

OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

DETEKCIJA PARAMETROV IN AKTIVNIH KOMPONENT V MEDU

RAZISKOVALNO DELO

PODROČJE: KEMIJA

AVTORICI: Ivana Čačič, Alja Špec

RAZRED: 9.

MENTORJI:

Marko Jeran, raz. sod., *Kemijski inštitut Ljubljana*

Milena Žohar, prof., *OŠ Primoža Trubarja Laško*

dr. Eva Menart, univ. dipl. kem., *Kemijski inštitut Ljubljana*
Narodni muzej Slovenije

Laško, 2017

ZAHVALA

Na začetku bi se zahvalili najini *učiteljici kemije in biologije*, gospe **Mileni Žohar** za strokovno pomoč, spodbudne in prijazne besede že pred pričetkom dela ter tudi v času pisanja. Hvala, ker ste naju prenašali v poznih popoldanskih urah, ko sva bili že pošteno iztrošeni, in ste bili na voljo, kadar sva Vas potrebovali.

Posebno zahvalo namenjava gospodu **Marku Jeranu**, *raziskovalnemu sodelavcu* iz Kemijskega inštituta Ljubljana. Hvala za vse dolge telefonske pogovore, nasvete in konstruktivne kritike, ki so naju usmerile na pravo raziskovalno pot in so izboljšale kvaliteto raziskovalnega dela. Hvala Vam za vse prijazno izrečene besede in smeh, ki je bil spodbuda za nadaljnje delo.

Zahvala gre tudi *dr. Evi Menart*, ki naju je lepo sprejela v analizni laboratorij Kemijskega inštituta in nama pomagala pri laboratorijskem delu. Hvala Vam za čarobno prikazano analizo kemijo, ki je bila del vsebinskega sklopa našega sodelovanja.

Dragi mentorji, iz srca sva vam hvaležni, da ste bili del najine zgodbe, saj lahko s ponosom predstaviva najino prvo raziskovalno delo. Hvala.

Doc. dr. Katji Žmitek (Visoka šola za storitve, Ljubljana) in doc. dr. Igorju Pravstu (Inštitut za nutricionistiko), hvala za nekatere študije in vire informacij, ki so še dodatno obogatili najino delo.

Hvala *raziskovalcema* skupine gospoda Jerana, **Mavrinu Gašperšiču** in **Jaku Karševcu** za tehnično pomoč in nasvete pri nadaljnji izboljšavi.

Hvala tudi dragi *učiteljici*, gospe **Lidiji Toplišek** za lektorski pregled naloge in predloge za popravke.

Osnovni šoli **Primoža Trubarja Laško** in *ravnatelj*u gospodu **Marku Sajku** hvala za zagotovljen prostor, opremo in varnostna sredstva, ki so bila ključna za opravljanje eksperimentalnega dela v šoli.

Učiteljem 9.c razreda hvala za razumevanje in potrpežljivost, saj je najino delo potekalo včasih tudi ob rednih šolskih obveznostih. Hvala tudi sošolcem in sošolkam, ki so naju z zanimanjem spremljali skozi leto.

Navsezadnje hvala tudi najinima **družinama**, ki sta verjeli v najino delo in naju ob koncu naporenega dneva in delovnih „izletov” v Ljubljano pričakali z nasmehom.

Hvala vsem, ki ste nama na tej poti stali ob strani in naju vodili v pravo smer, veliko vas je ..., zato še enkrat **hvala!**

KAZALO

1. UVOD.....	8
1.1 METODE DELA.....	8
2. TEORETIČNI DEL.....	10
2.1 ČEBELE IN MED.....	10
2.1.1 IZVOR MEDU.....	11
2.2 ZGODOVINSKI ORIS MEDU.....	12
2.2.1 ZGODOVINA MEDU V SLOVENIJI.....	12
2.3 VRSTE MEDU.....	13
2.3.1 AKACIJEV MED.....	13
2.3.1 CVETLIČNI MED.....	13
2.3.3 LIPOV MED.....	13
2.3.4 KOSTANJEV MED.....	14
2.3.5 SMREKOV MED.....	14
2.3.6 GOZDNI MED.....	14
2.3.7 HOJEV MED.....	15
2.3.8 ŠKRŽATOV MED.....	15
2.4 KEMIJSKE LASTNOSTI IN SESTAVA MEDU.....	15
2.4.1 OGLJIKOVI HIDRATI.....	17
2.4.2 VODA.....	18
2.4.3 BELJAKOVINE IN AMINOKISLINE.....	19
2.4.4 ORGANSKE KISLINE.....	19
2.4.5 MINERALNE SNOVI.....	19
2.4.6 VITAMINI.....	20
2.4.7 HIDROKSIMETILFURFURAL.....	20
2.5 FIZIKALNE LASTNOSTI.....	21
2.5.1 GOSTOTA.....	21
2.5.2 VISKOZNOST.....	21

2.5.3 HIGROSKOPIČNOST	21
2.5.4 ELEKTRIČNA PREVODNOST	21
2.5.5 BARVA.....	22
2.5.6 KRISTALIZACIJA	22
2.5.7 OPTIČNE LASTNOSTI.....	23
2.6 PRAVILNIK O MEDU.....	23
2.7 UPORABA MEDU.....	27
2.8 METODE IN TEHNIKE DOLOČITEV KOMPONENT V MEDU	29
2.8.1 KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA	30
2.8.2 BIURETSKA REAKCIJA.....	30
2.9 SPEKTROFOTOMETRIJA	31
2.10 HIPOTEZA.....	33
3. EKSPERIMENTALNI DEL.....	34
3.1 UVOD K EKSPERIMENTALNEMU DELU.....	34
3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE	35
3.3 APARATURE IN INVENTAR	36
3.4 SINTEZA UMETNEGA MEDU.....	37
3.5 FEHLINGOVA REAKCIJA	37
3.6 TOLLENSOVA REAKCIJA	38
3.7 BIURETSKI TEST.....	38
3.8 KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA	38
3.9 SNEMANJE UV/VIS SPEKTROV.....	38
3.10 KVANTITATIVNA DOLOČITEV HMF S SPEKTROFOTOMETRIJO.....	39
4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	41
4.1 OPAŽANJA.....	41
4.2 REZULTATI FEHLINGOVIH REAKCIJ.....	42
4.3 REZULTATI TOLLENSOVE REAKCIJE.....	43
4.4 REZULTATI BIURETSKEGA TESTA	44

4.5 REZULTATI KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE.....	45
4.6 REZULTATI SNEMANJA SPEKTROV VZORCEV MEDU	45
4.7 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČITEV HMF S SPEKTROFOTOMETRIJO	46
5. ZAKLJUČEK.....	48
6. LITERATURA	50
7. DODATEK.....	54
7.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIČALIJ	54
7.2 UV/VIS SPEKTRI VZORCEV MEDU.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer čebele na delu (spletni vir, Slovenske novice).....	11
Slika 2: Struktura hidroksimetilfurfurala, HMF	20
Slika 3: Primer ksantoproteinske reakcije, kjer nastane kot produkt aromatska nitro spojina	30
Slika 4: Dokazni kompleks pri biuretski reakciji [16].....	30
Slika 5: Spektrofotometer, uporabljen pri raziskovalnem delu (fotografija last avtorjev)	32
Slika 6: Priprava vzorcev za meritev (fotografija last avtorjev).....	40
Slika 7: Vstavitev kivete v spektrofotometer (fotografija last avtorjev)	40
Slika 8: Vzorci sintez umetnega medu (fotografija last avtorjev).....	42
Slika 9: Vzorci med potekom Fehlingove reakcije (fotografija last avtorjev)	43
Slika 10: Vzorci med potekom Tollensove reakcije (fotografija last avtorjev).....	44

KAZALO TABEL IN GRAFOV

Graf 1: Primerjava spektrov vzorcev medu	45
Graf 2: Sintetični med iz glukoze in mlečne kisline pod mikrovalovi	57
Graf 3: Sintetični med iz glukoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji	57
Graf 4: Sintetični med iz saharoze in mlečne kisline pod mikrovalovi	58
Graf 5: Sintetični med iz saharoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji.....	58
Graf 6: Domači cvetlični med	59
Graf 7: Kupljeni cvetlični med.....	59
Graf 8: Domači mešani med.....	60
Graf 9: Kupljeni gozdni med	60
Graf 10: Sintetični med iz glukoze in citronske kisline pod mikrovalovi.....	61
Tabela 1: Kriterij sestave medu.....	17
Tabela 2: Rezultati HMF s spektrofotometrijo	46
Tabela 3: Varnostna opozorila kemikalij.....	56

POVZETEK

Raziskovalno delo opisuje lastnosti, ki so nosilci kakovosti in onesnaževanja okoljskega vira, iz katerega izhaja pašno območje čebel, od koder v nadaljevanju nastane med. Absorpcijski spektri analiziranih vzorcev medu so enakomerno padajoči, in sicer od 200 do 500 nm; svoj najvišji vrh dosežejo med 250 in 280 nm. Rezultati kvantitativnih določanj hidroksimetilfurfurala (HMF) se v naravnih vzorcih gibljejo pod mejo z zakonom določene vrednosti (40 mg/kg), k višji vrednosti pa v veliki meri prispevata povišana temperatura in emisija svetlobnega vira. Obdelava vzorca z mikrovalovi povzroči visoka povišanja HMF, kar je skladno z načeli mikrovalovne aktivacije. Dokazni testi na specifične komponente, prisotne v vzorcih, v veliki meri predstavljajo učinkovit pripomoček za predhodno dokazovanje omenjenih snovi, pomembnih za nadaljnji razvoj kvantitativne metode oz. tehnike.

KLJUČNE BESEDE: naravni med, sintetični med, zakonodaja, absorbanca, spektrofotometrija, hidroksimetilfurfural – HMF, dokazne reakcije

1. UVOD

Med je gosto tekoče, kristalizirano, naravno sladko živilo, ki ga izdelajo čebele. Med letanjem s cveta na cvet srkajo nektar, na listih in iglicah pa pobirajo mano. Svojo bero nosijo v panj, kjer medicino zgostijo in obogatijo z lastnimi snovmi. Odložena v satju dozori v med. Med zorenjem se saharoza spremeni v glukozo in fruktozo, ki ju naše telo lahko enostavno in hitro porabi [1].

Med raziskovalnim delom je bila opravljena kvalitativna in kvantitativna primerjava umetnega medu z naravnim medom in kupljenim na policah trgovin. Pri sintezi oz. pripravi umetnega medu sta bili uporabljeni dve vrsti sladkorja, to sta glukozo in saharoza. Testirali smo tudi vpliv dodatka različnih kislin na lastnosti nastalega medu. Delo smo opravili z dvema tehnikama segrevanja: klasični plinski gorilnik na mestni plin in mikrovalovni način. Z namenom detekcije komponent, ki jih vsebujejo različni vzorci medu, smo v prvem sklopu eksperimentalnega dela opravili dokazne reakcije in dokazovali prisotnost omenjenih komponent. Opravili smo Fehlingovo in Tollensovo reakcijo ter biuretsko in ksantoproteinsko reakcijo. S poglobljenimi meritvami smo opravili še merjenje *UV/VIS* spektrov vzorcev medu in detekcijo hidroksimetilfurfurala kot aktivne komponente.

