



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Katarina ŽLAVS

**VPLIV PRIPRAVE VZORCA NA DOLOČANJE
ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI MEDU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Katarina ŽLAVS

**VPLIV PRIPRAVE VZORCA NA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE
UČINKOVITOSTI MEDU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

**THE EFFECT OF THE SAMPLE PREPARATION ON HONEY
ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje Živilstvo in prehrana. Delo je bilo opravljeno na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Mojco Korošec in za recenzentko prof. dr. Heleno Abramovič.

Mentorica: doc. dr. Mojca KOROŠEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: prof. dr. Helena ABRAMOVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzentka:

Datum zagovora:

Katarina Žlavs

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
DK UDK 638.162:577.1:543.42.05(043)=163.6
KG med, antioksidativna učinkovitost, fenoli, flavonoidi, priprava vzorca
AV ŽLAVS, Katarina
SA KOROŠEC, Mojca (mentorica), ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2018
IN VPLIV PRIPRAVE VZORCA NA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI MEDU
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
OP VI, 23 str. 3 pregl., 6 sl., 3 pril., 16 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Med je zaradi vsebnosti polifenolov ter drugih bioaktivnih spojin znan po svoji antioksidativni učinkovitosti in se v ljudski medicini uporablja zaradi ugodnih učinkov na zdravje. Antioksidativno učinkovitost medu *in vitro* določamo s spektrofotometričnimi metodami, vendar različna priprava vzorcev lahko vpliva tudi na razlike med rezultati. Namen diplomskega dela je ugotoviti vpliv priprave vzorca na določanje antioksidativne učinkovitosti medu. Cilj je bil določiti skupne fenolne spojine, flavonoide in antioksidativno učinkovitost v vzorcih medu različnega botaničnega izvora, različnih tudi v barvi, pripravljenih na tri različne načine. V analizo smo vključili akacijev, cvetlični in gozdni med, jim izmerili vsebnost vode (refraktometrično), električno prevodnost (konduktometrično) ter barvo s kromametrom. Za spektrofotometrične analize smo vzorce pripravili na tri načine; med smo raztopili v 1) vodi, 2) 70 % etanolu ali 3) nakisani vodi in zatem ekstrahirali na trdni fazi (SPE), fenolne spojine pa raztopili v mešanici metanol/acetanitril. Glede na rezultate analiz smo ugotovili pozitivno korelacijo med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitostjo, vrednosti teh parametrov pa so povezane z botaničnim izvorom medu, njegovo barvo in električno prevodnostjo. Analize vsebnosti fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim reagentom, flavonoidov z $AlCl_3$ ter antioksidativne učinkovitosti po metodi DPPH so pokazale, da priprava vzorca vpliva na analizirane vrednosti. Vodni in etanolni ekstrakti so pri vseh analizah pokazali višje vrednosti kot vzorci ekstrahirani po SPE. Takšni rezultati so posledica prisotnih sladkorjev in drugih reducirajočih spojin v medu, ki motijo analizo. Ugotovili smo, da najbolj zanesljive rezultate dajejo vzorci, pripravljene z ekstrakcijo na trdni fazi, še posebej pri določanju skupnih flavonoidov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 638.162:577.1:543.42.05(043)=163.6
CX honeys, antioxidant activity, phenolics, flavonoids, sample preparation
AU ŽLAVS, Katarina
AA KOROŠEC, Mojca (supervisor), ABRAMOVIČ, Helena (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2018
TI THE EFFECT OF THE SAMPLE PREPARATION ON HONEY ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition)
NO VI, 23 p., 3 tab., 6 fig., 3 ann., 16 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Due to its richness in phenolic compounds and other bioactive substances, honey is well-known for its antioxidant ability and since it has beneficial effect on health, it is used in folk medicine. Antioxidant activity is determined with *in vitro* assays, using spectrophotometric methods. However, the sample preparation can lead to different results of the analysis. Thus, in this bachelor thesis, we aim to research the effect of the sample preparation on honey antioxidant activity determination. Our aim was to determine total phenolic and total flavonoid content in the honey samples and their antioxidant activity. The samples that we analysed were of different botanical origin, and of different colours, prepared on three different ways. The analyses were carried on the samples of acacia, floral and forest types of honey. We measured their water content (refractometric assay), electric conductivity (conductometric assay) and colour (with chromameter). For the spectrophotometric assays we prepared the honey samples in three different ways: by dissolving honey in 1) water, 2) 70% ethanol or 3) acidified water, then extracted on solid phase (SPE) and eluted phenolic fractions in methanol/acetonitrile solution. The results revealed positive correlation between phenolics content and antioxidative ability. The values of these parameters are linked to the botanical origin of honey, its colour and its electric conductivity. The analyses of the total phenolic content, using Folin-Ciocalteu reagent, of the total flavonoids content using aluminium chloride reagent as well as the analysis of the antioxidant activity using the DPPH reagent, revealed the effect of the sample preparation on measured values. Water and ethanol extracts resulted in higher values than the samples, extracted on SPE. This is due to the presence of sugar and other reducing compounds in honey, which hamper analysis. Thus, we discovered that the samples, that were prepared by using the solid-phase extraction method produce the most reliable results, especially when the determination of the total flavonoid content is concerned.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
KAZALO PRILOG	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 FENOLNE SPOJINE	2
2.1.1 Flavonoidi	2
2.1.1.1 Flavonoidi v medu	4
2.1.2 Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin (flavonoidov).....	4
2.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST MEDU.....	5
2.3 BARVA MEDU	5
2.4 POVEZAVA MED VSEBNOSTJO FENOLNIH SPOJIN, BARVO MEDU IN ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOSTJO	6
3 MATERIAL IN METODE	7
3.1 MATERIAL.....	7
3.1.1 Vzorci.....	7
3.1.2 Priprava vzorcev	7
3.1.2.1 Ekstrakcija v vodi (raztopina medu v vodi).....	7
3.1.2.2 Ekstrakcija v etanolu (raztopina medu v 70 % etanolu).....	7
3.1.2.3 Ekstrakcija na trdni fazi – SPE	7
3.2 METODE.....	8
3.2.1 Določanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu.....	8
3.2.1.1 Določanje vsebnosti vode	8
3.2.1.2 Določanje električne prevodnosti medu	9
3.2.2 Instrumentalno merjenje barve medu s kromametrom.....	9
3.2.3 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo	10
3.2.4 Določanje vsebnosti flavonoidov	10
3.2.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH.....	11

3.2.6	Statistična analiza	12
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	13
4.1	REZULTATI DOLOČANJA OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV MEDU	13
4.2	REZULTATI INSTRUMENTALNEGA MERJENJA BARVE MEDU S KROMAMETROM.....	13
4.3	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	14
4.4	REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI FLAVONOIDOV	16
4.5	REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO DPPH.....	17
5	SKLEPI.....	19
6	POVZETEK.....	20
7	VIRI	22
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Značilnosti barve akacijevega, cvetličnega in gozdnega medu (Golob in sod., 2011)	6
Preglednica 2: Vsebnost vode in električna prevodnost (povprečje \pm SD) v vzorcih različnih vrst medu	13
Preglednica 3: Vrednosti parametrov barve L*, a* in b* (povprečje \pm SD) v analiziranih vrstah medu	13

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov – flavan (Marais in sod., 2006).....	2
Slika 2: Delitev flavonoidov glede na mesto vezave aromatskega obroča (Marais in sod., 2006).....	2
Slika 3: Struktura glavnih razredov flavonoidov (Aherne in O'Brien, 2002).....	3
Slika 4: Rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih medu	15
Slika 5: Rezultati določanja skupnih flavonoidov v vzorcih medu	17
Slika 6: Rezultati določanja antioksidativne učinkovitosti v vzorcih medu z metodo DPPH	17

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki za umeritveno krivuljo določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin	
Priloga B: Podatki za umeritveno krivuljo določanja skupnih flavonoidov	
Priloga C: Rezultati statistične analize: Pearsonovi koeficienti korelacij (r)	

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANOVA	analiza variance
AU	antioksidativna učinkovitost
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FC	Folin-Ciocalteu
GA	galna kislina
L* a* b*	parametri barvnega prostora
p	stopnja značilnosti oz. signifikanca
r	koeficient korelacije po Pearsonu
SD	standardni odklon

1 UVOD

Med je eno izmed pomembnih živil v naši prehrani in je bogat vir biološko aktivnih komponent. Vsebuje širok spekter fenolnih spojin, ki imajo antioksidativno učinkovitost. Zato je med živilo z antioksidativnim delovanjem in mu posledično pripisujejo ugodne učinke na zdravje; čebelji produkti se uporabljajo kot preventiva ali pa za zdravljenje mnogih bolezni; zaradi antioksidativnega delovanja se velikokrat uporabljajo tudi kot sestavina funkcionalnih živil (Juszczak in sod., 2016).

