,689**	-,096	-,189	-,120	,343**	-,607**	-,607**	-,402**	,458**		,376**

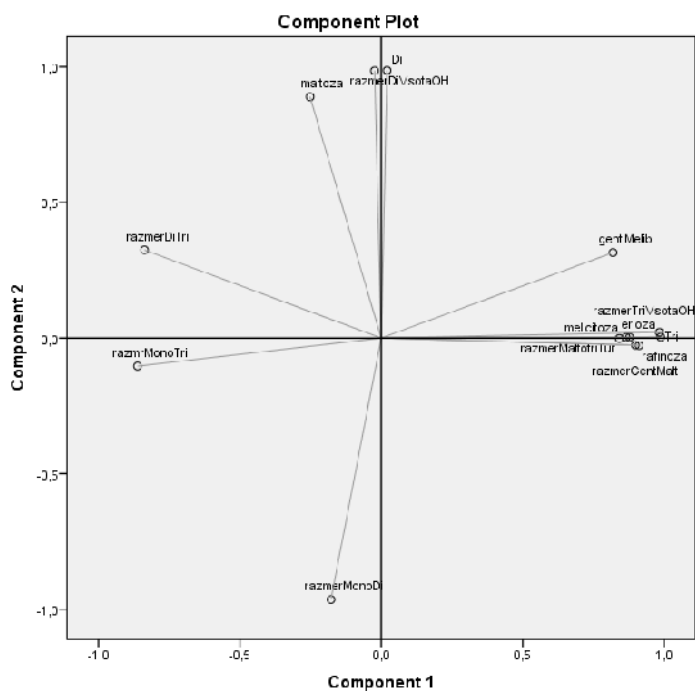
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Zelo mo ne zveze ( $r > 0,9$ ) so obarvane zeleno, mo ne zveze ( $r = 0,7-0,89$ ) so obarvane rumeno.

PRILOGA G: Elementi multivariatne analize parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v vzorcih pristnega medu

- Analiza glavnih osi (PCA)

**KMO and Bartlett's Test**

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		,734
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	1725,612
	df	91
	Sig.	,000



**Total Variance Explained**

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	8,021	57,294	57,294	8,021	57,294	57,294
2	3,883	27,739	85,033	3,883	27,739	85,033
3	,869	6,211	91,244			
4	,419	2,990	94,233			
5	,317	2,262	96,495			
6	,267	1,911	98,406			
7	,109	,778	99,184			
8	,057	,404	99,588			
9	,024	,168	99,756			
10	,014	,101	99,857			
11	,009	,067	99,924			
12	,006	,041	99,965			
13	,004	,030	99,994			
14	,001	,006	100,000			

Extraction Method: Principal Component Analysis.

- Linearna diskriminantna analiza (LDA)

**Eigenvalues**

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	349,049 <sup>a</sup>	72,5	72,5	,999
2	49,105 <sup>a</sup>	10,2	82,7	,990
3	38,899 <sup>a</sup>	8,1	90,8	,987
4	23,400 <sup>a</sup>	4,9	95,7	,979
5	11,208 <sup>a</sup>	2,3	98,0	,958
6	5,999 <sup>a</sup>	1,2	99,2	,926
7	2,152 <sup>a</sup>	,4	99,7	,826
8	1,124 <sup>a</sup>	,2	99,9	,728
9	,308 <sup>a</sup>	,1	100,0	,485
10	,029 <sup>a</sup>	,0	100,0	,168

a. First 10 canonical discriminant functions were used in the analysis.

**Classification Results<sup>a</sup>**

vrsta	Count	Predicted Group Membership											Total		
		1	2	3	4	5	6	7	13	14	17	18			
Original	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	4	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	6	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4
	7	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	13	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
	17	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	13	0	0	17
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2

a. 92,7% of original grouped cases correctly classified.

PRILOGA H: Elementi multivariatne analize parametrov povezanih z vsebnostjo ogljikovih hidratov v vzorcih namerno potvorjenega medu

- Linearna diskriminantna analiza (LDA), glede na delež sirupa

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	6,862 <sup>a</sup>	82,5	82,5	,934
2	,927 <sup>a</sup>	11,1	93,7	,694
3	,269 <sup>a</sup>	3,2	96,9	,460
4	,116 <sup>a</sup>	1,4	98,3	,322
5	,072 <sup>a</sup>	,9	99,1	,258
6	,042 <sup>a</sup>	,5	99,6	,200
7	,026 <sup>a</sup>	,3	100,0	,159
8	,004 <sup>a</sup>	,0	100,0	,062

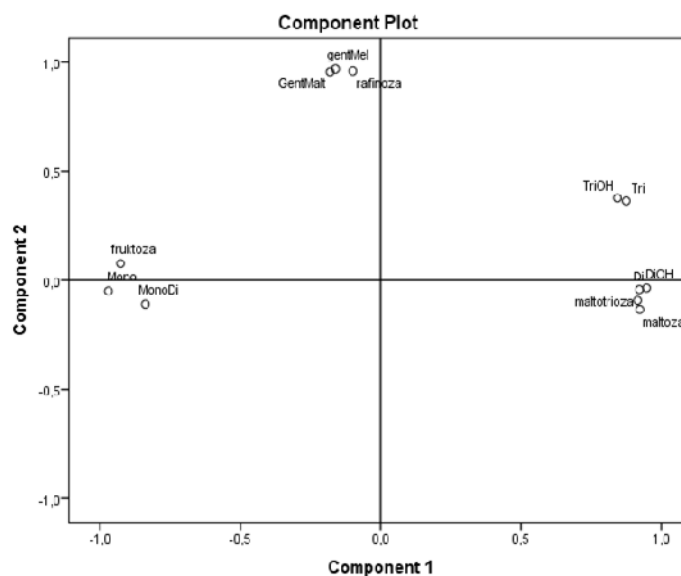
a. First 8 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Classification Results<sup>a</sup>

KolSir	Predicted Group Membership										Total
	0	1	2	4	8	12	16	20	100		
Original Count	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	10
	6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	5
	0	2	0	1	1	0	0	1	0	0	10
	1	0	4	2	2	0	0	0	1	0	9
	0	1	2	2	1	1	1	1	1	0	8
	0	1	0	1	3	0	1	2	0	0	5
	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	5
	0	1	0	1	0	0	3	0	0	0	5
	0	0	0	0	2	0	1	6	0	0	9
	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10

<sup>a</sup>. 50,7% of original grouped cases correctly classified.