1.1 METODE DE LA

Sinteze medu in dokazne reakcije smo izvajali v šolskem laboratoriju. Opremo in vsa delovna sredstva je zagotovila šola. Nekatere izmed uporabljenih kemikalij so bile strupene in tudi zdravju škodljive, zato smo z njimi ravnali v skladu s predpisi o tovrstnih snoveh. V laboratoriju smo imeli na voljo vsa zaščitna sredstva, pri samem delu pa smo upoštevali pravila za varno delo. Delo, ki je zahtevalo uporabo posebne tehnologije in opreme, smo izvajali v sodelovanju s Kemijskim inštitutom v Ljubljani. Tamkajšnje delo je nadzorovalo in usmerjalo tehnično osebje v sodelovanju z mentorji. S kemikalijami in z reagenti po uporabi smo prav tako ravnali v skladu z ustreznim pravilnikom.

1.2 POTEK RAZISKOVALNEGA DELA

Po pregledu baze podatkov in predhodnih raziskav na omenjenem raziskovalnem področju smo eksperimentalno delo razdelili v naslednje sklope:

I. Sinteza umetnega medu in vpliv nekaterih reagentov na končen produkt

II. Kvalitativni testi v organski kemiji

III. Snemanje spektrov vzorcev medu

IV. Detekcija hidrosimetilfurfurala (HMF) v vzorcih medu

2. TEORETIČNI DEL

2.1 ČEBELE IN MED

Po zoološki sistematiki spadajo čebele v razred žuželk. Za pridelavo medu, cvetnega prahu in voska je pomembna predvsem vrsta medonosnih čebel. Le-te živijo v visoko razvitih socialnih skupnostih z od 20.000 do 80.000 člani. Med njimi je ena matica, nekaj sto trotoev, ostalo pa predstavljajo nereproduktivne čebele delavke.

Surovino za med ali medicino (nektar ali mana) nabirajo čebele na rastlinah. Nektar izvira iz cvetov ali drugih izločkov živih rastlinskih delov, mana pa je izloček rastlin in žuželk, ki živijo na različnih delih rastlin [2].

Izločanje nektarja je odvisno od vrste rastline, tal, vremenskih razmer in podobno. Vsaka vrsta nektarja ima tipično vsebnost sladkorjev (saharoza, fruktoza, glukoza) v različnih medsebojnih razmerjih. Poleg sladkorjev vsebuje nektar še različne aminokisliline, nekatere elemente, organske kisline, vitamine, aromatične in fenolne sestavine ter barvila. Mana kot odvečni stranski produkt izločajo listne uši, kaparji in škržati. Od sladkorjev so v mani najbolj zastopani disaharidi. Mana vsebuje še elemente, aminokisliline, beljakovine, kisline, vitamine in podobno [3].

Čebele v mednem mešičku prenašajo približno 50 mg nektarja ali mane. Čebele delavke, ki se vrnejo s paše, svojo bero razdelijo panjskim čebelam. Ker je prinesena medicina zelo vodena, jo čebele s posebnimi gibi iztiskajo iz medne golše na konec svojega rilčka. Sladki sok se nekaj sekund suši na suhem in toplem zraku, nato pa ga vrnejo v medno golšo. Postopek večkrat ponovijo. Ob omenjenem čebele

medičino obogatijo z encimi. Encimi povzročijo pretvorbo sladkorjev, predvsem saharoze, v glukozo, fruktozo in druge enostavne sladkorje.



Slika 1: Primer čebele na delu (spletni vir, Slovenske novice)

Poleg omenjenega medičini dodajo še nekatere druge, čebelam lastne snovi. Ko je medičina že precej zgoščena in primerna za shranjevanje v satju, napolnijo čebele satne celice in jih zaprejo z voščenimi pokrovčki, ki preprečijo, da bi med vezal vodo iz zraka. Sledi proces zorenja. Fizikalno osnovo zorenja predstavlja izhlapevanje vode do končne vrednosti približno 18 g/100 g, biokemijsko zorenje je posledica še nadaljnjega delovanja prisotnih encimov na strukturo sladkorjev. Med je zrel, ko se vsebnost vode v njem zmanjša pod 20 g/100 g.

Pridelava medu poteka tako, da čebelar odvzema med tedaj, ko je medišče polno oziroma ko je med v medišču zrel. Praviloma ga točimo šele takrat, ko je vsebnost vode v medu 18,6% ali manj. To je včasih enkrat, včasih večkrat na leto, odvisno od vrste medovitih rastlin v naravi in medenja, ki je odvisno od vremenskih razmer [2].

Ljudje o medu mislijo, da je to sladka lepljiva masa, ki jo namažejo na kruh ali dodajo v čaj. Znanstveniki so našli novo lastnost medu: je eno najbolj vsestranskih živil, saj koristi otrokom, starejšim, športnikom, bolnikom in drugim [4].

2.1.1 IZVOR MEDU

Poznamo različne tipe medu glede na geografski in botanični izvor medičine, način pridobivanja in letni čas. Med je lahko poimenovan po rastlinah, na katerih so čebele

nabirale nektar oziroma mano, če so senzorične, fizikalno-kemijske in palinološke lastnosti medu temu ustrezne. Pravilnik o medu ta čebelji pridelek deli glede na izvor in način pridobivanja. Po izvoru ločimo med iz nektarja in med iz mane [5].

2.2 ZGODOVINSKI ORIS MEDU

Med je kot sladilo poznan po različnih delih sveta. V zgodovini je imel prav posebno vlogo, in sicer pri verskih dogodkih. Ker ima veliko vsebnost sladkorjev in majhno vsebnost aminokislin in lipidov ter vsebuje še vitamine in minerale, ima visoko hranljivo vrednost. Uporabljal se je tudi v zdravstvene namene, saj ima učinkovito antimikrobno delovanje. V prazgodovinskih časih je bil med glavni vir koncentrirane sladke snovi v prehrani ljudi. Stari Egipčani so med uporabljali pri pripravi začinjenega kruha, sladic in peciva ter pri pripravi piva in vina. Iz rimskih časov izvira nešteto receptov, v katerih je uporabljen med. V starodavni Grčiji pa so včasih ljudi, ki so umrli daleč od doma, ohranjali v medu.

Kot sredstvo z zdravilnim učinkom so ga uporabljali Indijanci in tudi Egipčani [6].

Med se v preteklosti ni uporabljal le kot sladilo, temveč je svoje mesto našel tudi v kozmetiki. V starem Egiptu je Kleopatra z medom ustvarila odlično obrazno masko. Znano je, da so truplo Aleksandra Velikega pripeljali v prestolnico Makedonije tako, da so ga shranili v medu in tako preprečili razkrajanje mrtvega telesa med potjo čez azijske puščave. Stari Rimljani in Grki so med uporabljali za konzerviranje mesa, predvsem divjačine [7].

2.2.1 ZGODOVINA MEDU V SLOVENIJI

Na Slovenskem je čebelarstvo prav gotovo najstarejša gospodarska dejavnost. Znanje o čebelah so naši predniki prinesli s seboj iz prvotne domovine, kjer jim je bila medica najslajša pijača. V slovenskih gozdovih so nadaljevali gozdno čebelarjenje in kmalu začeli udomačevati čebele. Samostani, cerkve in fevdalci so potrebovali veliko voska za sveče in tudi dosti medu za pripravo medice. Čebelarjenje je potekalo v koritih, ki so jih izdelali iz lesa. Iz omenjenega so pozneje nastali panji, kot jih poznamo še danes.

Čebelarjenje je opisoval že Valvasor, največji razcvet pa je slovensko čebelarstvo doživelo v 18. in 19. stoletju. Za slovensko čebelarstvo so značilne poslikane panjske končnice, ki so pri nas posebna ljudska umetnost. Najstarejša ohranjena končnica je iz leta 1758. Slovenci imamo tudi svojo čebelo – kranjsko sivko, ki se odlikuje po pridnosti, mirnosti in varčevanju s hrano. Čebela je že antičnemu človeku dala prvo sladko živilo in druge pridelke, kot so cvetni prah, matični mleček, propolis, vosek in čebelji strup [6].

2.3 VRSTE MEDU

2.3.1 AKACIJEV MED

Akacijev med je zelo tekoč, sladek, skoraj brez barve ali nežno rumen, odvisno od kraja pridelave. Točimo ga maja in junija. V Sloveniji razlikujemo akacijev med iz Prekmurja, Primorske in Belokranjsko-posavskega področja. Med seboj se razlikujejo po barvi in okusu. Kristalizira zelo počasi, saj vsebuje več fruktoze kot glukoze. Vsebnost mineralov je precej majhna, kar je značilno za nektarni med.

Običajno ga priporočajo sladkornim bolnikom in otrokom, znan pa je tudi po blagodejnih učinkih na delovanje ledvic in jeter ter lajšanju simptomov bolezni dihal in sečnega trakta ter stresa.

2.3.1 CVETLIČNI MED

Cvetlični med je aromatičen med svetlo do zlato rjave barve. Tipična aroma kaže na njegov izvor. Točimo ga od pomladi do jeseni. V Sloveniji je cvetličnega medu malo, ker kosijo travnike pred cvetenjem. Pod pojmom cvetlični med se prodajajo tudi mešani medovi akacije, lipe, kostanja in drugi. Tudi cvetlični med ne vsebuje dosti mineralov. Cvetlični med je predvsem uporaben pri lajšanju vnetja dihalnih poti in prehladih tako kot večina drugih vrst medu.

2.3.3 LIPOV MED

Lipov med je svetlo rumene barve z zelenosivim odsevom. Aroma je značilna za lipo, okus pa močan, malo pekoč in dolgotrajen. Lipov med iz mane kristalizira

počasi, iz nektarja pa hitro. Točimo ga v juniju in juliju. Največje področje lipe v Sloveniji je Tolminsko. Poleg omenjenega je nekaj lipovega medu tudi na Kočevskem, v Beli krajini, na Gorenjskem in Štajerskem. Po mineralni sestavi se v veliki meri ne razlikuje od akacijevega. Lipov med se običajno uporablja za lažje premagovanje prehladov, nespečnosti in nemirnosti, pomaga pa tudi pri astmi in bronhitisu.

2.3.4 KOSTANJEV MED

Kostanjev med je v tekočem stanju temno rjavkasto rdeč in včasih precej podoben smrekovemu medu, strjen pa je rjavkast in debelozrnat. Kristalizira počasi, ker vsebuje več fruktoze. Diši po pelinu in je bolj ali manj grenak, kar izvira iz zrn cvetnega prahu, ki jih je v omenjenem medu veliko. Točimo ga v juniju in juliju, zato je pogosto mešan z lipovim medom in posledično svetlejši in manj izrazitega okusa. Najbolj izrazito področje kostanjevega medu je ob Savi, jugovzhodno od Ljubljane. Kostanjev med izstopa po vsebnosti pepela in posledično vsebnosti rubidija, mangana in kalcija.

2.3.5 SMREKOV MED

Smrekov med je v tekočem stanju rjave barve z rdečim odsevom. Je precej gost z okusom po smoli. Kristalizacija poteka različno hitro. Točimo ga v juniju, redko pa pridelamo sortnega, saj je navadno pomešan s cvetličnim medom. Največ sortnega smrekovega medu v Sloveniji pridobimo v gorenjskih in štajerskih gozdovih. Vsebuje mnogo mineralov in terpene.

2.3.6 GOZDNI MED

Gozdni med je svetlo do temno rjave barve, aroma je močna, okus pa sladek, poln, prijeten in običajno močan. Kristalizacija je počasnejša, ker vsebuje več fruktoze, in navadno zajame vso količino. V Sloveniji ga točimo v juliju in avgustu. Ima največjo skupno vsebnost mineralnih snovi, med njimi zlasti mangana, železa in kobalta.