Najpomembnejši spojine, odgovorne za antioksidativni učinek medu, so flavonoidi in fenolne kisline. Antioksidativna učinkovitost medu je močno odvisna od sestave, ta pa je pogojena z botaničnim izvorom tega živila (Sancho in sod., 2016).

Eden izmed dejavnikov, ki lahko vpliva na rezultate pri določanju bioaktivnih spojin, je priprava vzorca. V večini dosedanjih raziskav poteka določanje v vodni raztopini medu. Ker lahko nekatere spojine (reducirajoči sladkorji) motijo analizo, lahko dobimo nepravilne rezultate (Sancho in sod., 2016).

V diplomskem delu smo se zato posvetili predvsem problematiki vpliva priprave vzorca na določanje antioksidativne učinkovitosti medu. Pred začetkom dela smo si zastavili delovno hipotezo: priprava vzorca vpliva na antioksidativno učinkovitost medu. Zastavljeno hipotezo bomo glede na rezultate laboratorijskih analiz potrdili ali ovrgli. Cilj raziskave je izmeriti skupne fenolne spojine, flavonoide in antioksidativno učinkovitost treh različnih vrst medu glede na botanično poreklo, pripravljenih oziroma ekstrahiranih na tri različne načine. Želimo ugotoviti, kakšne razlike med rezultati naštetih parametrov daje analiza s spektrofotometrično metodo v odvisnosti od priprave vzorca. Cilj je tudi ugotoviti povezavo med barvo medu in antioksidativno učinkovitostjo, določeno pri različnih načinih priprave vzorca.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FENOLNE SPOJINE

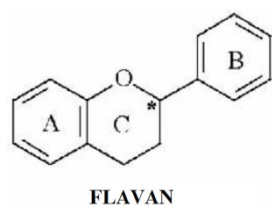
Fenolne spojine predstavljajo širok rang organskih spojin z aromatskim obročem in eno ali več hidroksilnimi (-OH) skupinami. Najbolj osnovna oblika je fenol, a se fenolne spojine v naravi večinoma pojavljajo v obliki polifenolov. Fenolne spojine so značilne za vsa rastlinska tkiva in so produkti sekundarnega metabolizma rastlin. Znanih je več kot 8000 fenolnih spojin, od katerih flavonoidi formirajo največjo skupino (Mann, 1994).

Živila, ki izvirajo iz rastlin, vsebujejo širok spekter fenolnih spojin. Ti sekundarni metaboliti se primarno sintetizirajo iz fenilalanina ter v manjšem obsegu v nekaterih rastlinah iz tirozina. V živilih najdemo veliko razredov fenolnih spojin, med njimi so fenolne kisline, flavonoidi in tudi tanini (Shahidi, 2002).

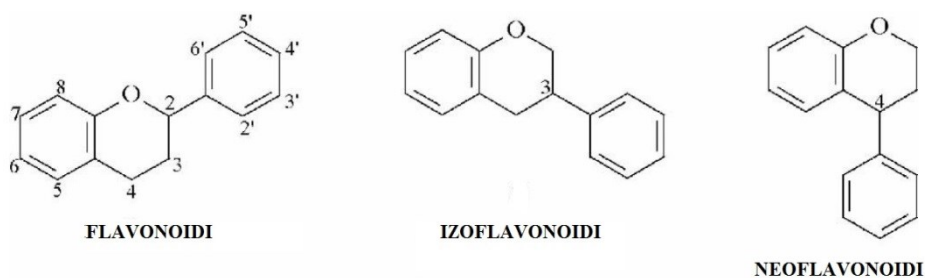
2.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi so velika in hkrati zelo pomembna skupina nizkomolekularnih polifenolnih spojin. Kemijske strukture teh spojin temeljijo na osnovni strukturi $C_6-C_3-C_6$, imenovano flavan oziroma 2-fenilbenzopiran (Slika 1) (Marais in sod., 2006).

Osnovna struktura flavonoidov je sestavljena iz treh fenolnih obročev A, B in C (Slika 1). Benzenov (obroč A) je kondenziran s heterocikličnim obročem (obroč C), ki ima vezano fenolno skupino (obroč B) (Aherne in O'Brien, 2002).



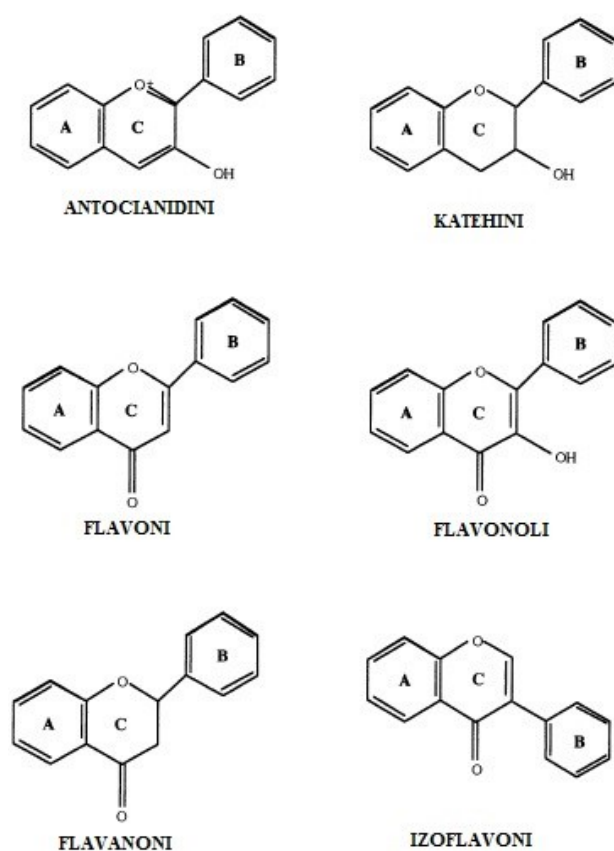
Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov – flavan (Marais in sod., 2006)



Slika 2: Delitev flavonoidov glede na mesto vezave aromatskega obroča (Marais in sod., 2006)

Glede na mesto vezave atomatskega obroča B na aromatski obroč C, se lahko delijo v tri skupine: flavonoidi, izoflavonoidi in neoflavonoidi (Slika 2). Nekatere strukturno precej drugačne organske spojine, kot so halkoni in avroni, prav tako vsebujejo osnovno strukturo C₆-C₃-C₆, zato tudi te spojine prištevamo med flavonoide (Marais in sod., 2006).

Flavonoidi se klasificirajo v več skupin glede na stopnjo oksidacije in nenasičenost heterocikličnega obroča C (Marais in sod., 2006). Glavni razredi flavonoidov so antocianidini, flavanoli (katehini), flavoni, flavonoli, flavanoni in izoflavoni. Njihova struktura je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Struktura glavnih razredov flavonoidov (Aherne in O'Brien, 2002)

Flavonoide, ki imajo nase vezane ogljikove hidrate, imenujemo glikozidi, flavonoidi brez vezanega sladkorja pa so v obliki aglikonov. V rastlinah se aglikoni ne pojavljajo; večinoma se flavonoidi nahajajo v obliki O- in C-glikozidov. O-glikozidi imajo ogljikov hidrat vezan na hidroksilno skupino flavonoida, C-glikozidi pa neposredno na ogljikov atom aglikona. Najpogosteje so flavonoidi glikolizirani z D-glukozo, redkeje pa z galaktozo, arabinozo, ramnozo, ksilozo. Glikolizacija poveča polarnost flavonoidov, in s tem topnost fenolne spojine v vodi. Flavonoli in flavoni se v hrani najpogosteje nahajajo kot O-β-glikozidi (Aherne in O'Brien, 2002; Bertonecelj, 2008).

Flavonoidi so široko zastopani v hrani in pijači rastlinskega izvora: v sadju, zelenjavi, čaju, kakavu in vinu. Številni zapisi navajajo njihovo prisotnost v različnih živilih. Izmed flavonolov ter flavonov je v živilih v največji meri zastopan flavonol kvercetin (Lin in Weng, 2006).

2.1.1.1 Flavonoidi v medu

Flavonoidi in ostale fenolne spojine so v največji meri odgovorne za antioksidativno učinkovitost medu (Sancho in sod., 2016).

Najpogostejše skupine flavonoidov v medu so flavoni, flavonoli in flavanoni. Flavonoidi v medu izvirajo iz propolisa, čebeljega voska, nektarja in cvetnega prahu. V medu so najpogosteje zastopani flavonoidi, ki izvirajo iz propolisa. Propolis je naravni izdelek čebel, katerega čebele vgradijo v med, in je obogaten z izločki čebeljih žlez. Flavonoidi, ki katerih vir sta nektar in pelod, se v medu nahajajo v glikolizirani obliki, vendar zaradi delovanja encima glikozidaze, ki se nahaja v čebeljih žlezah slinovkah, hidrolizirajo. V medu zato najdemo samo flavonoide v obliki aglikonov (Bertoncelj, 2008).