- Analiza glavnih osi (PCA), pristen - potvorjen



### Total Variance Explained

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	7,489	62,409	62,409	7,489	62,409	62,409
2	3,100	25,831	88,240	3,100	25,831	88,240
3	,608	5,067	93,307			
4	,367	3,062	96,369			
5	,159	1,329	97,698			
6	,104	,868	98,566			
7	,096	,796	99,362			
8	,046	,380	99,742			
9	,022	,184	99,927			
10	,006	,046	99,973			
11	,002	,017	99,991			
12	,001	,009	100,000			

Extraction Method: Principal Component Analysis.

- Linearna diskriminantna analiza (LDA), pristen - potvorjen

#### Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	1,055 <sup>a</sup>	100,0	100,0	,717

a. First 1 canonical discriminant functions were used in the analysis.

#### Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1	,487	45,378	12	,000

#### Classification Results<sup>a</sup>

skupina	Original Count	Predicted Group Membership		Total
		1	2	
Original	1	<b>10</b>	0	10
	2	4	<b>57</b>	61

a. 94,4% of original grouped cases correctly classified.

PRILOGA I: Specifična optična rotacija vzorcev medu slovenskih čebelarjev in Pearsonovi koeficienti korelacije za zveze med SR in nekaterimi saharidi.

Vrsta medu	vrednost	SR ( $[ ]_{D}^{20}$ )
akacijev (n = 29)	$\bar{x} \pm SD$	-22,1 ± 4,0
	$x_{min}-x_{max}$	-27,6– -3,4
	KV (%)	-18,3
cvetlični (n = 41)	$\bar{x} \pm SD$	-15,9 ± 4,6
	$x_{min}-x_{max}$	-22,1–0,5
	KV (%)	-28,9
lipov (n = 23)	$\bar{x} \pm SD$	-15,5 ± 3,8
	$x_{min}-x_{max}$	-25,3– -10,3
	KV (%)	-24,7
kostanjev (n = 31)	$\bar{x} \pm SD$	-21,7 ± 5,2
	$x_{min}-x_{max}$	-29,8– -4,9
	KV (%)	-23,8
gozdni (n = 39)	$\bar{x} \pm SD$	-5,9 ± 8,1
	$x_{min}-x_{max}$	-18,5–12,2
	KV (%)	137
hojev (n = 9)	$\bar{x} \pm SD$	6,3 ± 3,0
	$x_{min}-x_{max}$	2,1–10,3
	KV (%)	47,7
smrekov (n = 7)	$\bar{x} \pm SD$	-5,3 ± 20,9
	$x_{min}-x_{max}$	-36,5–6,6
	KV (%)	-392
m. divje ešnje (n = 2)	$\bar{x} \pm SD$	–
	$x_{min}-x_{max}$	–
	KV (%)	–
m. oljne ogršice (n = 28)	$\bar{x} \pm SD$	-18,6 ± 4,4
	$x_{min}-x_{max}$	-25,1– -11,0
	KV (%)	-23,3
škržatov (n = 1)	$\bar{x} \pm SD$	-1,93
	$x_{min}-x_{max}$	–
	KV (%)	–

Zveze med SR in saharidi v medu

	fruktoza	glukoza	saharoza	palatin oza	maltoza	gent+me lib	melicito za	erloza	rafinoza	maltotri oza	panoza
SR	-,704**	,088	,024	,292	,091	,821**	,593**	,684**	,793**	,346*	,850**

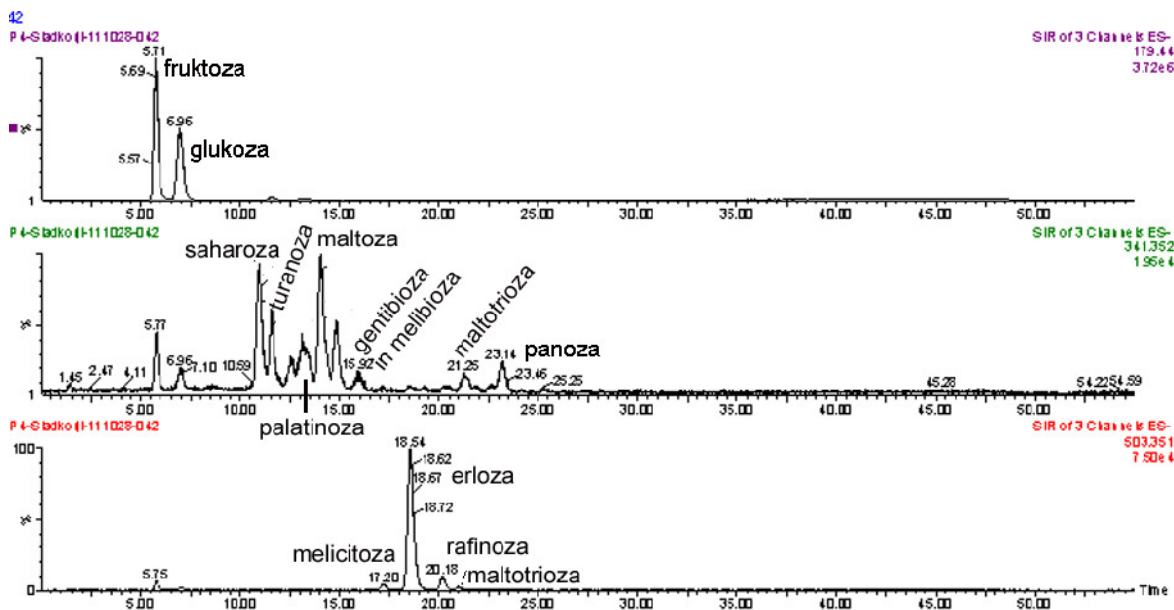
\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