2.3.7 HOJEV MED

Hojev med je v tekočem stanju zelo temno rjave barve z zelenkastim odsevom, strjen pa sivorjav in nenavadno trd, vendar se to zgodi redko. Je milega, zelo prijetnega okusa z aromo po smoli in žganju. Točimo ga v poletnih mesecih, včasih pa hoja medi celo do konca septembra. V Sloveniji pridobimo največ hojevega medu v notranjskih in pohorskih gozdovih. Vsebuje več mineralnih snovi kot preostale svetlejše vrste [2].

2.3.8 ŠKRŽATOV MED

V zadnjem desetletju prejšnjega stoletja se je v našem okolju pojavil škržatov med. Medeči škržat (*Metcalfa pruinosa* say) je povzročitelj medenja, ki se je v zadnjih desetletjih pojavil na Goriškem. Njegova domovina sta Severna in Srednja Amerika. V okolici Trevisa v Italiji, blizu vojaškega oporišča, so ga opazili že leta 1979 in je najverjetneje pripotoval kot slepi potnik v vojaškem letalu. Leta 1990 se je pojavil ob Soči pri Novi Gorici. Tisto leto so čebele v Vrtojbi prinesle okrog 30 kg temnega medu nenavadnega okusa.

V nasprotju z ostalimi povzročitelji medenja je škržat polifag, kar pomeni, da so ga našli na več kot petdesetih vrstah rastlin. Najraje se je zadrževal na koprivi, robidi, rdečem drenu, amfori in drugih. Uvrščamo ga med rastlinske škodljivce, ker se je pojavil tudi na gojenih rastlinah. V svoji izvorni domovini ima škržat številne sovražnike, ki preprečujejo, da bi se čezmerno razmnožil.

V notranjosti Slovenije do leta 2000 ni bil najden [8].

V kasnejšem obdobju do danes v literaturi ne zasledimo veliko podatkov o prisotnosti medečega škržata. Tudi čebelarji v zadnjih letih škržatnega medu ne točijo več.

2.4 KEMIJSKE LASTNOSTI IN SESTAVA MEDU

Med je razmeroma koncentrirana vodna raztopina predvsem treh vrst ogljikovih hidratov: glukoze, fruktoze in saharoze, ki jih lahko spremljajo še drugi ogljikovi hidrati ter poleg njih v manjših količinah beljakovine, aminokisliline, encimi, organske kisline, vitamini, mineralne in aromatične snovi ter barvila. Ogljikovi hidrati, ki so od vseh

sestavin najmočneje zastopani, dajejo medu njegove najznačilnejše lastnosti, medtem ko ostale povzročajo individualne razlike v senzoričnih lastnostih med posameznimi vrstami medu [9].

Prikažimo nekatere pomembne kriterije, ki jih lahko vsebuje med.

1. Vsebnost sladkorja	Količina:
1.1 Vsebnost fruktoze in glukoze (vsota)	
- cvetlični med	najmanj 60 g/100g
- gozdni med, mešanica gozdnega in cvetličnega medu	najmanj 45 g/100g
1.2 Vsebnost saharoze	
- splošno	največ 5 g/100g
- akacija (<i>Robinia pseudoacacia</i>), lucerena (<i>Medicago sativa</i>), Menzies Banksia (<i>Banksia menziesii</i>), francoski kovačnik (<i>Hedysarum</i>), rdeči gumi (<i>Eucalyptus camadulensis</i>), leatherwood (<i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia maligani</i>), <i>Citrus</i> spp.	največ 10 g/100g
- sivka (<i>Lavandula</i> spp), boreč (<i>Borago officinalis</i>)	največ 15 g/100g
2. Vsebnost vlage	
- splošno	največ 20%
- resa (<i>Calluna</i>) in pekovski med splošno	največ 23%
- pekovski med in resa (<i>Calluna</i>)	največ 25%
3. Vsebnost v vodi netopnih snovi	
- splošno	največ 0,1 g/100g
- prešan med	največ 0,5 g/100g
4. Elektrolitska prevodnost	

- med, ki ni naveden spodaj in mešanica teh vrst medu	največ 0,8 mS/cm
- gozdni med, kostanjev med in mešanica obeh, razen tistih, ki so navedeni spodaj	največ 0,8 mS/cm
- izjeme: jagodovo drevo (<i>Arbutus unedo</i>), spomladanska resa (<i>Erica</i>), evkaliptus, lipa (<i>Tillia spp.</i>), jesenska resa (<i>Calluna vulgaris</i>), manuka (<i>lepotaspermum</i>), čajevec (<i>Melaleuca spp.</i>)	
5. Proste kisline	
- splošno	največ 50 miliekvivalentov prostih kislin v 1000 g
- pekovski med	največ 80 miliekvivalentov prostih kislin v 100 g
6. Diastazno število in vsebnost hidroksimetilfurfurala (HMF), določena po obdelavi in mešanju	
<i>a) Diastazno število (Schade lestvica)</i>	
- splošno, razen pekovskega medu	najmanj 8
- med z majhno naravno vsebnostjo encimov (npr. limonin med) in vsebnostjo HMF najmanj 15 mg/kg	najmanj 3
<i>b) HMF</i>	
- splošno, razen pekovskega medu	največ 40 mg/kg (kot to določa druga alineja točke a) iz prejšnje točke)
- med z deklariranim poreklom z območji s tropsko klimo in mešanica teh vrst medu	največ 80 mg/kg

Tabela 1: Kriterij sestave medu

2.4.1 OGLJIKOVI HIDRATI

Med vsebuje v povprečju okrog 40% fruktoze (F), 34% glukoze (G) in od 1 do 4% saharoze (S). Razmerje med njimi je odvisno od same vrste medu in encima invertaze,

ki pride v med delno že z medicino, večinoma pa iz izločkov čebeljih žlez. Invertaza cepi saharozo v invertni sladkor, to je mešanico glukoze in fruktoze [10].

Sladkorji so pokazatelji:

- izvora,
- kristalizacije in
- potvorjenosti medu.

Nektarni med vsebuje več monosaharidov (fruktoze in glukoze), manj disaharidov (saharoze in maltoze) in minimalno količino oligosaharidov. Med iz mane pa ima več oligosaharidov, predvsem melecitoze in rafinoze, in manj monosaharidov.

Kristalizacija je naraven pojav, ki je odvisen od razmerja med fruktozo in glukozo, razmerja med glukozo in vodo ter temperature in časa shranjevanja. Hitreje kristalizirajo tiste vrste medu, ki vsebujejo več glukoze kot fruktoze. Če je razmerje F/G med 1,0 in 1,2, med hitreje kristalizira, razmerje višje od 1,3 pa pomeni počasnejšo kristalizacijo. Akacijev med z razmerjem F/G od 1,4 do 1,7 tako zelo redko kristalizira. Nadalje velja, če je razmerje glukoza/voda nižje od 1,7, med ne kristalizira oziroma če je višje od 2,1, med kristalizira. Na stopnjo kristalizacije vpliva tudi vsebnost melecitoze, ki se v medu slabo topi in hitro kristalizira.

Potvorjenost medu lahko ugotovimo na podlagi povečane vsebnosti saharoze (nad 5%), ki naraste zaradi hranjenja čebel s sladkorno raztopino ali neposrednega dodatka sladkorja v med.

2.4.2 VODA

Za vsebnost vode v medu obstajata spodnja in zgornja meja. Spodnja je pomembna zaradi topnosti posameznih sestavin medu v vodi, zgornjo pa predpisuje *Pravilnik o medu* (2004). Le-ta dovoljuje največ 20% vode v medu. V naših klimatskih pogojih zrel med navadno te vrednosti ne presega in vsebuje v povprečju od 15 do 18% vode. Med z manjšo vsebnostjo vode je bolj viskozen, z večjo pa redkejši in bolj tekoč. Tak med je slabše obstojen in lahko prične vreti, če je kontaminiran z ozmofilnimi kvasovkami, ki

pretvarjajo ogljikove hidrate v medu v alkohol, kasneje pa v očetno kislino in ogljikov dioksid. Med vrhunske kakovosti sme vsebovati največ 18,6% vode.

2.4.3 BELJAKOVINE IN AMINOKISLINE

Med vsebuje običajno le malo beljakovin (0,2–0,3%). Glavni izvor beljakovin v medu je cvetni prah, nekaj pa jih pride tudi iz nektarja in mane. Več aminokislin imajo običajno medovi iz mane. Glavni aminokislini v medu sta prolin in fenilalanin. Obe sodelujeta pri nastajanju aromatičnih snovi v medu, koncentracija prolina pa je pomembna tudi pri ugotavljanju potvorjenosti medu.

2.4.4 ORGANSKE KISLINE

Med je kislilo živilo z vrednostjo pH med 3,2 in 5,5. Vsebuje številne organske kisline, med katerimi je najpomembnejša glukonska kislina, ki nastane pri encimski pretvorbi glukoze z encimom glukoza-oksidadaza. Najdemo še jabolčno, jantarno, očetno, mravljinčno, masleno, mlečno in oksalno kislino. Izvor naštetih kislin je medičina in čebela sama.

Kislost medu je povezana z njegovo stabilnostjo pred delovanjem mikroorganizmov in aromo. Medovi iz mane vsebujejo veliko mineralnih snovi in imajo navadno višjo vrednost pH. Posledično so manj kislega okusa, čeprav vsebujejo več kislin kot nektarni medovi.

2.4.5 MINERALNE SNOVI

V medu najdemo soli kalija, natrija, magnezija, kalcija, železa in druge. Njihova količina je odvisna od izvora in intenzivnosti čebelje paše ter se giblje med 0,02 in 1%. Najmanj jih je v nektarnih medovih, zlasti akacijevem, več pa v medovih iz mane.

V tesni povezavi s količino mineralnih snovi je električna prevodnost medu. Pri maninih medovih je zaradi večje vsebnosti mineralnih snovi višja, pri medovih iz nektarja pa nižja.

2.4.6 VITAMINI

V medu so prisotni predvsem v vodi topni vitamini, in sicer vitamini B-kompleksa in vitamin C. V med pridejo v glavnem s cvetnim prahom.

2.4.7 HIDROKSIMETILFURFURAL

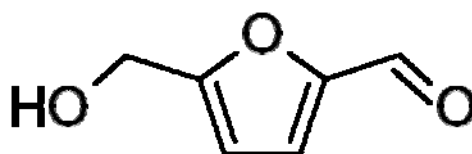
Hidroksimetilfurfural (HMF) je ciklični aldehid (5-hidroksimetil-2-furaldehid), ki nastaja pri razgradnji ogljikovih hidratov, predvsem fruktoze in glukoze, v kislem okolju medu.

HMF nastaja med kislinsko katalizirano dehidracijo heksoz in je povezan s kemijskimi parametri medu, kot so vrednost pH, vsebost skupnih kislin in vsebnost mineralov. Bogdanov in Gfeller navajata, da obstaja povezava med vrednostjo pH in HMF v medu. HMF se pri medu z nizko vrednostjo pH tvori hitreje kot pri vrstah medu z visoko vrednostjo pH [8].

Za analizo vsebnosti HMF v medu se uporabljajo različne metode, najpogostejše pa so spektrofotometrična metoda po Whitu, spektrofotometrična metoda po Winklerju in sodobna HPLC metoda.