2.1.2 Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin (flavonoidov)

Flavonoidi kot antioksidanti delujejo na različne načine:

- lovljenje reaktivnih kisikovih spojin,
- inhibicija encimov oksidaz,
- keliranje (vezava) kovin, ki sodelujejo v procesu tvorjenja radikalov in
- preprečevanje procesa peroksidacije z zmanjšanjem alkoksilnih in peroksilnih radikalov (Pyrzynska in Biesaga, 2009).

Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je odvisna predvsem od njihova kemijske strukture. Za fenolne spojine je značilno predvsem lovljenje radikalov. Zaradi antioksidativnega delovanja se fenolnim spojinam pripisujejo različne fiziološke lastnosti (Bertoncelj, 2008).

Fenolne spojine oziroma flavonoidi, kot sestavni del živil, so znani po potencialnih koristih pri uravnavanju oksidativnega stresa, zato imajo pomembno vlogo pri preprečevanju bolezni in ohranjanju zdravja. Uravnavanje oksidativnega stresa je odvisno od kemijske strukture in kvantitete fenolnih spojin v hrani (Shahidi, 2002). Fenolne spojine imajo veliko različnih bioloških učinkov. Delujejo antibakterijsko in protivnetno, zavirajo alergije ter so tudi antitrombotiki, kar pomeni, da preprečujejo nastajanje krvnih strdkov. Epidemiološke študije kažejo na njihovo potencialno vlogo pri preprečevanju srčno-žilnih bolezni in raka (Pyrzynska in Biesaga, 2009; Lin in Weng, 2006). Flavonoidi naj bi preventivno delovali tudi pred procesi staranja (Bertoncelj, 2008).

2.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST MEDU

Med je poznan kot živilo z visoko prehransko oziroma nutritivno ter terapevtsko in profilaktično vrednostjo. Že stari egipčani in grki so med uporabljali kot zdravilo pri manjših zdravstvenih tegobah, kot so razjede na želodcu in kožne rane. V zadnjem času se vedno večja pozornost namenja apiterapiji, preventivni medicinski metodi za preprečevanje, lajšanje in zdravljenje zdravstvenih težav s pomočjo čebeljih pridelkov, kot tudi na splošno za krepitev in ohranjanje zdravja (Pyrzynska in Biesaga, 2009).

Med ima zaradi svojega sladkega okusa in barve velikokrat vlogo sladila, konzervansa ali sestavine v mnogih predelanih živilih. Preprečuje reakcije oksidacije v hrani (na primer oksidacije lipidov v mesu in encimsko porjavenje sadja ter zelenjave). Poleg tega zavira tudi rast mikroorganizmov, ki kvarijo živila in so lahko zdravju škodljivi. S kemijskega stališča je med visoko koncentrirana raztopina sladkorjev, predvsem fruktoze in glukoze. Njegova sestava je močno odvisna od vrst rastlin, iz katerih čebele nabirajo nektar ali mano, ter od ostalih dejavnikov, kot so okoljski pogoji, podnebje. Poleg sladkorjev vsebuje med manjše količine spojin, med katerimi jih ima precej antioksidativne lastnosti. S tem ko čebele na nekaterih rastlinah nabirajo nektar ali mano, prenesejo te bioaktivne komponente v med. Lahko so fenolnega (flavonoidi in fenolne kisline) in nefenolnega izvora (nekateri encimi, askorbinska kislina, organske kisline, aminokisline in proteini). Dokazano je, da ima med podobno antioksidativno sposobnost kot mnogo vrst sadja in zelenjave (Alvarez-Suarez in sod., 2009; Bertoncelj, 2008; Pyrzynska in Biesaga, 2009).

Analiza fenolnih spojin je obetaven način določanja botaničnega in geografskega porekla medu. Nekaterе vrste medu vsebujejo tipične flavonoide, ki so značilni za posamezne vrste medu; na primer, hesperetin je marker za medove iz citrusov, kamferol za rožmarinov in kvercetin za sončnični med. Tudi nekatere fenolne kisline so lahko pokazatelji botaničnega izvora medu. Glavna razlika med evkaliptusovim medom različnega geografskega porekla (avstralskega in evropskega) je ravno v vsebnosti flavonoidov, ki izvirajo iz propolisa (Pyrzynska in Biesaga, 2009).

2.3 BARVA MEDU

Barva hrane je pogosto kriterij določanja kakovosti hrane, prav tako pa omogoča tudi ocenjevanje botaničnega in geografskega izvora ter proizvodne posebnosti. Barva medu variira od skoraj brezbarvne, svetlo rumene, preko jantarne do skoraj črne, velikokrat je v zelenih in rdečkastih odtenkih (Tuberoso in sod., 2014). Značilnosti barve akacijevega, cvetličnega in gozdnega medu so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Značilnosti barve akacijevega, cvetličnega in gozdnega medu (Golob in sod., 2011)

Vrsta medu	Barva medu
Akacijev	Skoraj brezbarvna do slamnato rumena
Cvetlični	Raznolika, od slamnato rumene do rjave; odvisna od vrste rastlin in deleža medu iz mane
Gozdni	Svetlo do temno rjava, lahko z rdečim ali zelenim odtenkom

Senzorična analiza barve medu lahko poleg botaničnega porekla pomaga oceniti tudi stopnjo toplotne obdelave in prisotnost napak. Medovi, ki so iz specifične vrste rastlin, imajo značilne senzorične lastnosti in so na trgu zelo cenjeni. Barva medu je eden izmed faktorjev, ki lahko vpliva na ceno medu; v mnogih državah so svetleje obarvani medovi dražji, obratno pa so ponekod bolj cenjeni temnejši medovi (Tuberoso in sod., 2014).

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

Polifenoli rastlinskega izvora so ekonomsko pomembni, saj pomembno prispevajo k okusu, aromi in barvi živil (Mann, 1994).

Znano je, da obstaja pozitivna korelacija med barvo, vsebnostjo pepela in električno prevodnostjo medu. Ugotovljena je bila tudi medsebojna povezava med barvo medu, vsebnostjo fenolnih spojin ter antioksidativno učinkovitostjo (Tuberoso in sod., 2014).

Veliko raziskav v zadnjem času je dokazalo, da je variabilnost antioksidantov v medu v največji meri odvisna od vrste medu. Botanični izvor ima največji vpliv na vsebnost antioksidantov, medtem ko ostali dejavniki, kot so postopek pridelovanja in shranjevanje medu, temu prispevajo v manjši meri. Študije dokazujejo, da je antioksidativna učinkovitost medu močno povezana z vsebnostjo fenolnih spojin v medu. Kot že omenjeno, so ugotovili močno povezavo tudi med antioksidativno učinkovitostjo medu in njegovo barvo. (Bertoncelj in sod., 2007). Študije so pokazale, da imajo medovi temnejše barve višjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in posledično večjo antioksidativno učinkovitost (Pyrzynska in Biesaga, 2009). Tudi raziskava slovenskega medu je pokazala enako povezavo (Bertoncelj in sod., 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci

Za analizo smo izbrali tri vrste medu različnega botaničnega izvora - akacijev med, mešani cvetlični in gozdni med slovenskega porekla. Vsak vzorec medu je bil za analize pripravljen na tri različne načine. Vse analize smo opravili v treh paralelkah.

3.1.2 Priprava vzorcev

3.1.2.1 Ekstrakcija v vodi (raztopina medu v vodi)

Želena koncentracija izhodne raztopine medu je bila 100 mg/ml. Pripravili smo jo tako, da smo odtehtali 5 g medu in ga raztopili v destilirani vodi. Raztopini smo dodali destilirano vodo do 50 ml. Med smo predhodno homogenizirali z mešanjem s stekleno palčko.

3.1.2.2 Ekstrakcija v etanolu (raztopina medu v 70 % etanolu)

Reagenti:

- dvakrat destilirana voda
- 96 % raztopina etanola

Izhodno raztopino 96 % etanola smo razredčili z dvakrat destilirano vodo v takem razmerju, da smo dobili 70 % raztopino etanola. Raztopino medu v 70 % etanolu smo pripravili na enak način in v enaki koncentraciji kot raztopino medu v vodi.

3.1.2.3 Ekstrakcija na trdni fazi – SPE

Za pripravo raztopine smo najprej izvedli ekstrakcijo fenolnih spojin iz medu s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi - SPE. Eluat, ki smo ga dobili z ekstrakcijo, je vseboval fenolne spojine, raztopljene v mešanici metanol/acetoni-tril. Eluat smo kvantitativno prenesli v bučko in jo dopolnili z destilirano vodo do volumna 50 ml. To je predstavljalo naš vzorec, pripravljen na tretji način.