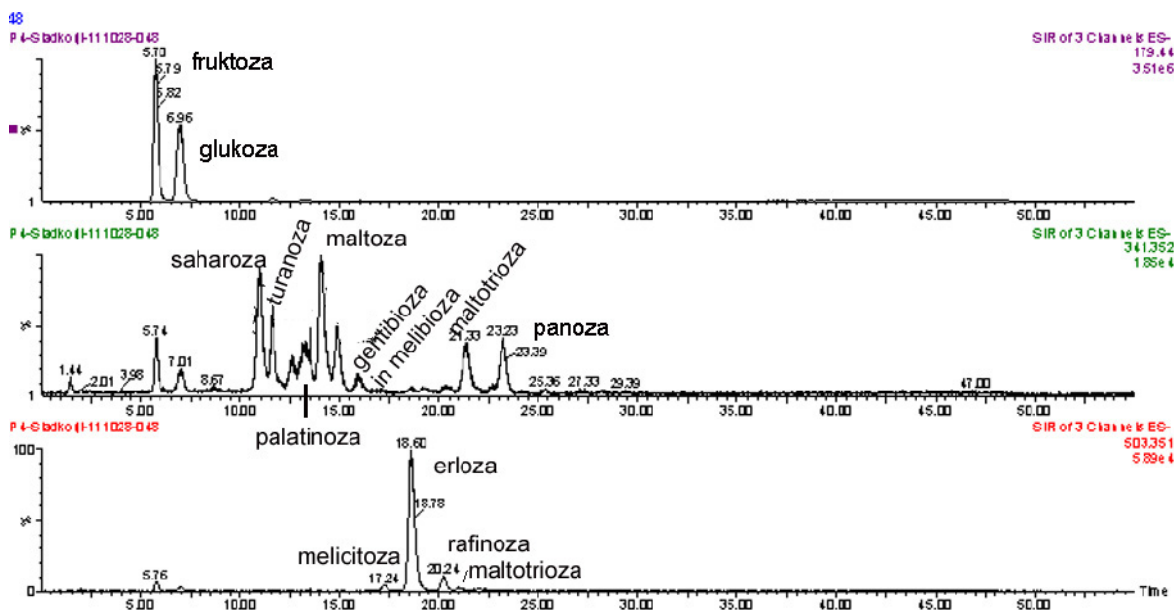


PRILOGA J: Primeri kromatogramov analize ogljikovih hidratov z metodo LC-MS v vzorcih pristnega in potvorjenega medu

- akacijev med: vzorec A26



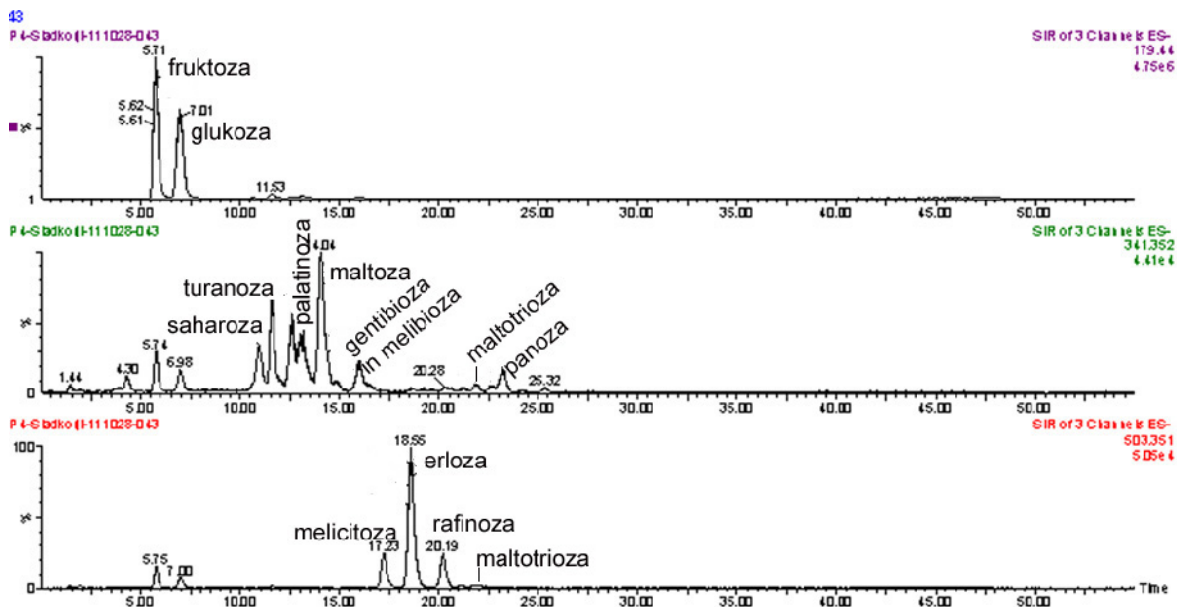
- akacijev med: vzorec A26f6 (vzorec s 16 % sirupa GF2)