V svežem medu ga praktično ni, njegova vsebnost ne presega 1 mg/kg. Večje količine se tvorijo med dolgotrajnim skladiščenjem, mnogo hitreje pa pri izpostavljenosti visokim temperaturam. HMF se zato uporablja kot kriterij svežosti oziroma pokazatelj pregretosti medu. Pravilnik dovoljuje največ 40 mg HMF v 1 kg medu, med vrhunske kakovosti pa ne sme presegati 10 mg/kg.

Tvorba HMF je odvisna od vrednosti pH v medu. V splošnem imajo nektarni medovi nižje, manini medovi pa višje vrednosti pH. Pri medu z nižjo vrednostjo pH se tvori HMF hitreje kot pri tistih z višjo vrednostjo pH [8].



Slika 2: Struktura hidroksimetilfurfurala, HMF

2.5 FIZIKALNE LASTNOSTI

2.5.1 GOSTOTA

Gostota je razmerje med maso in volumnom snovi in za med v povprečju znaša 1,422 g/cm³ pri 20 °C. Večja kot je vsebnost vode v medu, manjša je njegova gostota.

2.5.2 VISKOZNOST

Viskoznost je odvisna od vsebnosti sladkorjev, vsebnosti vode (večja je vsebnost vode, večja je viskoznost medu) in temperature. Z naraščanjem temperature narašča tudi viskoznost [2].

2.5.3 HIGROSKOPIČNOST

Higroskopnost je lastnost medu, da vsrka in zadržuje vlago oziroma vodo iz svoje okolice. S tehnološkega stališča je ta lastnost zelo pomembna. Če pride med v stik z atmosfersko vlago, jo absorbira in se tako razredči, da omogoča alkoholno vrenje kvasovkam. Študija Finola s sodelavci [11] navaja, da je med z vsebnostjo vode nad 21% podvržen fermentaciji osmofilnih kvasovk, s čimer se strinja tudi Božnar. Oba navajata, da je vsebnost vode v medu odvisna od časa pobiranja medu, klime in panja, Doner dodaja kot faktorja še moč čebelje družine in botanični izvor. Posamezne vrste sladkorjev različno vežejo vodo, fruktoza jo veže močneje kot glukoza. S poskusi so ugotovili, da med povprečne sestave pri temperaturi 20 °C veže vlago iz svoje okolice, če je te več kot 60%, oddaja pa vodo, če je relativna vlaga v zraku manjša od 60% [11].

2.5.4 ELEKTRIČNA PREVODNOST

Električna prevodnost medu je odvisna od koncentracije mineralov, organskih kislin, beljakovin, sladkorjev in poliolov, ki v vodni raztopini medu razpadejo na ione in tako prevajajo električni tok. Specifična električna prevodnost naravnega medu je zaradi visoke koncentracije sladkorjev, ki zmanjša gibljivost ionov, sorazmerno nizka in narašča z naraščajočo razredčitvijo medu v destilirani vodi. Maksimalno električno

prevodnost imajo raztopine medu z od 20 do 30% suhe snovi, saj je gibljivost ionov v taki raztopini optimalna. Vrednosti električne prevodnosti medu so lahko zelo različne in značilne za določeno vrsto medu. Torej nam merjenje električne prevodnosti medu omogoča kontrolo kakovosti oz. ugotavljanje potvorb naravnih vrst medu. Na splošno se električna prevodnost medu giblje med 0,1 in 2 mS/cm. Manin med in mešanica nektarnega in maninega medu imata višjo električno prevodnost od nektarnega zaradi večje vsebnosti elementov.

2.5.5 BARVA

Med ima zelo širok barvni spekter, od vodeno bele do temno rjave, skoraj črne. Barva svežega medu je odvisna od mineralne sestave in botaničnega izvora in je posledica barvil, ki jih vsebuje. To so predvsem karotenoidi in ksantofili. K barvi prispevajo tudi polifenoli in flavonoidi. Po kristalizaciji se med posvetli.

2.5.6 KRISTALIZACIJA

Nastanek in rast kristalov imenujemo kristalizacija. To je naravni pojav, ki je odvisen od vsebnosti sladkorjev v medu, količine vode, temperature, časa shranjevanja, prisotnosti kristalizacijskih jeder in postopkov pridobivanja medu. Hitreje kristalizirajo tiste vrste medu, ki vsebujejo več glukoze kot fruktoze. Če je razmerje med glukozo in fruktozo večje kot 1:1,5, med ostane zelo dolgo tekoč.

Na kristalizacijo medu vpliva tudi razmerje med glukozo in vodo v medu. Če to razmerje znaša 1,6:1, med še ne kristalizira; pri razmerju 2,16:1 že nastanejo mehka kristalizacijska jedra, kristali pa se oblikujejo pri razmerju 2,24:1. Najpogosteje začne kristalizirati pri 14 °C, vrste z več kot 18% vode pa pri nekoliko nižjih temperaturah.

Če želimo kristaliziran med utekočiniti (fazno spremeniti), ga segrejemo na 40 °C. Fazni prehod je reverzibilen, kar pomeni, da se lahko kristalizacija ponovno pojavi. Segrevanje medu negativno vpliva na kakovost medu, saj med potemni, v njem pa se uničijo nekatere biološko aktivne snovi.

2.5.7 OPTIČNE LASTNOSTI

Med suče ravnino polarizirane svetlobe (α). Ta lastnost je odvisna od sladkorjev v medu, vrste sladkorjev in relativnih razmerij. Na splošno velja, da je med iz nektarja levosučen (L), med iz mane pa desnosučen (D). Večina vrst medu iz nektarja vsebuje večjo količino fruktoze kot glukoze. Tako je takšen med levosučen, saj je fruktoza levosučna, glukoza pa desnosučna. Z omenjenim je izražena negativna vrednost specifične rotacije, $[\alpha]_D^{20}$. Vrste medu iz mane imajo bolj kompleksen spekter sladkorjev. Vsebujejo malo fruktoze in več glukoze. Vsebujejo tudi melecitozo ali erlozo, kar skupaj z glukozo povzroča pozitivno vrednost $[\alpha]_D^{20}$.

Merjenje optične rotacije lahko da koristne informacije o kakovosti in morebitni potvorjenosti medu, lahko pa služi zgolj določanju vrste medu [1].

2.6 PRAVILNIK O MEDU

1. člen (vsebina)

Ta pravilnik določa pogoje in merila za kakovost medu v skladu z Direktivo Sveta 2001/110/ES z dne 20. decembra 2001 o medu (UL L št. 10 z dne 12. 1. 2002, str. 47), zadnjič spremenjeno z Direktivo 2014/63/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 15. maja 2014 o spremembi Direktive Sveta 2001/110/ES o medu (UL L št. 164 z dne 3. 6. 2014, str. 1).

2. člen (definicija medu)

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

(2) Med mora glede sestave in lastnosti ustrezati merilom, določenim v 6. členu tega pravilnika in v Prilogi, ki je sestavni del tega pravilnika.

3. člen **(razvrščanje in poimenovanje medu)**

(1) Med se razvršča v glavne tipe in se poimenuje:

a) glede na izvor kot:

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

b) glede na način pridobivanja oziroma predstavitve kot:

- »med v satju«, ki ga čebele hranijo v novo zgrajenem satju brez zalege ali v tankih osnovnih ploščah satja iz čistega čebeljega voska in se daje v promet v celih pokritih satih ali kot del teh satov;
- »med s satjem« ali »deli satja v medu«, ki vsebuje enega ali več kosov satja v medu;
- »samotok« (odtočeni med), ki je pridobljen z iztekanjem medu iz odkritih satov brez zalege;
- »točeni med«, ki je pridobljen s centrifugiranjem odkritih satov brez zalege;
- »prešani med«, ki je pridobljen s stiskanjem satov brez zalege, z ali brez uporabe zmerne toplote, ki ne presega 45 °C, in
- »filtrirani med«, ki je pridobljen tako, da se pri odstranjevanju neznačilnih primesi odstrani tudi znaten del cvetnega prahu.

(2) Poleg medu iz prejšnjega odstavka poznamo tudi med, ki ga poimenujemo »pekovski med« in je primeren za industrijsko uporabo ali kot sestavina v drugih živilih, ki se nato predelajo. Pekovski med ima lahko neznačilen okus ali vonj ali začenja fermentirati oziroma je že fermentiral ali je bil pregret.

4. člen **(označevanje)**

(1) Med mora biti označen v skladu s predpisom, ki ureja splošno označevanje predpakiranih živil, in v skladu z naslednjimi pogoji:

1. izraz »med« se v prometu uporablja le za med iz 2. člena tega pravilnika;
2. v prometu se uporabljajo samo poimenovanja tipov medu iz prejšnjega člena. Ta imena se lahko nadomestijo s splošnim imenom »med«, razen za filtrirani med, med v satju, med s kosi satja ali kosi satja v medu in pekovski med, vendar:
 - a) mora biti pri pekovskem medu na označbi navedba »samo za kuhanje in peko« v neposredni bližini imena;
 - b) se, razen pri filtriranem medu in pekovskem medu, ime 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, fizikalnokemijske in mikroskopske lastnosti,
 - regionalno, teritorialno ali topografsko poreklo, če je med v celoti navedenega porekla,
 - posebna merila kakovosti;
3. če je bil pekovski med uporabljen kot sestavina v sestavljenem živilu, se lahko v imenu sestavljenega živila namesto imena »pekovski med« uporabi splošno ime »med«, če se v seznamu sestavin sestavljenega živila uporabi ime »pekovski med«;
4. država oziroma države porekla ali izvora, kjer je bil med pridelan, morajo biti navedene na označbi.

(2) Če je med po poreklu iz več kot ene države članice Evropske unije, tretje države ali oboje, se lahko oznaka države porekla ne glede na prejšnji odstavek nadomesti z eno izmed naslednjih oznak:

- »mešanica medu iz EU«;
- »mešanica medu, ki ni iz EU«;
- »mešanica medu iz EU in medu, ki ni iz EU«.

(3) Cvetni prah, ki je naravna sestavina, značilna za med, se ne šteje za sestavino proizvodov iz Priloge.

5. člen

(filtriran in pekovski med)

Pri filtriranem in pekovskem medu mora biti na transportnih kontejnerjih, posameznih enotah pakiranja in v trgovskih dokumentih jasno navedeno polno ime

medu, kot ga določata šesta alineja točke b) prvega odstavka 3. člena tega pravilnika in drugi odstavek 3. člena tega pravilnika.

6. člen

(sestava in lastnosti medu)

(1) Med je sestavljen v glavnem iz različnih sladkorjev, predvsem fruktoze in glukoze, in iz drugih snovi, kot so organske kisline, encimi in trdni delci, ki pridejo v med pri zbiranju. Med je lahko tekoč, viskozen ali delno do popolnoma kristaliziran. Barva, okus, vonj in aroma medu se razlikujejo glede na rastlinski izvor.

(2) Med, ki se daje v promet kot med ali je namenjen za uporabo v kateremkoli živilu, namenjenem za prehrano ljudi, ne sme vsebovati nobenih dodanih sestavin.

(3) Med mora biti brez neznačilnih primesi. Razen medu iz drugega odstavka 3. člena tega pravilnika, med ne sme imeti tujega okusa ali vonja, ne sme začeti fermentirati, njegova stopnja kislosti ne sme biti umetno spremenjena in ne sme biti izveden tehnološki postopek tako, da so naravni encimi bodisi uničeni, bodisi je znatno zmanjšana njihova aktivnost.