Princip ekstrakcije:

Na trdno fazo v koloni Strata X se vežejo samo fenolne spojine, druge komponente pa ne. Le-te eluiramo z mešanico metanol/acetoni-tril (Bertoncelj, 2008).

Reagenti:

- metanol
- acetonitril
- dvakrat destilirana voda
- nakisana voda (voda z dodatkom HCl), pH=2

Aparatura:

- naprava za SPE
- ekstrakcijske kolone Strata X

Izvedba:

V čašo smo odtehtali 10 g vzorca medu in ga raztopili v 15 ml nakisane vode. Kolono smo kondicionirali s 3 ml metanola in 3 ml dvakrat destilirane vode s pretokom približno 1 ml/min (eluat smo zavrgli). Nato smo v kolono uvajali raztopino medu s pretokom 1 ml/min (eluat smo zavrgli). Neželene komponente, predvsem ogljikove hidrate, kisline in morebitne nečistoče smo odstranili z izpiranjem; najprej s 5 ml nakisane vode, nato pa s 15 ml dvakrat destilirane vode. Kolono, na kateri so ostale samo fenolne spojine, smo osušili tako, da smo za 3 minute skozi kolono spustili zrak. Nato smo spirali kolono trikrat z 1 ml mešanice metanola in acetonitrila v razmerju 2:1 (v/v) ter eluat ulovili v epruveto (Bertoncelj, 2008).

3.2 METODE

3.2.1 Določanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu

3.2.1.1 Določanje vsebnosti vode

Princip:

Določanje vsebnosti vode v medu izvedemo refraktometrično. Z ročnim refraktometrom merimo lomni količnik oziroma odčitamo neposredno odstotek vode v medu.

Aparatura:

- prenosni refraktometer

Izvedba:

Tekoč med smo pred analizo premešali s čisto stekleno palčko. Na čisto in suho prizmo refraktometra smo nanegli tanko plast medu in direktno odčitali odstotek vode. Pri odčitavanju smo upoštevali temperaturno korekcijo ($T_S = 20^\circ\text{C}$). Vsako meritev smo opravili na dveh refraktometrih in rezultat podali kot povprečno vrednost dveh določitev.

3.2.1.2 Določanje električne prevodnosti medu

Princip:

Električno prevodnost vodne raztopine medu določimo s konduktometrom.

Aparatura in pribor:

- konduktometer
- merilni lonček, steklena palčka

Reagenti:

- destilirana voda

Izvedba:

Električna prevodnost medu je zaradi sladkorjev, ki motijo gibljivost ionov, nizka. Gibljivost ionov narašča z razredčitvijo medu v destilirani vodi, zato smo pripravili raztopino medu z 20 % suhe snovi. Odtehto medu smo preračunali glede na refraktometrično določeno količino vode v medu. Pripravljeni raztopini smo izmerili električno prevodnost tako, da smo v raztopino potopili konduktometer. Pri tem je bilo potrebno paziti, da se konduktometer ni dotikal dna in da na elektrodah ni bilo zračnih mehurčkov. Odčitali smo prevodnost raztopine v $\mu\text{S}/\text{cm}$ in jo delili s tisoč. Rezultat smo podali v mS/cm (miliSiemens na centimeter).

3.2.2 Instrumentalno merjenje barve medu s kromametrom

Princip:

Kromameter v CIE $L^*a^*b^*$ sistemu barvo vzorca razdeli na tri komponente, ki jih predstavi v določenem koordinatnem sistemu. Vrednost L^* določa svetlost vzorca: večja kot je, svetlejša je živilo. Vrednost a^* in b^* določata odtenek barve: a^* določa intenziteto rdeče barve v pozitivnem območju in zelene barve v negativnem; b^* intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem (HunterLab, 1996).

Aparatura:

- kromameter Minolta CR-400 (Konica Minolta)

Izvedba:

Prozorne petrijevke smo napolnili z medom in jih pokrili s pokrovom. Kromameter smo naslonili na pokrov petrijevke in odčitali vrednosti L^* , a^* in b^* . Vsakemu vzorcu smo barvo izmerili trikrat oziroma štirikrat (na različnih mestih) in rezultat podali kot povprečje meritev (Bertoncelj, 2008).

3.2.3 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo

Princip:

Princip spektrofotometrične metode je oksidacija fenolnih spojin s Folin-Ciocalteuevim (FC) reagentom. Nastane obarvan produkt, ki mu izmerimo absorbanco pri 760 nm. Rezultate podamo s pomočjo pripravljene umeritvene krivulje, za katero uporabimo raztopine galne kisline (Bertoncelj, 2008).

Reagenti:

- destilirana voda
- 70 % etanol
- 0,2 N Folin-Ciocalteuev reagent, raztopljen v destilirani vodi v razmerju 1:10
- natrijev karbonat (75mg/ml)
- galna kislina (5 mg/ml); delovne raztopine: 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100 µg/ml

Aparatura in pribor:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 760 nm)
- steklene čaše, epruvete, pipete, kivete

Izvedba:

K 0,5 ml raztopine posameznega vzorca (100 mg/ml) smo dodali 2.5 ml 0.2 N Folin-Ciocalteujevega reagenta. Po 5 minutah smo dodali 2 ml natrijevega karbonata, nato pa raztopino pustili stati v temi 120 minut. Nazadnje smo izmerili absorbanco pri 760 nm. Enako smo storili s slepim vzorcem, ki smo ga pripravili tako, da je vseboval le reagente in topilo (namesto vzorca). Izvedli smo korekcijo barve, kjer smo raztopinam vzorca namesto reagentov dodali topilo. Koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z raztopinami galne kisline. Rezultate smo izrazili v mg galne kisline na 100 g medu (Sancho in sod., 2016).

3.2.4 Določanje vsebnosti flavonoidov

Princip:

Spektrofotometrična metoda določanja flavonoidov temelji na osnovi kelacije aluminijevih ionov s flavonoidi. Absorbanco izmerimo pri valovni dolžini 415 nm. Rezultati so izraženi glede na umeritveno krivuljo, pripravljeno z raztopinami kvercetina kot mg kvercetina na 100 g medu (Sancho in sod., 2016).

Reagenti:

- metanol
- 2 % raztopina AlCl₃ v metanolu
- kvercetin (15,05 µg/ml); delovne raztopine: 0,7, 2,2, 1,5, 3,0, 6,0 in 10,5 µg/ml

Aparatura in pribor:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 415 nm)
- steklene čaše, epruvete, pipete, kivete

Izvedba:

V epruveto smo odpipetirali 1 ml posameznega vzorca in mu dodali enak volumen 2 % AlCl_3 v metanolu. Pripravili smo slepi vzorec, ki je vseboval 1 ml 2 % AlCl_3 v metanolu in 1 ml metanola (namesto razredčenega ekstrakta medu), ter vzorce korekcije za barvo, ki so vsebovali 1 ml raztopine posameznih vzorcev medu ter 1 ml metanola. Po 10 minutah smo vzorcem izmerili absorbanco pri 415 nm. Umeritveno krivuljo smo pripravili z raztopinami kvercetina in rezultate podali v mg kvercetina na 100 g medu (Sancho in sod., 2016).

3.2.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo DPPH

Princip:

Metoda temelji na redukciji radikala DPPH•, zaradi česar se spremeni barva raztopine. To se zgodi ob reakciji z antioksidantom, ki je donor vodika. Vijoličasta barva prostega radikala prehaja v rumeno barvo produkta, ki mu spektrofotometrično izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 517 nm (Bertoncelj, 2008).

Reagenti:

- metanol
- 0,1 mM raztopina DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) v metanolu

Aparatura in pribor:

- spektrofotometer Cecil CE 2021 (valovna dolžina 517 nm)
- steklene čaše, epruvete, pipete, kivete

Izvedba:

V epruvete smo odpipetirali 0,3 ml izhodne raztopine posameznega vzorca medu in 2,7 ml DPPH• reagenta. Vzoredno smo pripravili kontrolni in slepi vzorec. Slepni vzorec je predstavljal metanol, kontrolni pa metanol (namesto vzorca medu) in DPPH• reagent. Raztopine smo pomešali na vrtničniku ter jih inkubirali 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Potem smo na spektrofotometru vzorcem izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Izmerjene absorbance smo nato uporabili pri izračunu antioksidativne učinkovitosti, izražene kot odstotek inhibicije. Pri računanju smo uporabili enačbo:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100 \quad \dots (1)$$

A_{kontrola} je absorbanca kontrolnega vzorca. Kontrolni vzorec je vseboval DPPH• reagent in namesto raztopine medu metanol (Juszczak in sod., 2015).