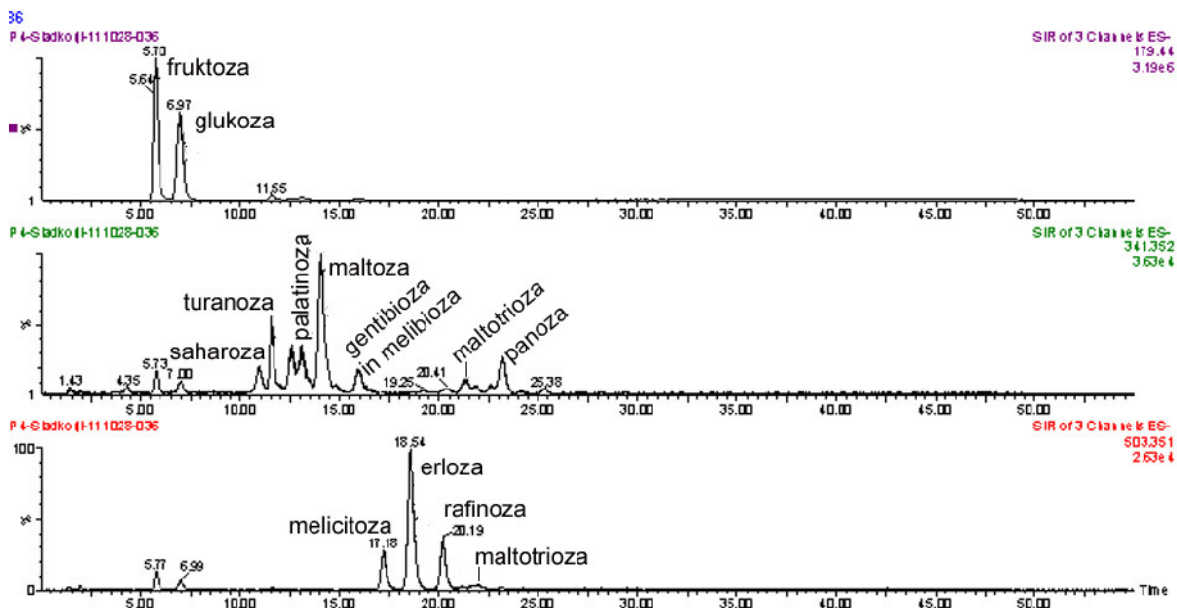
... nadaljevanje

### PRILOGA J: Primeri kromatogramov analize ogljikovih hidratov z metodo LC-MS v vzorcih pristnega in potvorjenega medu

- lipov med: vzorec L20



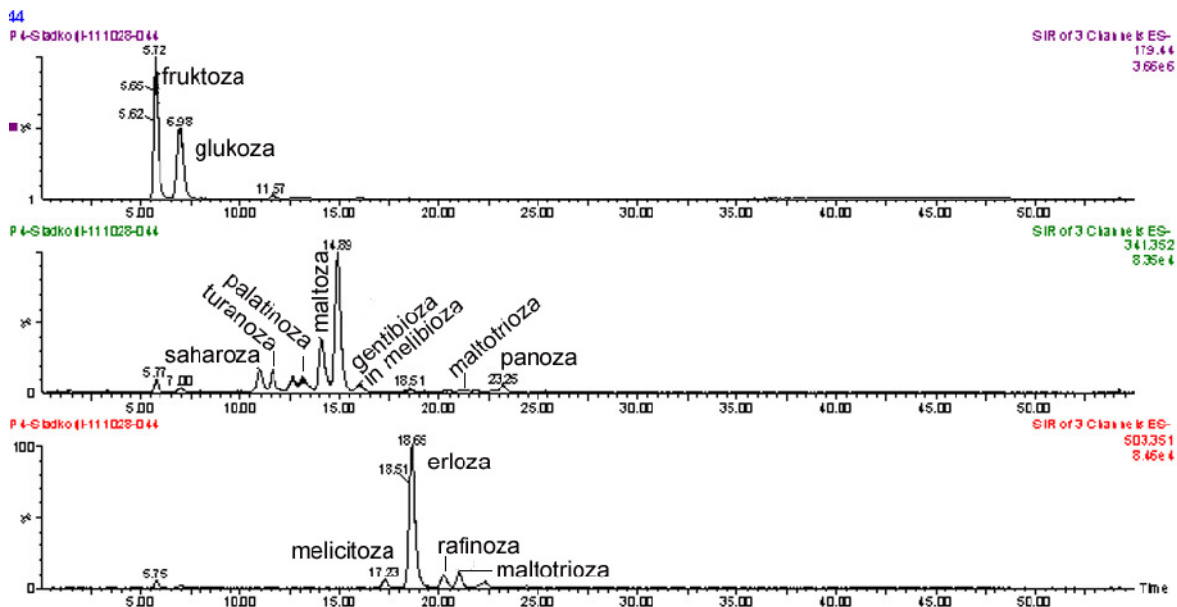
- lipov med: vzorec L20f5 (vzorec z 12 % sirupa GF2)