(4) Ne glede na šesto alinejo točke b) prvega odstavka 3. člena tega pravilnika medu ni dovoljeno odvzeti cvetnega prahu niti drugih za med značilnih sestavin, razen če je to neizogibno potrebno zaradi odstranjevanja tujih anorganskih ali organskih primesi.

7. člen

(ugotavljanje skladnosti)

Za ugotavljanje skladnosti medu se uporabljajo mednarodno priznane validirane in akreditirane metode.

8. člen

(prehodne določbe)

Med, proizveden in označen v skladu s Pravilnikom o medu (Uradni list RS, št. 31/04, 89/04 in 45/08 – ZKme-1) do uveljavitve tega pravilnika, je lahko v prometu do porabe zalog, vendar najpozneje do 1. januarja 2014*.

9. člen

(prenehanje veljavnosti)

Z dnem uveljavitve tega pravilnika preneha veljati Pravilnik o medu (Uradni list RS, št. 31/04, 89/04 in 45/08 – ZKme-1).

10. člen

(uveljavitev)

Ta pravilnik začne veljati petnajsti dan po objavi v Uradnem listu Republike Slovenije [12].

2.7 UPORABA MEDU

Med je izjemno zdrav, a te sladke tekočine ne mažemo le na kruh.

Navedimo nekatere aktualne aplikacije uporabe medu:

- namesto sladkorja raje izberimo med, vsebuje precej manj sladkorja,
- v hladnih dneh zjutraj posezimo po toplih čajih, oslajenih z medom,
- z medom lahko sladkamo tudi smutije, sveže sadje, uporabimo ga za slajenje limonade, primešamo ga jogurtu in podobno,
- med izboljša prebavo, je zaveznik imunskega sistem, niža holesterol, odpravlja zadah, proti zobobolu, blaži bolečine v sklepih in podobno,

- če imamo težave s spanjem, ga primešamo v mleko,
- v kozmetiki, za balzame ustnic, obrazne in lasne maske, kopeli, naravno zdravilo proti bradavicam,
- primeren je tudi za zdravljenje in blaženje ran, manjših opeklin, vnetij, pri aknah, brazgotinah in izpuščajih,
- za uravnavanje vrednosti belih in rdečih krvničk [10].

Med odsvetujejo nosečnicam, doječim materam in otrokom do 1. leta starosti, saj se v medu nahajajo sporne bakterije *Clostridium botulinum*, ki so lahko za omenjene občutljivejše skupine ljudi celo usodne [13].

Med ima tako raznolike zdravilne učinke, da ga lahko uporabljamo pri skoraj vsakršnih težavah, ki nas doletijo [14].

2.8 METODE IN TEHNIKE DOLOČITEV KOMPONENT V MEDU

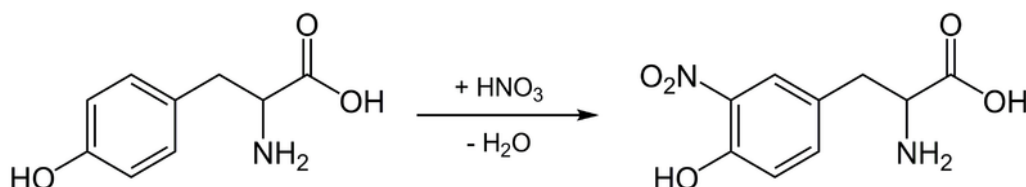
Raziskovalci so v okviru različnih naravoslovnih študij razvili mnoge metode in tehnike, ki temeljijo na kemijski detekciji in s katerimi lahko analizirajo prisotnost določenega analita v vzorcu.

S preprostim ročnim refraktometrom lahko izmerimo vsebnost prisotne vode v vzorcu [7], s polarimetrom specifični kot zasuka linearno polarizirane svetlobe skozi vzorec [5]. Sladkorje analizirajo tudi z drugimi analiznimi metodami in tehnikami, kot je HPAEC-PAD [11]. S pH metrom lahko izmerimo pH vrednost, detektiramo pa lahko tudi vsebnost prostih in skupnih (titrabilnih) kislin ter laktonov [5]. Kislost vzorca medu definirajo titrimetrično [11] kot tudi z nekaterimi naprednimi analiznimi protokoli, kot je AOAC 262.19 (1999) [5]. Električno prevodnost lahko izmerimo z laboratorijskim konduktometrom [7], vsebnost elementov pogosto opravljajo z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije s totalnim odbojem (TXRF) [5]. Vsebnost celokupnega pepela v medu se pogosto določa ob suhem sežigu pri 600 °C [7]. Velik sklop raziskav so raziskovalci posvetili razvoju spektrofotometričnih metod in njihovi aplikaciji na vzorce medu. S pomočjo spektrofotometrije je mogoče detektirati barve oz. merjenje spektrov, iz katerih lahko napovemo določen tip sestave vzorca [5]. Spektrofotometrično lahko detektiramo tudi hidroksimetilfurfural (HMF), metoda pa temelji na Winklerju [7]; danes ga je možno detektirati in kvantitativno določiti še z metodo HPLC [5]. Razvite so bile tudi mnoge spektrofotometrične metode encimske aktivnosti, kot so distaze po Schadeju [16] in invertezne aktivnosti [16]. Spektrofotometrično lahko detektiramo posledično tudi nastanek vodikovega peroksida in njegovo količino [7]. Vsem znana metoda določanja celokupnih beljakovin po Kjeldahu [11] služi tudi vzorcem medu. Dandanes lahko z različnimi metodami analiziramo tudi vsebnost posamezne aminokisliline, omenimo najbolj odmevno Oughovo fotometrično metodo, prilagojeno po Bogdanovu, ki služi za analizo prolina [8].

V nadaljevanju bomo predstavili in omenili nekatere metode in tehnike, ki smo jih uporabili tekom raziskovalnega dela.

2.8.1 KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

S ksantoproteinsko reakcijo dokazujemo beljakovine, ki vsebujejo aromatske aminokisliline (fenilalanin, tirozin in triptofan). Reakcija temelji na nitriranju aromatskega obroča, posledica česar je intenzivno rumeno obarvanje (nastanek aromatske nitro spojine) [15, 16].

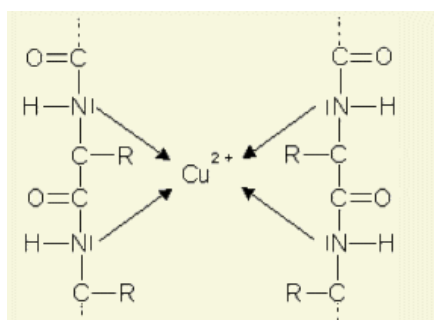


Slika 3: Primer ksantoproteinske reakcije, kjer nastane kot produkt aromatska nitro spojina

2.8.2 BIURETSKA REAKCIJA

Z biuretsko reakcijo dokazujemo prisotnost peptidne vezi, zato jo uporabljamo za dokazovanje beljakovin oz. peptidov. V srednjem alkalnem okolju se bakrov ion v biuretskem reagentu kordinativno veže z *NH*-skupinami peptidne vezi, kar vodi do nastanka koordinacijskih produktov. Zaradi nastanka slednjih se peptidni kompleks obarva modrovijolično. Ker je za potek biuretske reakcije potrebna prisotnost vsaj dveh peptidnih vezi v molekuli, s to metodo ne moremo določati aminokislin in dipeptidov.

Biuretska reakcija je uporabna tudi za kvantitativno (količinsko) določanje vsebnosti beljakovin, saj je intenziteta modrovijolične barve odvisna od števila peptidnih vezi, ki reagirajo z bakrovimi ioni, in posledično s tem tudi števila proteinskih molekul v vzorcu [17, 16].



Slika 4: Dokazni kompleks pri biuretski reakciji [16]

2.9 SPEKTROFOTOMETRIJA

Bistvo spektrometričnih metod je v interakciji analita z elektromagnetnim valovanjem. To je sestavljeno iz valovanja električnega in magnetnega polja, ki delujeta pravokotno eno na drugo in v vakuumu potujeta s hitrostjo svetlobe ter pri tem skozi prostor nosita energijo. Spektrometrijo delimo:

- glede na vrsto delcev, ki jih vzburjamo: *molekulska*, *atomska*;
- glede na vrsto interakcij: absorpcijska, *emisijska*;
- glede na uporabljeno valovno dolžino: *UV*, *IR* ...

V normalnih okoliščinah se večina atomov in molekul nahaja v osnovnem stanju, se pravi, da elektroni zasedajo mesta nižjih energijskih nivojev. Z dovajanjem svetlobne energije lahko povzročimo, da elektroni zunanjih orbital preidejo v nestabilno vzburjeno stanje, kjer se zadržijo le od 10^{-9} do 10^{-6} sekunde in nato energijo oddajo (emitirajo). Absorpcija nastopi, kadar nihanje svetlobe in elektronov preide v območje resonance, kar se zgodi v primeru tistih snovi, ki svetlobe določene valovne dolžine ne prepuščajo. Tako moramo za določitev analita vnaprej poznati njegov absorpcijski maksimum in zagotoviti ustrezno (izbrano) valovno dolžino. Govorimo o monokromatski svetlobi, ki je sestavljena iz ene same valovne dolžine.

Osnovna zakona praktične fotometrije sta Lambertov in Beerov zakon. Prvi pravi, da je intenziteta prepuščenega žarka, ki vstopa pravokotno na absorbirajočo snov, odvisna od dolžine poti. Beerov zakon pravi, da intenziteta prepuščenega žarka monokromatske svetlobe pri potovanju skozi raztopino eksponentno pojema z razdaljo. Če oba zakona združimo, dobimo Beer-Lambertovo enačbo oz. zakon, ki velja le za razredčene raztopine. Enačba podaja, da je zveza med absorbanco in koncentracijo spojine, ki absorbira elektromagnetno valovanje, linearna. Sicer je absorbanca odvisna od koncentracije raztopine, dolžine poti žarka skozi njo in molskega absorpcijskega koeficienta (molarna absorptivnost oz. ekstinkcijski koeficient) spojine.

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \times c \times b,$$

kjer je

A ... absorbanca,

I ... intenziteta prepuščenega žarka,

I_0 ... intenziteta vpadnega žarka,

ε ... molarna absorptivnost [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$],

c ... množinska koncentracija raztopine [mol L^{-1}] in

b ... premer kivete (dolžina poti žarka skozi raztopino) [mol L^{-1}].

Spektrofotometrija je ena najpogosteje uporabljenih instrumentalnih metod v analitiki, saj omogoča kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje preiskovane snovi, je zanesljiva in enostavna. V analitiki se predvsem uporablja vidno področje elektromagnetnega spektra (med 400 in 800 nm), saj to energijo absorbirajo številne naravne in sintetične organske spojine ter biološko pomembne snovi [2].



Slika 5: Spektrofotometer, uporabljen pri raziskovalnem delu (fotografija last avtorjev)

2.10 HIPOTEZA

Velike znanstvene študije poročajo o pomenu medu in prisotnih komponent, ki imajo pozitivne učinke na človeški organizem. Vse več pozornosti dandanes posvečamo raziskavi parametrov kakovosti medu, mnogokrat pa pozabljamo na tiste komponente, ki se lahko tvorijo skozi daljše časovno obdobje. S potrošniškega stališča je pomembno, da med ohrani svoje lastnosti tudi med skladiščenjem. Predvidevamo, da se skozi daljše časovno obdobje v medu tvori večja koncentracija komponent, katere so v višjem redu za človeka neugodne. Med omenjene sodi hidroksimetilfurfural (HMF). Na vsebnost slednjega predvidevamo, da imajo poleg postopkov skladiščenja vplive tudi nekateri pomembni zunanji dejavniki, kot je temperatura (tudi mikrovalovi).