3.2.6 Statistična analiza

Rezultate določanja osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov medu, vrednotenja barve z Minolta kromametrom ter rezultate spektrofotometričnih analiz smo vnesli v excelovo preglednico ter izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone. Značilne razlike smo ugotavljali s pomočjo analize variance (test ANOVA). Rezultate spektrofotometričnih analiz smo obdelali s testi za primerjave med vrednostmi parametra v odvisnosti od ekstrakcije in znotraj posamezne ekstrakcije med vrstami medu. Izračunali smo korelacije med merjenimi parametri za vsak primer ekstrakcije.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI DOLOČANJA OSNOVNIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV MEDU

Rezultati v preglednici 2 predstavljajo povprečne vrednosti in standardni odklon (SD) opravljenih meritev. Vsebnost vode je bila najvišja v vzorcu akacijevga medu ter najnižja v vzorcu gozdnega medu. S statističnim testom ANOVA smo ugotovili, da so bile vsebnosti vode v analiziranih vzorcih treh vrst medu statistično značilne ($p \leq 0,05$). Vsi vzorci medu so ustrezali Pravilniku o medu (2011), saj niso vsebovali več kot 20 % vode.

Preglednica 2: Vsebnost vode in električna prevodnost (povprečje \pm SD) v vzorcih različnih vrst medu

Vrsta medu	Vsebnost vode (%)	Električna prevodnost (mS/cm)
Akacijev	16,1 \pm 0,1 ^c	0,115 \pm 0,005 ^a
Cvetlični	14,9 \pm 0,1 ^b	0,770 \pm 0,000 ^b
Gozdni	13,9 \pm 0,1 ^a	1,440 \pm 0,010 ^c

^{a,b,c} – Vrednosti parametra z različno črko se značilno razlikujejo (ANOVA, $p \leq 0,05$)

V električni prevodnosti so se vzorci medu pričakovano precej razlikovali, razlike so bile tudi statistično značilne. Po pravilniku lahko imata akacijev in cvetlični med električno prevodnost največ 0,8 mS/cm, gozdni med pa mora imeti najmanj 0,8 mS/cm. Vsi vzorci v tem parametru ustrezajo Pravilniku o medu (2011). Vzorec cvetličnega medu na podlagi električne prevodnosti komaj še prištevamo k cvetličnim medovom, vendar pa je ustrezal tej vrsti po senzoričnih lastnostih. Vzorec akacijevga medu ima najnižjo električno prevodnost, medtem ko je precej višja električna prevodnost vzorca gozdnega medu (1,440 mS/cm) in je tudi v primerjavi z vzorcem cvetličnega medu skoraj še enkrat višja.

4.2 REZULTATI INSTRUMENTALNEGA MERJENJA BARVE MEDU S KROMAMETROM

Višja kot je vrednost L*, svetlejši je med. L* vrednosti se gibljejo od 0 (črna barva) do 100 (bela barva). Iz povprečnih vrednosti, podanih v preglednici 3 lahko razberemo, da je vzorec akacijevga medu precej svetel, vrednost se je zniževala pri vzorcu cvetličnega medu, najnižjo vrednost pa smo izmerili v vzorcu gozdnega medu.

Preglednica 3: Vrednosti parametrov barve L*, a* in b* (povprečje \pm SD) v analiziranih vrstah medu

Vrsta medu	L*	a*	b*
Akacijev	65,29 \pm 0,62	-1,83 \pm 0,01	13,18 \pm 0,32 ^a
Cvetlični	46,81 \pm 0,37	9,77 \pm 0,11	39,88 \pm 0,41 ^c
Gozdni	41,86 \pm 0,03	14,81 \pm 0,08	35,49 \pm 0,40 ^b

^{a,b,c} – Vrednosti parametra z različno črko se značilno razlikujejo (ANOVA, $p \leq 0,05$)

Vrednosti a^* in b^* prikazujejo odtenke medu. Pozitivna a^* vrednost predstavlja intenziteto rdeče, negativna pa zelene barve. Vzorec akacijevga medu je rahlo zelenkast ($a^* = -1,83$), vzorca cvetličnega in gozdnega medu pa vsebujeta nekaj več rdečih odtenkov (gozdni več od cvetličnega). Vrednost b^* predstavlja intenziteto rumene barve v pozitivnem območju in modre v negativnem. Vsi vzorci so rumeno obarvani; najbolj intenzivno vzorec cvetličnega medu, kjer je vrednost b^* znašala 39,88, manj vzorec gozdnega medu z vrednostjo 35,49, vzorec akacijevga medu pa vsebuje najmanj rumenih odtenkov ($b^*=13,18$). S statistično analizo smo ugotovili, da so razlike med vzorci medu v parametru b^* statistično značilne ($p \leq 0,05$), med tem ko tega ne moremo trditi za parametra L^* in a^* , saj ni bil izpolnjen pogoj homogenosti varianc.

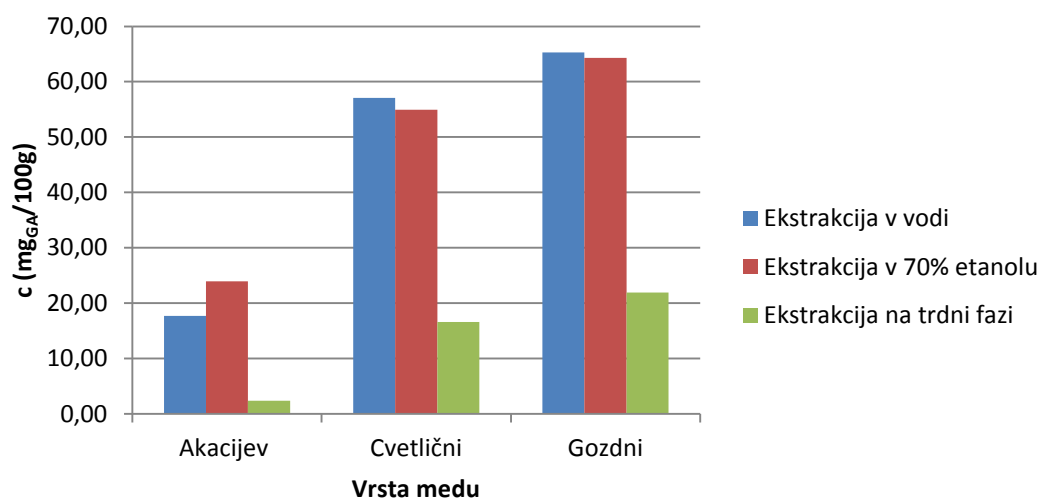
Če povzamemo rezultate, lahko vzorec akacijevga medu opišemo kot najsvetlejšega izmed vzorcev, obarvanega rahlo rumeno z nekaj zelenimi odtenki. Vzorca cvetličnega in gozdnega medu pa kot med z intenzivno rumeno obarvanostjo ter precej rdečih odtenkov. Vzorec gozdnega medu je v primerjavi z vzorcem cvetličnega medu temnejši in ima nekaj manj rumenih odtenkov ter več rdečih.

Analizirani vzorci so se po barvi precej razlikovali, kar lahko v največji meri pripišemo njihovemu različnemu botaničnemu izvoru. Z barvo lahko povežemo električno prevodnost (Tuberoso in sod., 2014). To so tudi pokazale vrednosti meritev, vendar niso v vseh parametrih statistično značilne. Bolj kot je bil vzorec medu temen, višja je bila njegova električna prevodnost.

4.3 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin se je močno razlikovala tako med vzorci različnega botaničnega izvora, kot tudi v odvisnosti od načina priprave. Slika 4 prikazuje koncentracije skupnih fenolnih spojin v analiziranih treh vzorcih, izraženih kot mg galne kisline na 100 g medu. Vrednosti so povprečne vrednosti treh paralelk, v rezultatih pa je tudi upoštevana korekcija barve. Umeritvena krivulja, ki smo jo pripravili z raztopinami galne kisline, je priložena v prilogi A.

V splošnem smo pri vseh treh načinih priprave vzorcev medu najmanj fenolnih spojin določili v vzorcu akacijevga medu, precej več pa v vzorcu cvetličnega in največ v vzorcu gozdnega medu (slika 4).