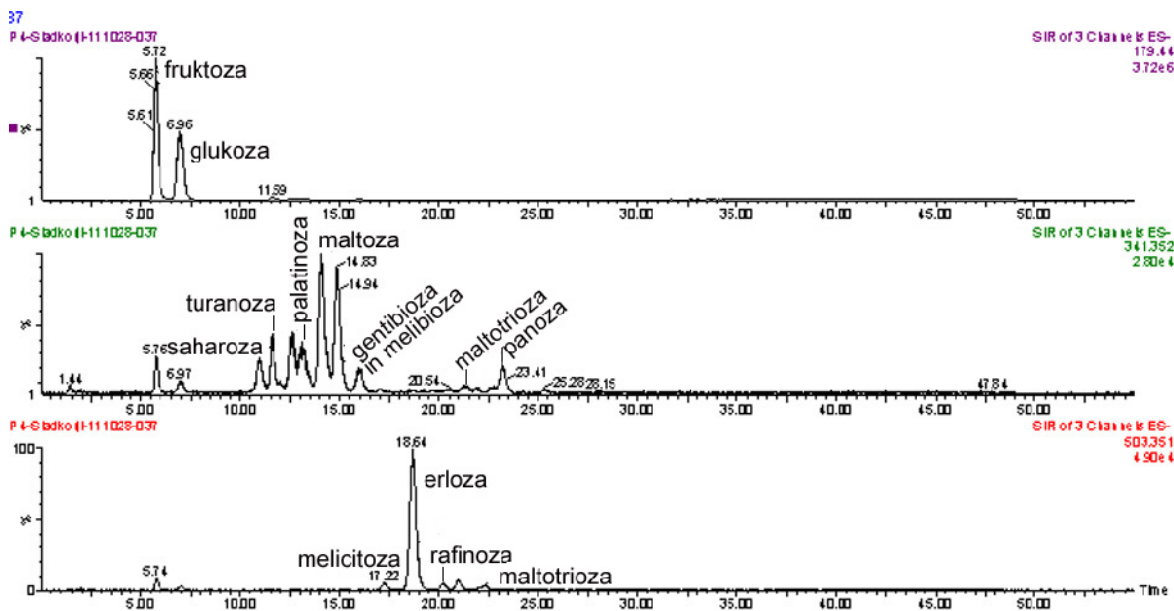
... nadaljevanje

### PRILOGA J: Primeri kromatogramov analize ogljikovih hidratov z metodo LC-MS v vzorcih pristnega in potvorjenega medu

- kostanjev med: vzorec K29



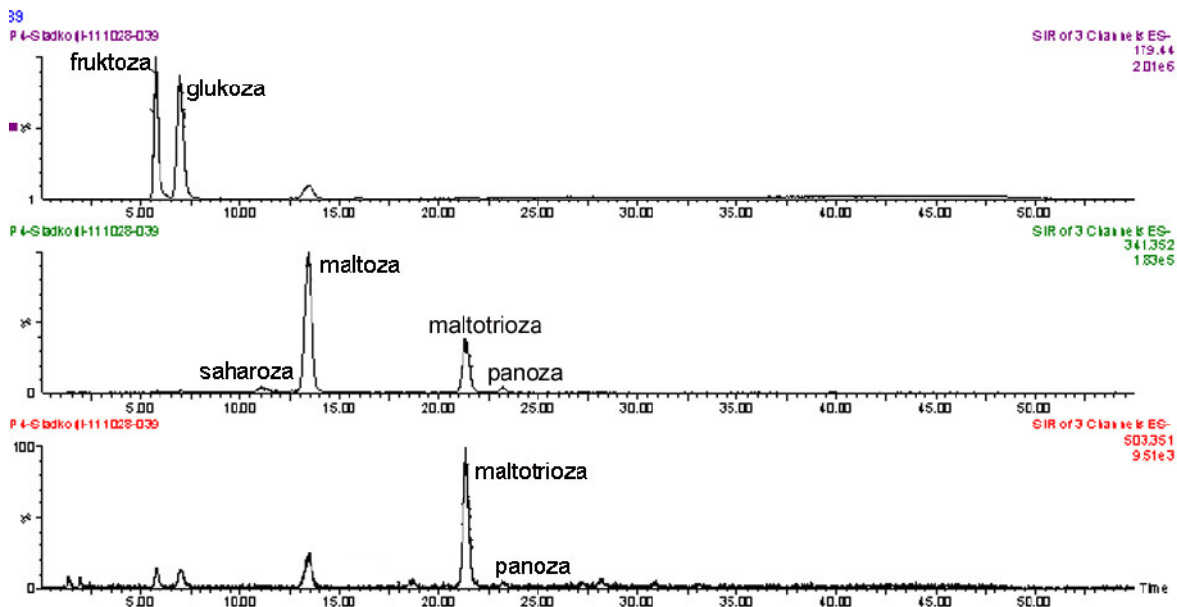
- lipov med: vzorec K29f4 (vzorec z 8 % sirupa GF2)



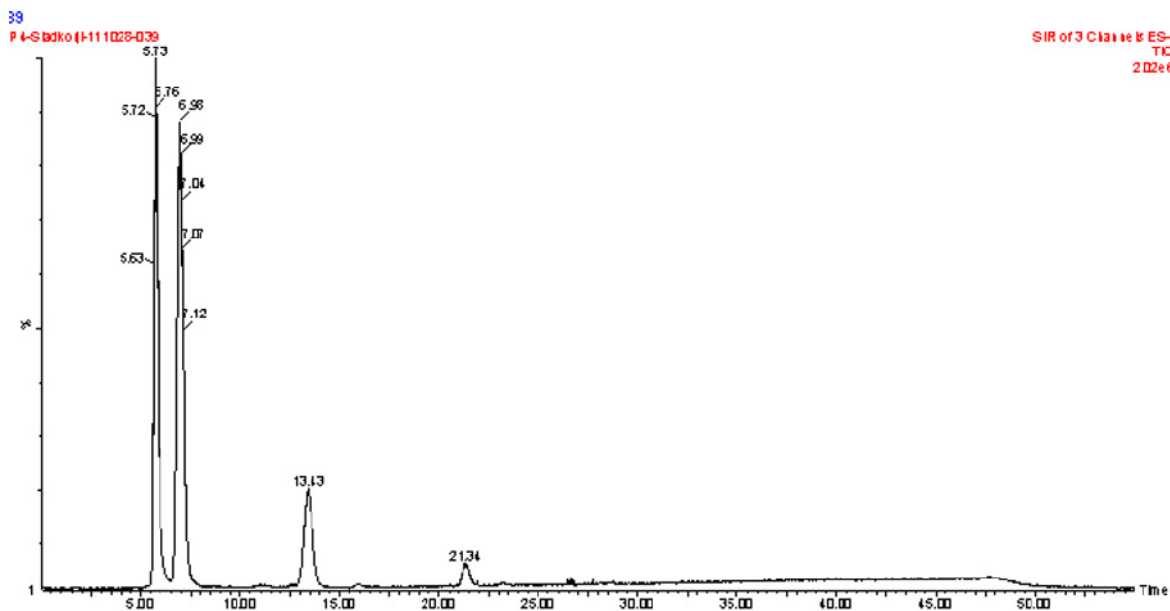
... nadaljevanje

### PRILOGA J: Primeri kromatogramov analize ogljikovih hidratov z metodo LC-MS v vzorcih pristnega in potvorjenega medu

- fruktozno-glukozni sirup GF2



- enotni prikaz kromatograma ogljikovih hidratov v sirupu GF2



PRILOGA K: Razmerja stabilnih izotopov ogljika v medu ter ogljika in dušika v proteinih, izoliranih iz medu ter izra unani delež potvorbe

PRILOGA K1: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo enih v slovenskih vzorcih akacijevega in cvetli nega medu