Raziskovalno delo obravnava študijo pregleda realnih in modelnih primerov vzorcev medu, katero je mogoče uporabiti kot temeljni del vsakdanjega življenja pri ozaveščanju splošne javnosti.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 UVOD K EKSPERIMENTALNEMU DELU

Pri izvajanju eksperimentov je pomembno, da pazimo na čistost reagentov in aparaturo ter celotnega delovnega prostora. Nekateri reagenti so zdravju škodljivi in nevarni, zato je potrebno z njimi ravnati v skladu z navodili. Vse podrobnosti o kemikalijah so predstavljene v dodatku.

Pri sintezi umetnega medu smo tekom raziskovanja testirali različne parametre, za katere predvidevamo, da bodo spremenili lastnosti pripravljenega produkta. S pomočjo dokaznih reakcij in spektrofotometrične detekcije smo v nadaljevanju ugotavljali razlike med naravnimi in sintetičnimi vzorci medu. Tehniki izvedbe sinteze pri višji temperaturi sta bili klasično segrevanje s plinskim gorilnikom in aktualni mikrovalovni pristop.

Pri delu smo aktivno poleg »slepih« uporabljali še naslednje vzorce:

Vzorec 1: Kupljeni cvetlični med

Vzorec 2: Domači cvetlični med

Vzorec 3: Kupljeni gozdni med

Vzorec 4: Domači mešani med

Vzorec 5: Sintetični med (umetni med) iz saharoze in mlečne kisline pod mikrovalovi

Vzorec 6: Sintetični med (umetni med) iz saharoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja

Vzorec 7: Sintetični med (umetni med) iz glukoze in mlečne kisline pod mikrovalovi

Vzorec 8: Sintetični med (umetni med) iz glukoze in mlečne kisline pod pogoji klasičnega segrevanja

Vzorec 9: Sintetični med (umetni med) iz glukoze in citronske kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja

Vzorec 10: Sintetični med (umetni med) iz glukoze in citronske kisline pod mikrovalovi

Vzorec 11: Sintetični med (umetni med) iz saharoze in citronske kisline pod mikrovalovi

Vzorec 12: Sintetični med (umetni med) iz saharoze in citronske kisline pod mikrovalovi

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

FEHLINGOV REAGENT I

V 100 mL merilno bučko kvantitativno prenesemo 7,00 g bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata. Vsebino dopolnimo do oznake na merilni bučki, nato dobro premešamo.

FEHLINGOV REAGENT II

V 100 mL merilno bučko kvantitativno prenesemo 37,00 g kalij-natrijevega tartrata (soli vinske kisline) in 10,00 g natrijevega hidroksida (NaOH). Z destilirano vodo dopolnimo do oznake na merilni bučki in vsebino dobro premešamo.

TOLLENSOV REAGENT

V 60 mL destilirane vode raztopimo 30 mg srebrovega(I) nitrata(V), nato dodamo 25% raztopino amoniaka. Vsebino dobro premešamo.

BIURETSKI REAGENT

V 250 mL čašo zatehtamo 1,50 g bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata in 6,00 g kalij-natrijevega tartrata, dolijemo 150 mL 10,0% raztopine natrijevega hidroksida, vsebino kvantitativno prenesemo v 500 mL merilno bučko in dopolnimo do oznake z destilirano vodo. Vsebino dobro premešamo.

KSANTOPROTEINSKI REAGENT

Koncentrirana (65%) dušikova(V) kislina.

BARBITURNA KISLINA

Odtehtamo 500 mg barbiturne kisline in jo s 70 mL demiralizirane vode prenesemo v 100 mL merilno bučko. Raztopino damo v vodno kopel, da se popolnoma raztopi in ohladimo ter dopolnimo z destilirano vodo do oznake.

TOLUIDINSKI REAGENT

Odtehtamo 10,00 g *p*-toluidina in ga s počasnim segrevanjem na vodni kopeli raztopimo v 50 mL izopropanola (propan-2-ol). Skupaj z izopropanolom ga kvantitativno prenesemo v 100 mL merilno bučko in dodamo 10,0 mL ledocetne kisline, ohladimo in dopolnimo z izopropanolom do oznake na merilni bučki. Raztopino hranimo v temnem prostoru in je ne uporabljamo najmanj 24 ur.

3.3 APARATURE IN INVENTAR

APARATURE

Mikrovalovna pečica MIDEA, MG7016NP-BM

Klasični Bunsenov gorilnik s priborom za segrevanje

Tehtnica EB 6000D – Železniki

Precizna tehtnica Kern, PBS/PBJ

Analizna tehtnica Mettler Toledo, XPE

Hladilnik, tip: CS-42HAA

UV/Vis spektrofotometer Perkin Elmer, model Lambda 25

Električni kuhalnik EKP 2419/DK 2420, Clatronic

INVENTAR

- merilni valj, 200 mL, 2 kom.
- merilna bučka, 100 mL, 5 kom.
- erlenmajerica, 100 mL, 6 kom.
- čaša, 300 mL, 4 kom.
- čaša, 250 mL, 4 kom.

- čaša, 150 mL, 4kom.
- pipeta, 10 mL
- steklena palčka
- štoparica
- trinožnik
- keramična mrežica
- vžigalice

- epruveta, 34 kom.

3.4 SINTEZA UMETNEGA MEDU

100 g sladkorja (saharoza, glukoza) smo raztopili v 200 mL destilirane vode, ki smo jo predhodno segreti do 80 °C. Med mešanjem smo vsebini dodali 0,1 g mlečne kisline. Vsebino smo v čaši segrevali, dokler ni izparel izhodni volumen na polovično vrednost. Merimo čas uparitve in opazujemo dogajanje v reakcijski posodi.

Čas uparitve volumna na polovično vrednost smo izvedli na klasičnem sistemu za segrevanje kemijskih reakcij (Bunsenov gorilnik) in s pomočjo mikrovalovne pečice.

Če izvajamo postopek priprave medu z dodatkom citronske kisline, za isti postopek potrebujemo 15 mL destilirane vode, 25,0 g saharoze oz. glukoze in 1,0 g citronske kisline.

3.5 FEHLINGOVA REAKCIJA

V epruveto odpipetiramo 1 mL (viskozna tekočina) oz. damo 50 mg (trdni vzorci) vzorca medu, dodamo 1 mL reagenta Fehling I in 1 mL Fehling II. Vsebino dobro premešamo, segrevamo na vodni kopeli pri temperaturi 50 °C in opazujemo čas nastanka barvne spremembe.

Podoben postopek smo ponovili z mikrovalovi, le da ni bilo ustreznega termostataranja reakcijske raztopine.

3.6 TOLLENSOVA REAKCIJA

V epruveto odpipetiramo 1 mL (viskozna tekočina) oz. damo 50 mg (trdni vzorci) vzorca medu, dodamo 1 mL vodne (25%) raztopine amoniaka in 10 mg srebrovega(I) nitrata(V). Vsebino dobro premešamo, segrevamo na vodni kopeli pri temperaturi 50 °C in opazujemo čas nastanka barvne spremembe.

Podoben postopek smo ponovili z mikrovalovi, le da ni bilo ustreznega termostatiranja reakcijske raztopine.

3.7 BIURETSKI TEST

V epruveto odpipetiramo 1 mL (viskozna tekočina) oz. damo 50 mg (trdni vzorci) vzorca medu, dodamo 4 mL raztopine biuretskega reagenta. Ustje epruvete prekrijemo z zamaškom in dobro premešamo (pretresemo). Opazujemo nastanek dokaza biuretske reakcije.

3.8 KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

V epruveto odpipetiramo 1 mL (viskozna tekočina) oz. damo 50 mg (trdni vzorci) vzorca medu. Po kapljicah ob enakomernem mešanju vsebini dodajamo koncentrirano raztopino dušikove(V) kisline (največji celokupen dodatek: 0,50 mL). Vsebino po dodatku dobro homogeniziramo in opazujemo nastanek barvne spremembe.

3.9 SNEMANJE UV/VIS SPEKTROV

S kvantitativnim prenosom medu v demiralizirano vodo (*demi*-H₂O) smo pripravili 100 mL 2,5% raztopine. Vsebino smo dobro premešali, po potrebi sonicirali na ultrazvočni kopeli 5 minut. 2,00 mL pripravljene raztopine posameznega vzorca odpipetiramo v kvarčno kiveto (premer 1 cm) za merjenje spektra. Kiveto previdno vstavimo v komoro in s pomočjo računalniškega sistema pomerimo spekter v območju od 200 do 500 nm.

3.10 KVANTITATIVNA DOLOČITEV HMF S SPEKTROFOTOMETRIJO

Princip metode temelji na reakciji HMF s *p*-toluidinom in barbiturno kislino, kjer nastane rožnat reakcijski kompleks, ki mu izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 550 nm.

Postopek določitve:

Odtehtali smo 10,00 g medu in ga brez segrevanja raztopili v analitski reagenčni posodici v 20 mL demiralizirane vode. Raztopino smo kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko in razredčili z demiralizirano vodo do oznake na merilni bučki. Vsebino smo na koncu dobro premešali.

S pipeto smo odmerili 2,00 mL zgoraj omenjene raztopine medu in jo prenesli v vsako od dveh epruвет ter dodali 5,00 mL raztopine *p*-toluidina. V eno izmed epruвет smo s pipeto odmerili 1,00 mL raztopine barbiturne kisline ter vsebino dobro premešali. Epruветo, v katero smo dali demiralizirano vodo (2,00 mL), smo uporabili kot »slepi« vzorec. Reagente smo dodajali brez prekinitve dve minuti. Ko je intenziteta barve dosegla svoj maksimum (4 minute), smo odčitali absorbanco pri 550 nm v 1 cm kvarčni kivetih.

Meritve ponovimo za vsak vzorec posebej, in sicer v šestih paralelnih določitvah, iz katerih podamo povprečno vrednost.

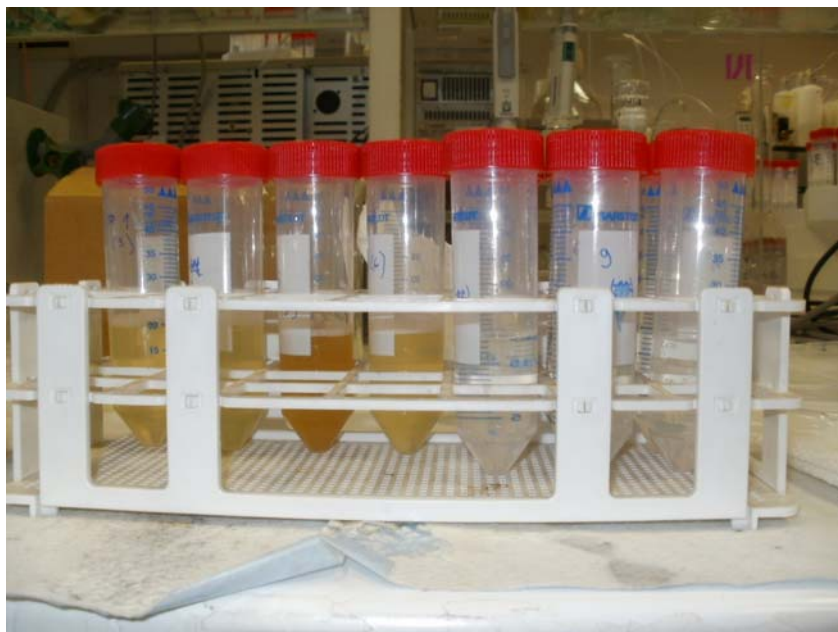
Kvantitativno vsebnost HMF v vzorcu medu izračunamo po znani in normirani zvezi, katero predstavlja naslednji obrazec:

$$\text{Vsebnost HMF v medu [mg/kg]} = (A_{vz} - A_{sl}) \times 192, \text{ kjer je}$$

A_{vz} ... izmerjena absorbanca raztopine vzorca,

A_{sl} ... izmerjena absorbanca »slepega« vzorca.