Slika 4: Rezultati določanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih medu

Predvsem nas je zanimala razlika med vrednostmi fenolnih spojin znotraj posamezne vrste medu v odvisnosti od ekstrakcije. Največjo količino skupnih fenolnih spojin, izraženih kot mg galne kisline na 100 g medu, smo določili v vzorcih medu, pripravljenih v vodi, razen pri akacijevem medu, kjer so najvišje vrednosti predstavljali vzorci, raztopljeni v 70% etanolu. Med vodnimi in etanolnimi ekstrakti so se koncentracije skupnih fenolov le malo razlikovale – povprečne vrednosti v vodnih ekstraktih so bile v območju od 17,7 mg_{GA}/100 g pri vzorcu akacijevga medu do 65,3 mg_{GA}/100 g pri vzorcu gozdnega medu, v etanolnih ekstraktih pa od 23,9 mg_{GA}/100 g pri vzorcu akacijevga medu do 64,3 mg_{GA}/100 g pri vzorcu gozdnega medu. Precej nižje vrednosti pa smo (pri vseh analiziranih vrstah medu) izmerili v vzorcih, pripravljenih na tretji način - z ekstrakcijo na trdni fazi in raztapljanjem v metanolu. Tu so se vrednosti gibale od 2,4 mg_{GA}/100 g pri vzorcu akacijevga do 22,0 mg_{GA}/100 g pri vzorcu gozdnega medu. Pri vzorcih cvetličnega in gozdnega medu so bile vrednosti v ekstraktih, ki smo jih pridobili z ekstrakcijo na trdni fazi, v primerjavi z vodnimi ekstrakti približno 3-krat manjše, pri akacijevem pa več kot 7-krat manjše, od vrednosti v etanolnem ekstraktu skoraj 10-krat manjše.

S statističnim testom ANOVA smo ugotovili, da so bile razlike v analiziranih vzorcih medu v odvisnosti od vrste ekstrakcije tudi statistično značilne ($p \leq 0,05$). Naredili smo tudi teste za primerjavo rezultatov med vrstami medu znotraj posamezne ekstrakcije. Razlike so bile statistično značilne v vodnih in etanolnih ekstraktih, med tem ko za ekstrakte, ki smo jih pridobili z ekstrakcijo na trdni fazi, to ne velja, saj ni bil izpolnjen pogoj homogenosti varianc ($p > 0,05$).

Vsebnost skupnih fenolnih spojin se je torej pri vseh treh vrstah medu glede na pripravo vzorca močno razlikovala in je bila značilno najnižja v vzorcih, ekstrahiranih po SPE metodi. Sancho in sod. (2016) so v svoji raziskavi podali enake ugotovitve ter pojasnili, da

je vsebnost fenolnih spojin v vodnih ekstraktih višja kot v vzorcih, ekstrahiranih po SPE, saj Folin-Ciocalteujeva metoda določa celotno redukcijsko kapaciteto, med pa poleg fenolnih spojin vsebuje tudi druge reducirajoče spojine, kot so reducirajoči sladkorji in askorbinska kislina. Tudi za višje vrednosti s spektrofotometričnimi metodami določenih parametrov v etanolnih ekstraktih so lahko razlog prisotne druge reducirajoče spojine v medu, ki motijo analizo.

4.4 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI FLAVONOIDOV

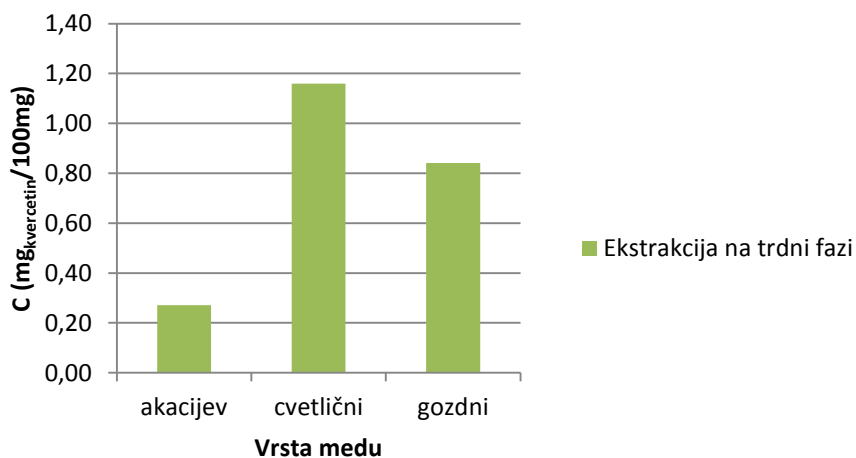
Tako kot pri določanju vsebnosti skupnih fenolnih spojin, smo tudi pri analiziranju flavonoidov izmerili in upoštevali korekcijo barve. Pri metodi določanja skupnih flavonoidov je imela korekcija barve veliko večji vpliv, kot pri določanju skupnih fenolnih spojin. V vseh vodnih ekstraktih in tudi v etanolnem ekstraktu vzorca gozdnega medu, so bile izmerjene absorbance raztopin z medom (1 ml raztopine medu in 1 ml metanola) višje od absorbance raztopine vzorca (1 ml raztopine medu in 1 ml 2% AlCl_3 v metanolu).

Sancho in sod. (2016) so v svoji raziskavi dobili podobne rezultate; pri določanju flavonoidov v vodnih raztopinah medu je bila v več kot 95 % primerih izmerjena absorbance raztopin z medom višja od absorbance vzorca. Za meritve po tej metodi je korekcija barve pomembna, saj pri valovni dolžini 415 nm, pri kateri poteka merjenje absorbance, barva medu moti analizo, kar je še posebej ključnega pomena pri temnih vzorcih. Po njihovih ugotovitvah je določanje flavonoidov v vodnih ekstraktih nezanesljivo zaradi v medu prisotnih motečih spojin in je to metodo mogoče ustrezno izvesti le na vzorcih, predhodno ekstrahiranih na trdni fazi, s poudarkom na upoštevanju korekcije barve (Sancho in sod., 2016). Zato smo upoštevali le rezultate vzorcev, ekstrahiranih v na trdni fazi.

Koncentracije flavonoidov smo določili s pomočjo umeritvene krivulje z raztopinami kvercetina in so izražene v mg kvercetina na 100 g medu (priloga B). Vrednosti so povprečne vrednosti treh paralelk.

Vrednosti, ki smo jih pridobili pri določitvi skupnih flavonoidov v vodnih in etanolnih ekstraktih, so se gibale med -4,32 in 0,29 $\text{mg}_{\text{kvercetin}}/100 \text{ g}$ in smo jih izločili iz analize. Vrednosti v vzorcih, ki smo jih pridobili z ekstrakcijo na trdni fazi, so relativno nizke. V vzorcu akacijevega medu smo izmerili povprečno vrednost 0,27 $\text{mg}_{\text{kvercetin}}/100 \text{ g}$, v vzorcu cvetličnega medu 1,16 $\text{mg}_{\text{kvercetin}}/100 \text{ g}$ in v vzorcu gozdnega medu 0,84 $\text{mg}_{\text{kvercetin}}/100 \text{ g}$.

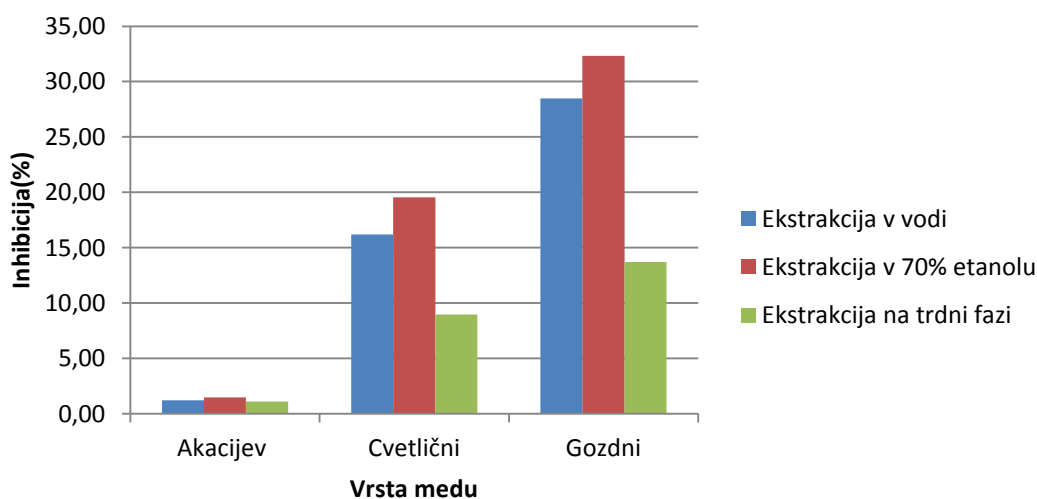
S statistično analizo smo ugotovili, da so razlike med vrstami medu, kjer smo opravili ekstrakcijo na trdni fazi, statistično značilne ($p \leq 0,05$). Če je pri določanju vsebnosti skupnih fenolnih spojin najvišje vrednosti dosegal vzorec gozdnega medu, pa smo v vzorcu cvetličnega medu določili največ skupnih flavonoidov.



Slika 5: Rezultati določanja skupnih flavonoidov v vzorcih medu

4.5 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO DPPH

Rezultate te analize smo izrazili kot delež inhibicije (%) DPPH• radikala. Delež inhibicije predstavlja tisti del molekul DPPH•, ki so reagirale z antioksidanti v ekstraktu medu. To pomeni, da delež inhibicije narašča z večjo vsebnostjo antioksidantov v medu.