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
A03	2008	-24,4	-24,8	4,97	0,4	2,4
A04	2009	-22,8	-23,1	1,69	0,3	2,0
A05	2009	-22,7	-23,1	1,03	0,4	2,7
A06	2009	-22,9	-22,7	0,76		
A07	2009	-22,9	-23,3	0,76	0,4	3,0
A08	2009	-25,0		3,39		
A09	2009	-22,5	-23,1	0,06	0,6	4,3
A10	2009	-25,1	-25,3	3,34	0,2	1,3
A11	2009	-22,4		2,22		
A12	2009	-23,3	-23,6	2,19	0,3	1,9
A13	2009	-22,4		1,84		
A14	2009	-25,2	-24,4	3,55		
A15	2009	-23,2	-23,5		0,3	2,5
A16	2009	-22,8	-23,6		0,9	6,1
A17	2009	-24,3	-24,7	4,27	0,4	2,7
A18	2009	-22,8	-23,4	2,24	0,6	4,7
A19	2009	-23,8	-24,2	4,19	0,4	3,0
A20	2009	-22,7	-23,1	0,81	0,5	3,4
A21	2009	-24,6	-24,9	3,00	0,3	1,9
A22	2009	-23,1		4,86		
A23	2010	-24,2	-23,9	1,31		
A24	2010	-24,6	-24,4	0,04		
A25	2010	-24,4	-24,4	2,77	0,0	0,0
A26	2010	-23,6	-24,0	2,11		
A27	2010	-23,8	-24,9	-0,85	<b>1,1</b>	<b>7,1</b>
A28	2010	-23,8	-24,7	0,28	0,9	5,8
A29	2010	-23,2	-24,1	1,83	0,9	6,4
C02	2008	-25,5	-25,5	1,55	0,1	0,4
C03	2008	-26,9	-26,7	4,21		
C04	2008	-25,8	-25,8	1,73	0,0	0,2
C05	2008	-26,1	-26,2	1,66	0,1	0,8
C06	2008	-25,6	-25,6	-0,49	0,0	0,1
C07	2008	-26,5	-26,6	2,19	0,1	0,3
C08	2008	-23,9	-25,8	3,90	<b>1,9</b>	<b>11,5</b>
C09	2008	-26,0	-25,9	1,81		
C10	2008	-26,3	-26,4	4,31	0,2	0,9
C11	2008	-26,1		3,86		
C12	2008	-26,9	-26,3	3,61		
C13	2008	-26,8		4,39		
C14	2008	-25,3		0,28		
C15	2008	-26,7		5,56		
C16	2008	-24,7		1,82		
C17	2009	-24,8	-24,9	1,59	0,1	0,8

... nadaljevanje

PRILOGA K1: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo enih v slovenskih vzorcih cvetli nega in lipovega medu

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
C18	2009	-25,1	-24,9	1,83		
C19	2009	-25,0	-26,0	0,87	1,0	6,1
C20	2009	-25,9		1,87		
C21	2009	-25,2	-25,2	1,86		
C22	2009	-26,6	-26,4	4,72		
C23	2009	-26,2	-25,0	1,60		
C24	2009	-26,9		4,56		
C25	2009	-26,5		5,57		
C26	2009	-27,2	-26,8	2,99		
C27	2009	-26,5	-25,9	0,85		
C28	2009	-26,0	-25,6	2,79		
C29	2009	-24,8		3,52		
C30	2009	-25,2	-25,6	-0,40	0,4	2,3
C31	2009	-30,5		2,05		
C32	2009	-25,9	-25,1	1,41		
C33	2009	-24,4	-23,8	-1,24		
C34	2009	-25,8	-25,8	1,29	0,1	0,5
C35	2010	-25,4	-25,3	1,49		
C36	2010	-23,3	-23,4	4,44	0,1	0,8
C37	2010	-24,1	-25,5	-0,08	1,4	8,6
C38	2010	-26,2	-26,3	0,04	0,1	0,5
C40	2010	-26,0	-24,3	-1,03		
C41	2010	-24,7	-24,7	0,70	0,0	0,3
L01	2008	-25,3	-25,1	0,05		
L03	2008	-25,9	-25,9	1,46		
L04	2008	-24,8	-25,3	1,62	0,5	3,0
L05	2008	-25,8	-26,0	1,75	0,2	1,2
L06	2008	-26,8	-26,7	2,91		
L07	2009	-25,4	-25,7	0,13	0,3	1,6
L08	2009	-25,4	-25,1	0,91		
L09	2009	-25,2		2,26		
L10	2009	-25,8	-24,9	-1,06		
L11	2009	-26,0	-25,7	2,50		
L12	2009	-26,2	-25,8	1,76		
L13	2009	-25,1		4,44		
L14	2009	-25,6	-24,8	1,61		
L15	2009	-25,6	-25,1	0,41		
L16	2009	-25,4	-25,6	4,44	0,2	1,1
L17	2009	-26,3	-26,9	0,53	0,6	3,3
L18	2009	-25,8	-26,0	2,80	0,2	1,1
L19	2009	-25,5		0,84		
L20	2010	-25,0	-24,8	-0,92		
L23	2010	-25,0	-24,8	-0,92		

... nadaljevanje

PRILOGA K1: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo enih v slovenskih vzorcih medu divje ešnje in kostonja ter gozdnega medu