Po oceni aktualnega pravilnika in zakonodaje o medu vsebnost HMF v vzorcu *ne* sme presegati 40 mg/kg.



Slika 6: Priprava vzorcev za meritev (fotografija last avtorjev)



Slika 7: Vstavitev kivete v spektrofotometer (fotografija last avtorjev)

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 OPAŽANJA

Pri sintezah umetnega medu smo lahko jasno opazovali potek sinteze in nazorno dogajanje v reakcijski posodi tekom segrevanja. V trenutku, ko se reakcijska zmes začne koncentrirati, opazimo nastanek viskozne tekoče faze. Skozi daljše časovno območje segrevanja z mikrovalovi vsebina pridobi črni odtenek, aktivira pa se proces hitre kristalizacije. Pod klasičnimi pogoji na vodni kopeli s plinskim gorilnikom je potek povsem nadzorovan in ne privede do povečanega temperaturnega preskoka v reakcijski posodi. Sintetični med, pripravljen z izbranimi sladkorjema in s citronsko kislino, po 24-ih urah spontano kristalizira, medtem ko pri uporabi mlečne kisline povsem ohrani svoj viskozen videz. Kristali medu na osnovi citronske kisline so beli in kompaktni, saj jih je težko spontano streti.

Z dokaznimi reakcijami, s katerimi dokazujemo prisotnost ciljnih komponent v vzorcih, na podlagi kvalitativnega opazovanja intenzivnosti barvnega dokaza sklepamo na višjo oz. nižjo vsebnost prej imenovanih snovi. Delo je potekalo hitro in enostavno, saj so barvne spemembe odlični pokazatelji za tovrstno opazovanje.



Slika 8: Vzorci sintez umetnega medu (fotografija last avtorjev)

4.2 REZULTATI FEHLINGOVIH REAKCIJ

Izmed zgoraj omenjenih vzorcev je Fehlingova reakcija najbolj uspela pri vzorcih na osnovi glukoze. Kot je znano, dokaz uspe pri enostavnih sladkorjih (monosaharidih). Intenziven dokaz smo opazili pri kemijsko čisti glukozi (definicijski vzorec), sintetičnem medu iz glukoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja, domačem cvetličnem medu, kupljenem cvetličnem medu, domačem mešanem medu in kupljenem gozdnem medu. Vzorci so se obarvali intenzivno rumeno, nekateri tudi intenzivno oranžno (kupljeni gozdni med).

Rezultat selektivnih dokazovanj je bil očiten, saj disaharidi niso tvorili spremembe barvnega dokaza. Rezultat testa je enak »slepemu« poskusu samega Fehlingovega reagenta.



Slika 9: Vzorci med potekom Fehlingove reakcije (fotografija last avtorjev)

4.3 REZULTATI TOLLENSEOVE REAKCIJE

Opazili smo, da je pri vzorcu umetnega medu iz saharoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja najmanjša prisotnost aldehydov in ketonov. Tvorba dokaza se je izrazila v rahlo sivem odtenku. V vzorcu umetnega medu iz glukoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja je prisotnost aldehydov večja kot drugod, barva reakcijske mešanice je očitno sivega videza. Srednje intenzivni barvni odtenek smo zaznali pri vzorcu domačega cvetličnega medu, kjer je bil barvni prehod očitno, intenziteta barvnega dokaza pa najmočnejša. Ostali analizirani vzorci so bili po intenzivnosti barvnega dokaza glede na »slepi« vzorec (*raztopina amoniaka in srebrovega(I) nitrata(V)*) na srednjem rangu stopnje dokaza.



Slika 10: Vzorci med potekom Tollenske reakcije (fotografija last avtorjev)

4.4 REZULTATI BIURETSKEGA TESTA

Rezultati biuretskih testov se po pričakovanjih niso pokazali v izrazitem odtenku, saj pri delu nismo imeli direktnega opravka z beljakovinskimi vzorci. Kot je znano, se tvori dokaz z bakrovimi(2+) ioni in *NH*-skupinami peptidne vezi. Bakrov ion se lahko preko t. i. koordinacijske vezi poveže s spojinami, ki imajo v svojo strukturo vključene elemente s prostim elektronskim parom (kisik, dušik, torej *N*- in *O*- vsebujoči ligandi), strokovno temu pravimo ligandi. Pri vzorcih domačega in kupljenega medu smo opazili rahel barvni odtenek. Ker gre za realni vzorec naravnih virov, je rezultat minimalnega barvnega odtenka opravičen. Čebelji med vsebuje mnogo organskih spojin, katere bi imele potencialno sposobnost tvorbe koordinacijskega produkta. Ker gre v omenjenem primeru za produkt, tvorjen v nizkih koncentracijah, bi bilo potrebno za dodatno potrditev izbrati ustrezno detekcijsko tehniko, ki bi kvantitativno ovrednotila omenjen dokaz.

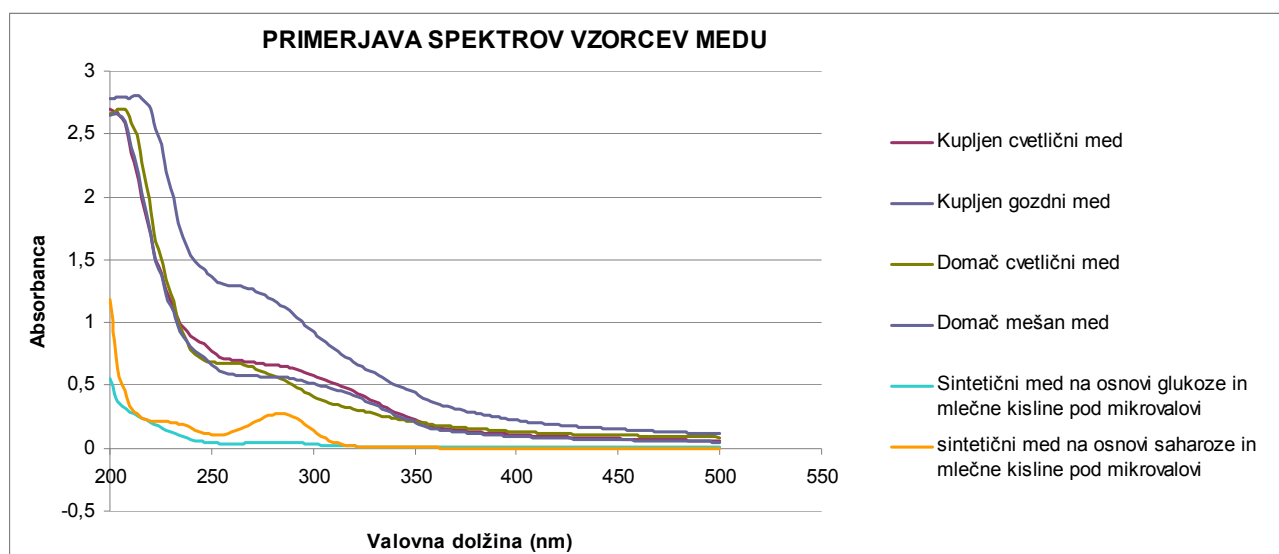
4.5 REZULTATI KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE

S ksantoproteinsko reakcijo smo testirali vsebnost beljakovin, ki vsebujejo aromatske aminokislino. Pričakovali smo, da se bodo realni vzorci obarvali intenzivno rumeno. Izmed vseh testiranih vzorcev je najvišji barvni odtenek pokazal vzorec domačega mešanega medu, preostali domači oz. kupljeni pa znatno manj oz. skoraj nič. Po pričakovanih vzorci sintetičnih medov niso pokazali obarvanja.

Ker gre za delo z realnimi vzorci medu, je bila najverjetneje v vzorcu prisotna kakšna proteinska komponenta z vsebovanimi aromatskimi obroči, da se je tvoril ustrezen dokaz. V realnem vzorcu gre torej za mešanico spojin (predvsem naravnih), ki lahko kemijsko reagirajo in tvorijo kompleksne produkte. Tudi v omenjenem primeru gre za prisotnost nizkih koncentracij oz. količin reagirajoče snovi.

4.6 REZULTATI SNEMANJA SPEKTROV VZORCEV MEDU

Kot je bilo že omenjeno, smo snemali *UV/VIS* spektre v območju od 200 do 500 nm. Kot glavni rezultat meritev podajamo naslednji graf, na katerem je prikazana primerjava domačega in kupljenega medu ter naravnega in sintetičnega vzorca medu. Preostali merjeni spektri se nahajajo v dodatku (poglavje 7.2).



Graf 1: Primerjava spektrov vzorcev medu

Iz grafa je razvidno, da se sintetični med razlikuje od naravnega; razliko opazimo predvsem v prvem delu spektra. Očitno razliko zaznamo tudi med sintetičnim medom z enako kislinsko in različno sladkorno komponento, to je iz glukoze in tistim iz saharoze. Med s saharoznim vključkom zavzema najvišji absorpcijski vrh pri 280 nm.

Spektri naravnega medu so si med seboj povsem identični. Od vseh obravnavanih in posnetih spektrov se očitno razlikuje kupljeni gozdni med.

4.7 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČITEV HMF S SPEKTROFOTOMETRIJO

Rezultate kvantitativnih določitev hidrosimetilfurfurala (HMF) v študiranih vzorcih medu podaja naslednja tabela.

<i>Vzorec</i>	<i>Vsebnost HMF [mg/kg]</i>
Kupljeni cvetlični med	27,08
Domači cvetlični med	13,80
Kupljeni gozdni med	24,19
Domači mešani med	27,95
Sintetični med iz saharoze in mlečne kisline pod mikrovalovi	21,28
Sintetični med iz saharoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja	9,17
Sintetični med iz glukoze in mlečne kisline pod mikrovalovi	11,57
Sintetični med iz glukoze in mlečne kisline pod pogoji klasičnega segrevanja	9,71
Sintetični med iz glukoze in citronske kisline pod klasičnimi pogoji segrevanja	43,41
Sintetični med iz glukoze in citronske kisline pod mikrovalovi	58,23

Tabela 2: Rezultati HMF s spektrofotometrijo

Rezultati kvantitativnih vsebnosti HMF v analiziranih vzorcih medu so v skladu s pričakovanji, katera smo si zadali. Rezultati vsebnosti hidroksimetilfurfurala kažejo, da z načinom segrevanja njegov nastanek samo še povečujemo. Rezultati sintetičnih vzorcev medu jasno pokažejo, da glede na potek reakcije pod mikrovalovi omogočajo nastanek večjih količin HMF v primerjavi s pripravo pod klasičnimi pogoji segrevanja. Dejstvo je povsem pričakovano, saj reakcije pod pogoji mikrovalov niso temperaturno kontrolirane in tečejo le v smer najbolj stabilne oblike produkta oz. se le-ta pretvori v bolj stabilno stanje. Srednjo raven vrednosti so dosegali vzorci naravnih medov (kupljeni, domači). Vrednost HMF $>10 \text{ mg/kg}$ se je pojavila pri omenjenih vrstah medu, saj je med v domačem oz. trgovinskem okolju skladiščenja stal na sobni temperaturi in svetlobi, za kar mnoge znanstvene raziskave potrjujejo razvoj nastanka omenjene komponente. Pri sobnih pogojih na nastanek HMF in njegovo povečanje vplivata predvsem temperatura skladiščenja, čas (staranje) in svetlobni vir. Pokazali smo tudi, da je med zaželeno shranjevati v temnih prostorih.