Slika 6: Rezultati določanja antioksidativne učinkovitosti v vzorcih medu z metodo DPPH

Rezultati so povprečne vrednosti treh meritev vzorcev cvetličnega in gozdnega medu, ter dveh meritev vzorca akacijevega medu. Najvišji delež inhibicije smo izračunali za vzorce medu, ekstrahirane v 70 % etanolu. Najmanjši je bil v vzorcih, ekstrahiranih na trdni fazi in raztopljenih v metanolu. V analiziranih vzorcih medu so vrednosti inhibicije pri različno pripravljanih vzorcih v podobnem razmerju, le pri vzorcu akacijevega medu so vrednosti

inhibicije različno pridobljenih ekstraktov v ožjem območju in so medsebojne razlike manjše. S statističnimi testi ANOVA smo ugotovili, da so bile vrednosti inhibicije v vzorcih vseh treh vrst medu v odvisnosti od vrste ekstrakcije statistično značilne ($p \leq 0,05$), kakor tudi razlike med vrstami medu znotraj posamezne ekstrakcije.

Če primerjamo rezultate določanja izvedenih treh spektrofotometričnih metod (skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in antioksidativne učinkovitosti), ugotovimo, da so bile pri vseh metodah značilno najnižje vrednosti v vzorcih, ki smo jih pridobili z ekstrakcijo na trdni fazi in raztopili v metanolu, kar kaže na večjo zanesljivost pridobljenih rezultatov vzorcev, pripravljenih na ta način. Iz teh vzorcev so bile odstranjeni ogljikovi hidrati, kisline in morebitne nečistoče, ki lahko motijo analize.

Medsebojne razlike v vrednostih skupnih fenolov in antioksidativne učinkovitosti v vodnih in etanolnih ekstraktih (pri metodi določanja flavonoidov so ti rezultati izvzeti) niso tako izrazite kot v primerjavi z vrednostmi vzorcev, ekstrahiranih na trdno fazo, pa vendar razlike so in so tudi statistično značilne. Najvišje vrednosti pri metodi določanja skupnih fenolov so pokazali vzorci, raztopljeni v nevtralnem mediju (razen pri vzorcu akacijevega medu), saj se v medu prisotne reducirajoče snovi v vodi raztapljajo boljše kot v 70% etanolu (reducirajoče snovi so v čistem etanolu slabo topne). Pri določanju antioksidativne učinkovitosti so značilno višje vrednosti dali vzorci, raztopljeni v 70 % etanolu. Razlog je v topnosti v medu prisotnih spojin, ki reagirajo z DPPH• reagentom v vodi in v 70 % etanolu. Reagirajo tudi karotenoidi (Alvarez-Suarez in sod., 2009). Prednost vodne raztopine etanola je, da se ekstrahirajo hidrofilne kakor tudi lipofilne aktivne komponente, kar olajša ekstrakcijo spojin, ki so topne v vodi in/ali organskem topilu (Oroian in Escribe, 2015).

Z izračunanimi Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti (r) znotraj vseh treh vrst ekstrakcij smo ugotovili zelo močne zveze med analiziranimi parametri (priloga C). Vrednosti r so bile pozitivne in so se gibale med 0,805 in 0,989. Zveze ne moremo potrditi le v primeru ekstrakcije v metanolu med flavonoidi in antioksidativno učinkovitostjo, saj tukaj ni bil izpolnjen pogoj o statistični značilnosti ($p \leq 0,05$).

Rezultati spektrofotometričnih analiz so pokazali, da vsebnost skupnih fenolov in antioksidativna učinkovitost po DPPH metodi naraščata od vzorca akacijevega do vzorca cvetličnega in na koncu vzorca gozdnega medu – od najsvetlejšega do najtemnejšega (ne glede na pripravo vzorca). Vsebnost flavonoidov narašča od vzorca akacijevega do vzorca gozdnega in cvetličnega medu.

Temnejše vrste medu vsebujejo več polifenolnih spojin in imajo posledično tudi višjo antioksidativno učinkovitost (Bertoncelj in sod., 2007; Tuberoso in sod., 2014; Pyrzyńska in Biesaga, 2009).

5 SKLEPI

Na osnovi opravljenih fizikalno-kemijskih analiz vzorcev treh vrst medu, pripravljenih na tri načine, smo ugotovili naslednje:

- Ugotovili smo, da priprava vzorca – vrsta ekstrakcije – vpliva na določanje skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in antioksidativne učinkovitosti medu. S tem smo tudi potrdili zastavljeno hipotezo.
- Največ skupnih fenolnih spojin smo določili v vzorcu gozdnega medu, največ skupnih flavonoidov v vzorcu cvetličnega medu in najvišjo antioksidativno učinkovitost v vzorcu gozdnega medu.
- Najvišje vrednosti skupnih fenolnih spojin so dali vzorci, ekstrahirani v vodi (razen pri vzorcu akacijevega medu, kjer je dal najvišjo vrednost etanolni ekstrakt), najvišje vrednosti antioksidativne učinkovitosti pa vzorci, pripravljeni v 70 % etanolu. Najnižje vrednosti skupnih fenolnih spojin kot tudi najnižjo antioksidativno učinkovitost so dali vzorci, ekstrahirani na trdni fazi.
- Določanje flavonoidov s spektrofotometrično metodo je smiselno izvajati le z vzorci, predhodno ekstrahiranimi na trdni fazi.
- Najbolj zanesljive vrednosti teh parametrov dobimo, če vzorec medu pripravimo s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi.
- Vrednosti analiziranih parametrov med vrstami medu so statistično različne, razen v barvnih parametrih L^* in a^* , ter v vrednostih skupnih fenolnih spojin v metanolnih ekstraktih.
- Najvišjo vsebnost vode smo določili v vzorcu akacijevega medu in najnižjo v vzorcu gozdnega medu. Najvišjo električno prevodnost medu smo izmerili v vzorcu gozdnega medu ter najnižjo v vzorcu akacijevega medu.
- Svetlost vzorcev je padala od vzorca akacijevega do cvetličnega in vzorca gozdnega medu, vendar razlike v tem parametru med vzorci medu niso statistično značilne.
- Bolj kot je bil vzorec temen, višja je bila njegova električna prevodnost.
- Temnejši vzorec medu je vseboval več polifenolnih spojin in posledično imel tudi največjo antioksidativno učinkovitost. To potrjujejo tudi močne korelacije med spektrofotometrično določenimi parametri.

6 POVZETEK

Med je kompleksno živilo, ki ga v največji meri sestavljajo ogljikovi hidrati, predvsem glukoza in fruktoza, ter voda. V manjših količinah je prisotno tudi mnogo različnih bioaktivnih komponent, ki jih čebele v med prenesejo s tem, ko na rastlinah nabirajo nektar in mano. Med njimi so fenoli, flavonoidi, nekateri encimi, organske kisline, askorbinska kislina, proteini in aminokisline. Fenolnim spojinam zaradi antioksidativnega delovanja pripisujejo širok spekter fizioloških lastnosti, kot so protimikrobno, protivnetno, antialergeno, antitrombotično in antimutageno delovanje, zato je tudi med znan po antioksidativni učinkovitosti ter posledično ugodnih učinkih na zdravje (Alvarez-Suarez in sod., 2009; Bertonecelj, 2008; Juszczak in sod., 2016; Shahidi, 2002)

Namen diplomskega dela je bil določiti vsebnost skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in antioksidativne učinkovitosti treh vrst medu, ki smo jih pred analizami pripravili na tri različne načine. Želeli smo ugotoviti, ali priprava vzorca vpliva na rezultate meritev.

Analizirali smo tri vzorce medu različnega botaničnega izvora: akacijev, cvetlični in gozdni med. Določili smo jim osnovna kemijsko-fizikalna parametra – vsebnost vode in električno prevodnost. Antioksidante v medu smo določali s spektrofotometričnimi metodami. Pred tem smo vzorce za analizo pripravili na tri načine. Raztopili smo jih v 1) vodi, 2) 70 % etanolu in 3) izvedli ekstrakcijo na trdni fazi (SPE). Zadnji način priprave omogoči, da vzorcem odstranimo ogljikove hidrate in ostale moteče komponente.

Skupne fenolne spojine smo določili po Folin-Ciocalteujevi metodi, posamezne fenolne spojine – skupne flavonoide – pa s spektrofotometrično metodo ob uporabi z reagenta $AlCl_3$. Antioksidativno učinkovitost medu smo določili z metodo DPPH. Da bi preverili povezavo med barvo medu in vsebnostjo antioksidantov, smo vzorcem s kromametrom izmerili tudi barvo v sistemu Cie $L^* a^* b^*$.