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
DC01	2009	-22,4	-22,9		0,6	4,4
DC02	2010	-22,5	-22,9		0,4	2,8
K01	2008	-25,6	-25,7	2,13	0,0	0,1
K02	2008	-26,5	-26,2	1,04		
K03	2008	-26,0	-25,8	1,52		
K04	2008	-25,9	-25,0	0,98		
K05	2008	-25,9	-25,8	-0,37		
K06	2008	-26,1	-25,9	2,57		
K07	2008	-25,8	-25,6	0,83		
K09	2008	-26,1	-25,9	0,63		
K10	2008	-25,9	-25,5	0,24		
K11	2008	-25,9	-25,6	3,17		
K12	2009	-25,9	-25,2	-0,30		
K13	2009	-25,9	-25,7	1,03		
K14	2009	-25,8		1,56		
K15	2009	-25,7	-25,4	0,86		
K16	2009	-25,8	-24,9	0,77		
K17	2009	-25,7	-25,1	2,08		
K18	2009	-26,0	-25,8	1,00		
K19	2009	-25,5		2,78		
K20	2009	-26,0	-25,8	2,40		
K21	2009	-25,5		3,26		
K22	2009	-25,8	-24,9	-0,16		
K23	2009	-25,7	-25,5	1,11		
K24	2009	-26,2	-25,2	1,15		
K25	2009	-25,5	-25,4	2,44		
K26	2009	-25,7		1,21		
K27	2010	-25,1	-25,2	1,73	0,2	1,1
K28	2010	-24,2	-24,3	-0,07	0,1	0,5
K29	2010	-25,2	-25,5	2,79	0,3	1,6
K30	2010	-25,0	-25,2	0,88	0,2	1,2
G01	2008	-25,6	-25,7	0,95	0,1	0,6
G02	2008	-25,1	-25,6	1,56	0,5	3,2
G03	2008	-25,7				
G04	2008	-26,1				
G05	2008	-24,7	-25,0	1,50	0,4	2,4
G06	2008	-26,0	-26,8	-1,11	0,8	4,6
G07	2008	-24,6	-24,8	-0,28	0,1	0,8
G08	2008	-26,2				
G09	2008	-25,8	-25,6	-0,21		
G10	2008	-25,6	-25,5	-0,22		
G11	2008	-25,1				
G12	2008	-25,6				

... nadaljevanje

PRILOGA K1: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo enih v slovenskih vzorcih gozdnega, hojevega in smrekovega medu

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
G13	2008	-25,4	-24,9	-2,09		
G14	2008	-25,5	-25,6	-1,08	0,0	0,3
G15	2008	-26,0				
G16	2008	-24,9	-24,8	-1,74		
G17	2008	-25,4	-25,4	-0,51		
G18	2008	-25,3	-25,3	0,53		
G19	2008	-25,8	-25,8	0,50	0,0	0,1
G20	2008	-25,5	-25,5	-0,46	0,0	0,2
G21	2008	-25,8		1,76		
G22	2008	-25,3		2,96		
G23	2008	-24,4	-24,6	1,96	0,1	0,9
G24	2008	-25,7	-25,7	2,56	0,0	0,1
G25	2008	-25,1	-25,4	1,03	0,3	1,8
G26	2008	-24,3		-0,16		
G27	2008	-24,4		0,15		
G28	2009	-26,2	-25,4	-1,80		
G29	2009	-25,4	-25,1	0,00		
G30	2009	-26,0	-25,8	1,75		
G31	2009	-26,5		3,64		
G32	2009	-25,3	-25,6	-1,18	0,3	2,2
G33	2009	-26,1	-25,3	2,51		
G34	2009	-26,1		1,23		
G35	2009	-24,9	-25,2	1,32	0,3	1,9
G36	2009	-25,8	-25,8	0,65	0,1	0,5
G37	2009			3,28		
G39	2010	-25,3	-25,6		0,3	1,8
H02	2008	-25,5		1,50		
H03	2008	-24,3		3,01		
H04	2008	-24,2		1,99		
H05	2008	-23,5		3,84		
H06	2010	-24,9	-25,4	2,16	0,4	2,6
H07	2010	-25,3	-25,7	2,41	0,5	3,1
H08	2010	-25,0	-24,9	-1,23		
H09	2010	-24,7	-25,6	2,35	0,9	5,9
S01	2008	-25,9				
S02	2008	-25,3				
S03	2008	-25,7	-25,8	1,86		
S05	2010	-25,1	-26,4	-1,35	1,3	7,7
S06	2010	-25,2	-26,0	-0,84	0,8	4,9
S07	2010	-25,1	-25,5	-0,61	0,4	2,3



... nadaljevanje

PRILOGA K1: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo enih v slovenskih vzorcih medu oljne ogrš ıce, rešeljıke in ajde

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
O01	2008	-27,1				
O02	2008	-27,1				
O03	2008	-26,7				
O04	2008	-26,6				
O05	2008	-25,2				
O18	2009	-27,5				
O28	2009	-26,7				
R01	2008	-24,9	-25,7		0,8	
R02	2008	-24,3	-24,8		0,5	
R03	2008	-24,4	-23,2			
R04	2008	-24,8	-24,9		0,1	
R05	2008	-23,9	-24,0		0,1	
R06	2008	-24,1	-21,3			
R07	2008	-24,9	-21,7			
R08	2009	-23,7	-24,5		0,8	
R09	2009	-24,9	-24,9		0,0	
R10	2009	-24,0	-24,1		0,1	
R11	2009	-23,9	-22,5			
R12	2009	-23,7	-24,1		0,5	
R13	2009	-23,8	-23,7	-0,51		
R14	2010	-20,4	-24,0	0,85	<b>3,7</b>	<b>25,5</b>
R15	2010	-23,0	-23,4	1,29	0,4	2,7
R16	2010	-18,3	-23,2	2,72	<b>4,9</b>	<b>36,0</b>
B01	2008	-26,6	-26,4	6,68		
B02	2008	-25,6	-25,2	5,54		

PRILOGA K2: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ , dolo ene v namerno potvorjenih vzorcih akacijevega, cvetli nega in lipovega medu