Vrednosti fenolnih spojin in antioksidativne učinkovitosti so bile najnižje v vzorcu akacijevega medu, višje pri vzorcu cvetličnega ter najvišje pri vzorcu gozdnega medu. V enakem vrstnem redu je naraščala tudi električna prevodnost medov, svetlost vzorcev, L^* , pa se je zmanjševala. Temnejši vzorci medu oziroma vzorci z višjo električno prevodnostjo so vsebovali več polifenolnih spojin in posledično imeli višjo antioksidativno učinkovitost, kar potrjujejo tudi močne korelacije med parametri, določenimi spektrofotometrično.

Najpomembnejše ugotovitve se nanašajo na vpliv priprave vzorca. Pri spektrofotometričnih analizah se je pokazalo, da so vrednosti parametrov, izmerjene v vodnih ter etanolnih ekstraktih nerealno višje kot pri vzorcih, ki smo jih predhodno ekstrahirali na trdni fazi in ekstrakte raztopili v mešanici metanol/acetoneitril. Višje

vrednosti so posledica prisotnih sladkorjev in ostalih reducirajočih spojin, ki motijo analizo ter posledično lažno namigujejo na večjo vsebnost spojin z antioksidativno učinkovitostjo.

Spektrofotometrična metoda določanja flavonoidov se je z vidika priprave vzorcev izkazala za še posebej občutljivo. Potrebno je upoštevati absorbanco na račun barve medu, torej izračunati korekcijo barve. V primeru vodnih ekstraktov in enem etanolnem ekstraktu so bile absorbance raztopin medu in topila višje od absorbance glavnega vzorca, medtem ko je bilo pri vzorcih, ekstrahiranih na trdni fazi obratno in skladno s postopkom. To kaže na nezanesljivost rezultatov v primeru analize vodnih ekstraktov in ekstraktov v 70 % etanolu za to metodo, pomembno vlogo korekcije barve zaradi motečega delovanja obarvanih spojin v medu pri valovni dolžini 415 nm, ter ključno ugotovitev, da je primerno skupne flavonoide v medu s spektrofotometrično metodo določati le s predhodno ekstrakcijo na trdni fazi.

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da priprava vzorca vpliva na določanje antioksidativne učinkovitosti medu in tako potrdili zastavljeno hipotezo.

7 VIRI

- Aherne S. A., O'Brien N. M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, 18, 1: 75-81
- Alvarez-Suarez J. M., Tulipani S., Romandini S., Vidal A., Battino M. 2009. Methodological aspects about determination of phenolic compounds and *in vitro* evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review. *Current Analytical Chemistry*, 5: 293-302
- 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: 822-828
- Golob T., Jamnik M., Bertoncelj J., Kropf U., Kandolf A., Božič J., Zdešar P., Meglič M., Goljat A. 2011. Med: značilnosti slovenskega medu. Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 84 str.
- HunterLab. 1996. CIE L*a*b* color scale. HunterLab, Applications Note, 8, 7: 1-4
<http://cobra.rdsor.ro/cursuri/cielab.pdf> (julij, 2018)
- Juszczak L., Gałkowska D., Ostrowska M., Socha R. 2016. Antioxidant activity of honey supplemented with bee products. *Natural Product Research*, 30, 12: 1436-1439
- Lin J. K., Weng M. S. 2006. Flavonoids as nutraceuticals. V: *The science of flavonoids*. Grotewold E. (ur.). New York, Springer: 213-238
- Mann J. 1994. *Natural products: their chemistry and biological significance*. Essex, Longman Scientific & Technical: 455 str.
- Marais J. P. J., Deavours B., Dixon R. A., Ferreira D. 2006. The stereochemistry of flavonoids. V: *The science of flavonoids*. Grotewold E. (ur.). New York, Springer: 1-46
- Oroian M., Escriche I. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74: 10-36
- Pravilnik o medu. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21, 4: 345-347

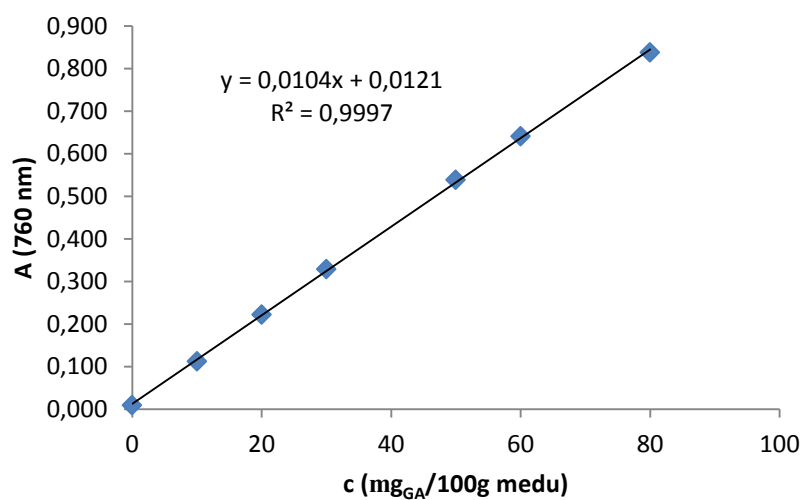
- Pyrzyska K., Biesaga M. 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 7: 893-902
- Sancho M. T., Pascual-Maté A., Rodríguez-Morales E. G., Osés S. M., Escriche I., Periche Á., Fernández-Muiño M. A. 2016. Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. *International Journal of Food Science and Technology*, 51: 30-36
- Shahidi F. 2002. Food phenolics and their role in antioxidation and health promotion. V: *Polyphenols Communications 2002, XXI International Conference on Polyphenols*, Marrakech-Morocco, September 9-12, 2002, Volume 1. El Hadrami I. (ur.). Bordeaux Cedex, Université Victor Segalen, Secrétariat du Groupe Polyphénols: 257-258
- Tuberoso C. I. G., Jerković I., Sarais G., Congiu F., Marijanović Z., Kuš P. M. 2014. Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE $L^*C^*_{ab}h^{\circ}_{ab}$ chromaticity coordinates. *Food Chemistry*, 145: 284-291

PRILOGE

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

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

Oznaka vzorca	c ($\mu\text{g}_{\text{GA}}/\text{ml}$)	A ₁	A ₂	A _{povprečna}
S0	0	0,010	0,008	0,009
S1	10	0,114	0,110	0,112
S2	20	0,221	0,223	0,222
S3	30	0,330	0,327	0,329
S4	50	0,539	0,537	0,538
S5	60	0,640	0,641	0,641
S6	80	0,840	0,835	0,838

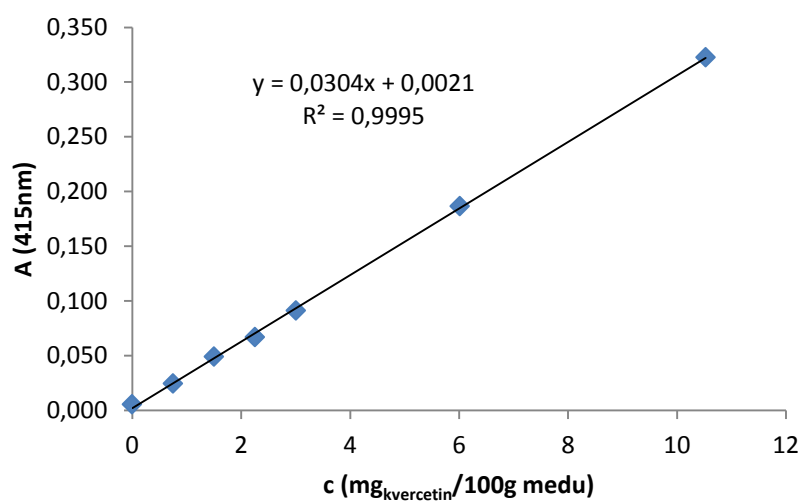


Priloga A2: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v medu

Priloga B: Podatki za umeritveno krivuljo določanja skupnih flavonoidov

Priloga B1: Podatki za umeritveno krivuljo določanja skupnih flavonoidov

Oznaka vzorca	c ($\mu\text{g}_{\text{GA}}/\text{ml}$)	A ₁	A ₂	A _{povprečna}
S0	0	0,006	0,005	0,006
S1	0,752	0,025	0,024	0,025
S2	1,504	0,048	0,050	0,049
S3	2,256	0,068	0,066	0,067
S4	3,008	0,093	0,089	0,091
S5	6,016	0,187	0,186	0,187
S6	10,528	0,324	0,321	0,323



Priloga B2: Umeritvena krivulja za določanje skupnih flavonoidov

Priloga C: Rezultati statistične analize: Pearsonovi koeficienti korelacij (r)

EKSTRAKCIJA	KORELACIJE (r)		
	AU – skupni fenoli	AU - flavonoidi	Skupni fenoli - flavonoidi
V vodi	0,942	/	/
V 70 % etanolu	0,973	/	/
Ekstrakcija na trdni fazi	0,989	0,663 (p > 0.05)	0,805