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
A26f1	2010	-23,6	-25,0	1,09	1,4	9,3
A26f2	2010	-24,7	-25,0	1,88	0,3	1,8
A26f3	2010	-23,9	-24,5	2,11	0,5	3,7
A26f4	2010	-23,3	-24,5	2,42	1,2	8,3
A26f5	2010	-22,6	-25,1	2,41	2,5	16,1
A26f6	2010	-22,8	-24,4	1,10	1,6	10,6
A26f7	2010	-21,8	-24,4	2,11	2,5	17,3
C02f10	2008	-24,6	-24,8		0,2	1,6
C02g10	2008	-24,3	-24,8		0,5	3,4
C02f01	2008	-25,6	-24,8			
C02g01	2008	-25,6	-24,9			
C02f20	2008	-23,2	-24,7		1,5	9,8
C02g20	2008	-22,8	-24,7		1,9	12,9
C02f05	2008	-25,1	-24,7			
C02g05	2008	-25,1	-24,9			
C33f1	2009	-24,8				
C33f2	2009	-24,5				
C33g2	2009	-24,4				
C33i2	2009	-24,5				
C33f3	2009	-24,7				
C33g3	2009	-24,0				
C33i3	2009	-24,7				
C33f4	2009	-24,6				
C33g4	2009	-23,6				
C33i4	2009	-24,8				
C33f5	2009	-24,8				
C33g5	2009	-22,9				
C33i5	2009	-24,4				
C33f6	2009	-24,9				
C33g6	2009	-22,9				
C33i6	2009	-24,8				
C33g1	2009	-24,4				
C33i1	2009	-24,2				
C33f7	2009	-24,9				
C33g7	2009	-22,0				
C33i7	2009	-24,8				
L20f1	2010	-25,6	-24,8	-0,85		
L23f2	2010	-24,8	-24,9	2,56	0,1	0,9
L23f3	2010	-23,6	-24,7	-0,59	1,1	7,2
L20f4	2010	-23,5	-24,9	1,90	1,4	9,0
L20f5	2010	-23,4	-24,6	-1,26	1,2	8,3
L20f6	2010	-22,3	-24,7	-1,17	2,4	16,1
L20f7	2010	-21,9	-24,3	-0,28	2,4	16,6

...nadaljevanje

PRILOGA K2: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$ ,  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$  in  $^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ ; dolo ene v namerno potvrjenih vzorcih kostanjevega in gozdnega medu in v sirupih

Oznaka vzorca	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{15}\text{N}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
K01g10	2008	-24,4	-25,2		0,8	5,2
K01g20	2008	-23,0	-25,1		<b>2,1</b>	<b>13,6</b>
K01g05	2008	-25,3	-24,9			
K02f10	2008	-25,2	-25,7		0,5	3,2
K02f02	2008	-26,4	-25,7			
K02f20	2008	-23,9	-25,7		<b>1,9</b>	<b>11,6</b>
K02f05	2008	-25,9	-25,6			
K29f1	2010	-25,3	-25,3	-0,15	0,0	0,0
K29f2	2010	-25,0	-25,5	2,86	0,5	3,0
K29f3	2010	-24,5	-25,2	-0,03	0,7	4,3
K29f4	2010	-24,5	-25,0	0,01	0,5	3,5
K29f5	2010	-22,3	-24,7	0,55	<b>2,5</b>	<b>16,3</b>
K29f6	2010	-22,5	-25,4	-0,17	<b>2,8</b>	<b>18,0</b>
K29f7	2010	-22,7	-25,1	2,00	<b>2,4</b>	<b>15,3</b>
G36f1	2009	-26,1				
G36f2	2009	-26,2				
G36f3	2009	-26,1				
G36f4	2009	-26,5				
G36f5	2009	-26,3				
G36f6	2009	-26,3				
G36f7	2009	-26,2				
G36g1	2009	-26,0				
G36g2	2009	-25,7				
G36g3	2009	-25,5				
G36g4	2009	-24,9				
G36g5	2009	-24,4				
G36g6	2009	-23,8				
G36g7	2009	-25,9				
G36i1	2009	-26,2				
G36i2	2009	-25,9				
G36i3	2009	-25,9				
G36i4	2009	-25,9				
G36i5	2009	-26,2				
G36i6	2009	-26,0				
G36i7	2009	-25,9				
Sladkorni sirupi						
F	2008	-11,6				
GF1	2009	-12,5				
GF2	2010	-10,9				
G	2008	-11,2				
GL	2009	-26,4				
IN	2009	-25,4				

PRILOGA K3: Vrednosti  $^{13}\text{C}_{\text{med}}$  in  $^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ , določene v trgovinskih vzorcih medu

Oznaka vzorca	Poreklo*	Letnik	$^{13}\text{C}_{\text{med}}$ (‰)	$^{13}\text{C}_{\text{proteini}}$ (‰)	$^{13}\text{C}$ (‰)	Potvorba (%)
tA01	2	2008	-25,3	-25,4	0,1	0,9
tA02	2	2008	-25,0	-25,4	0,3	2,0
tA03	3	2008	-25,4	-25,2		
tC03	4	2008	-26,3	-25,8		
tC04	4	2008	-26,3	-26,1		
tC05	3	2008	-25,7	-26,2	0,6	3,6
tC06	4	2008	-25,7	-25,8	0,1	0,9
tC07	2	2008	-26,2	-25,7		
tC08	4	2008	-25,0	-25,2	0,2	1,3
tC09	3	2008	-26,0	-26,1	0,1	0,7
tC10	2	2008	-25,6	-26,0	0,4	2,4
tC11	3	2008	-26,6	-26,1		
tC30	3	2008	-25,9	-25,8		
tL01	4	2008	-26,3	-26,0		
tL02	3	2008	-26,2	-26,3	0,1	0,8
tK01	2	2008	-25,2	-25,2	0,1	0,5
tG01	4	2008	-24,9	-25,5	0,6	3,6
tG02	4	2008	-25,4	-25,5	0,1	0,7
tG03	4	2008	-25,2	-25,3	0,1	0,9
tG04	4	2008	-26,1	-25,8		
tP01	4	2008	-25,4	-26,2	0,8	4,6
tRM01	2	2008	-25,7	-25,4		
tZ01	2	2008	-25,0	-25,3	0,3	2,0
tT01	2	2008	-25,8	-25,7		
tLA01	2	2008	-24,9	-25,3	0,3	2,1

\*Poreklo: 2 – države EU; 3 – države izven EU; 4 – med izvira iz držav EU in držav, ki niso članice EU

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mojca KOROŠEC

**DOLOŽITEV FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH  
PARAMETROV ZA UGOTAVLJANJE  
PRISTNOSTI MEDU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2012