5. ZAKLJUČEK

Pred začetkom raziskovalnega dela in po pregledani aktualni literaturi smo si postavili hipotezo, ki nas je skozi celotno delo vodila in nam dajala smernice raziskovanja.

Zastavljeno hipotezo lahko v celoti potrdimo. Z dokaznimi reakcijami lahko učinkovito spremljamo oz. nadzorujemo prisotnost nekaterih komponent v vzorcih medu. Izkazale so se celo občutljive za naravne vzorce medu, pri tem izpostavimo biuretsko in ksantoproteinsko reakcijo. Če bi želeli določiti še nižje koncentracije komponent realnih vzorcev, bi morali poseči po bolj občutljivih detekcijskih (analiznih) sistemih.

Vzorcem medu smo določili oz. posneli *UV/VIS* spektre. Merjenje spektralnih lastnosti medu je hitro in enostavno, pomembno pa je za identifikacijo kakovostne stopnje medu. Spektralne lastnosti medu nam omogočijo tudi spremljanje onesnaženja oz. prisotnosti kontaminacij v okolju, iz katerega izhaja analiziran vzorec. Z vidika sestave medu je opazna prisotnost določenih vrst okužb v okviru območja, na katerem čebele pridobivajo med. Absorpcijski spekter medu je preprost in enakomerno padajoč za območje valovnih dolžin med 200 in 700 nm. Omenjeno dejstvo smo tudi sami pokazali. Vrh spektra, glede na posnete vzorce, se pojavi pri valovni dolžini med 250 in 280 nm.

Zadnji del raziskovalnega dela smo posvetili kvantitativnemu določanju hidroksimetilfurfurala (HMF) s spektrofotometrijo. Znano je, da se med skladiščenjem vzorci medu speminjajo, tako njihove senzorične lastnosti kot hranilne vrednosti. Nekateri raziskovalne skupine so vzorce medu izpostavile celo temperaturam >50 °C in analizirale vsebnosti komponent, katere so v določenem temperaturnem območju prisotne ali pa so nastale. Znano je tudi, da HMF v svežem medu ponavadi

ni prisoten, skozi daljše časovno obdobje pa nastopi proces nastajanja. Toplotno obdelavo medu smo spremljali s sintezo umetnega medu, in sicer z dvema tehnikama segrevanja. Pod mikrovalovi pokažemo, da vrednosti HMF naraščajo zaradi nekontroliranih efektov. Tako smo se bolj približali študiji raziskovalcev, ki so analizirali aktivne komponente nad 50 °C. Tehnika klasičnega segrevanja s sledljivo temperaturno skalo daje nižje vsebnosti tvorjenega HMF, kar je razvidno iz preglednice opravljenih meritev. Analizirani naravni med (kupljeni, domači) ni presegal kriterija zakonodaje o medu, relativno visoke in za človeka neusodne vrednosti povezujemo s skladiščenjem vzorca na polici skozi daljše časovno obdobje in s prisotnostjo svetlobnega vira. Iz omenjenega lahko povzamemo, da so steklene embalaže primerne ravno iz navedenega vidika, saj pri kovinskih vsebnikih v vzorec vstopijo še dodatne kovinske komponente oz. v splošnem material, iz katerega je vsebnik zgrajen (tudi plastika). Nizko koncentracijo pojava HMF v medu pa zagotovimo s skladiščenjem medu v temnih prostorih.

Raziskovalno delo nas je še dodatno motiviralo za nadaljnjo študijo, saj smo pri raziskovanju poleg osvojenih novih metod in tehnik osvojili še povezavo pridobljenih rezultatov z vsakodnevnim življenjem. Menimo, da je tovrstni pristop tisti, ki nas lahko v veliki meri ozavesti in usmeri k bolj kakovostnemu življenju. V naslednji stopnji se bomo povezali z aktualnimi strokovnjaki za tovrstno področje in rezultate nadgradili še na drugih vzorcih in predvsem razvoju novih metod za določanje nizkih koncentracij komponent, prisotnih oz. tvorjenih v vzorcih medu.

6. LITERATURA

[1] Čebelarska zveza Slovenije | Med. Dostopno na URL naslovu: <http://www.czs.si/content/C21> [3. 11. 2016, 15:55 uri]

[2] Susman, Š., Primerjava parametrov kakovosti pristnega in potvorjenega medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2011, Ljubljana

[3] Dostopno na URL naslovu: <http://www.czs.si/Files/promocija31.pdf>
[3. 11. 2016, 15:37 uri]

[4] Med – zdravo darilo z neba | Bodi eko. Dostopno na URL naslovu: <https://www.bodiekko.si/med-in-njegove-zdravilne-lastnosti> [3. 11. 2016, 15:45 uri]

[5] Grešak, M., Določanje vrstne značilnosti medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2008, Ljubljana

[6] Lilek, N., Karakterizacija slovenskega lipovega, smrekovega, hojevega in gozdnega medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2008, Ljubljana

[7] Zdravilna moč medu – Lepota in zdravje – Lisa.si – Za vse, ki radi uživajo življenje. Dostopno na URL naslovu:

<http://www.lisa.si/lepota-in-zdravje/zdravilna-moc-medu/> [3. 11. 2016, 16:12uri]

[8] Knego, A., Vpliv pogojev skladiščenja na vsebnost HMF v medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2012, Ljubljana

[9] Ovčec, S., Encimska aktivnost medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2007, Ljubljana

[10] Veste, kaj jeste? RTV Slovenija, 2. november 2016, Dostopno na URL naslovu:

<http://4d.rtvlo.si/arhiv/veste-kaj-jeste/174434990> [3. 11. 2016, 16:55 uri]

[11] Kasenburger, P., Vsebnost sladkorjev ter prostih in skupnih kislin v različnih vrstah slovenskega medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2006, Ljubljana

[12] 1340. Pravilnik o medu, stran 3611, Uradni list. Dostopno na URL naslovu:

<https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2004-01-1340?sop=2004-01-1340> [3. 11. 2016, 16:25 uri] (*- aktualni, trenutno veljavni pravilnik, po zadnjih navedbah).

[13] Presenetljivi zdravilni učinki meda | Ženska.si. Dostopno na URL naslovu:

<http://zenska.hudo.com/zdravje/zdravo-zivljenje/presenetljivi-zdravilni-ucinki-meda/>

[3. 11. 2016, 15:56 uri]

[14] Med in njegovi zdravilni učinki, zdravje.online. Dostopno na URL naslovu:

<http://zdravje.online/med> [3. 11. 2016, 16:05 uri]

[15] E-kemija z biologijo – Dokazovanje beljakovin – ksantoproteinska reakcija. Dostopno na URL naslovu:

<http://www.druga.org/Video/kemija/KemijaInHrana/Dokazi/Ksantoproteinska/index.html> [7. 12. 2016, 14:35 uri]

[16] Jeran, M., Žohar, M., Trobec, M., Kvalitativna uporaba biuretske, ksantoproteinske in ninhidrinske reakcije v šolskih laboratorijih, *Kemija v šoli in družbi*, dec., 2014, 26, 4, 13–18.

[17] Zabret, A., Razsikava uporabe biuretskega reagenta in ksantoproteinske reakcije za dokazovanje proteina v radikalnih vzorcih, *Raziskovalno delo*, OŠ Primoža Trubarja Laško, 2013, Laško

[18] Veselič, I., Nekateri kriteriji za določanje vrste medu, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2006, Ljubljana

[19] Slika 1: Čebela. Dostopno na URL naslovu: http://www.slovenskenovice.si/sites/slovenskenovice.si/files/styles/s_1280_1024/public/2014/11/07/cebela.jpg?itok=hbsYTtpc [7. 12. 2016, 10:35 uri]

[20] Slika 2: Ksantoproteinska reakcija. Dostopno na URL naslovu: <http://www.druga.org/Video/kemija/KemijaInHrana/Dokazi/Ksantoproteinska/02.png> [7. 12. 2016, 17:35 uri]

[21] Slika 3: Biuretska reakcija. Dostopno na URL naslovu: <http://www.druga.org/Video/kemija/KemijaInHrana/Dokazi/Biuretska/04.png>








[1. 2. 2016, 19:35 uri]

[22] Tabela 1: Kriterij sestave medu. Dostopno na URL naslovu: https://www.uradni-list.si/files/2004/RS_-2004-031-01340-OB~P001-0000.GIF [12. 12. 2016, 21:47 uri]

7. DODATEK

7.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ

Ime kemikalije	Formula	M(g/mol)	Piktogram	H-stavki	P-stavki	CAS
Bakrov(II) sulfat(VI) pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	249,68	 A diamond-shaped pictogram with a red border containing a black exclamation mark, and another diamond-shaped pictogram with a red border containing a black silhouette of a dead tree and a dead fish.	H315- H302- H319- H410	P302-P352-P273- P305+P351+P338	7758-99-8
Kalij-natrijev tartarat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	282,23	/	/	/	6381-59-5
Natrijev hidroksid	NaOH	40,00	 A diamond-shaped pictogram with a red border containing a black silhouette of two hands being corroded by liquid dripping from test tubes.	H290- H314	P301+P330+P331+P 280- P305+P351+P338	1310-73-2
Srebrov(I) nitrat(V)	AgNO_3	169,87	 Three diamond-shaped pictograms with red borders: a black silhouette of a dead tree and fish, a black silhouette of two hands being corroded by liquid, and a black silhouette of a flame.	H410- H272- H314	P273- P301+P330+ P331- P305+P351+ P338-P280	7761-88-8

Amonijak	NH_3	17,03		H314- H400- H335	P309+P311-P273- P305+P351+P338- P280- P301+P330+P331	1336-21-6
Saharoza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342,3	/	/	/	57-50-1
Glukoza	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	/	/	/	50-99-7
2-hidroksipro- panojska kislina ali mlečna kislina	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	90,08		H318- H315	P280- P305+P351+P338	79-33-4
Citronska kislina monohidrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	210,14		H319	P102 P103 P264 P280 P305+P351+P338 P337+P313	5949-29-1
Dušikova(V) kislina	HNO_3	63,01	 	H272- H314- H290	P260- P301+P330+P331- P280- P305+P351+P338	7697-37-2
Barbiturna kislina ali 4- hidroksiuracil	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$	128,1	/	Ni podat- kov	Ni podatkov	67-52-7
Toluidni reagent ali 2-metilanilin	$\text{C}_7\text{H}_9\text{N}$	107,16	 	H226- H302- H314- H350-	P201-P273-P280- P305+P351+P338- P310	95-53-4








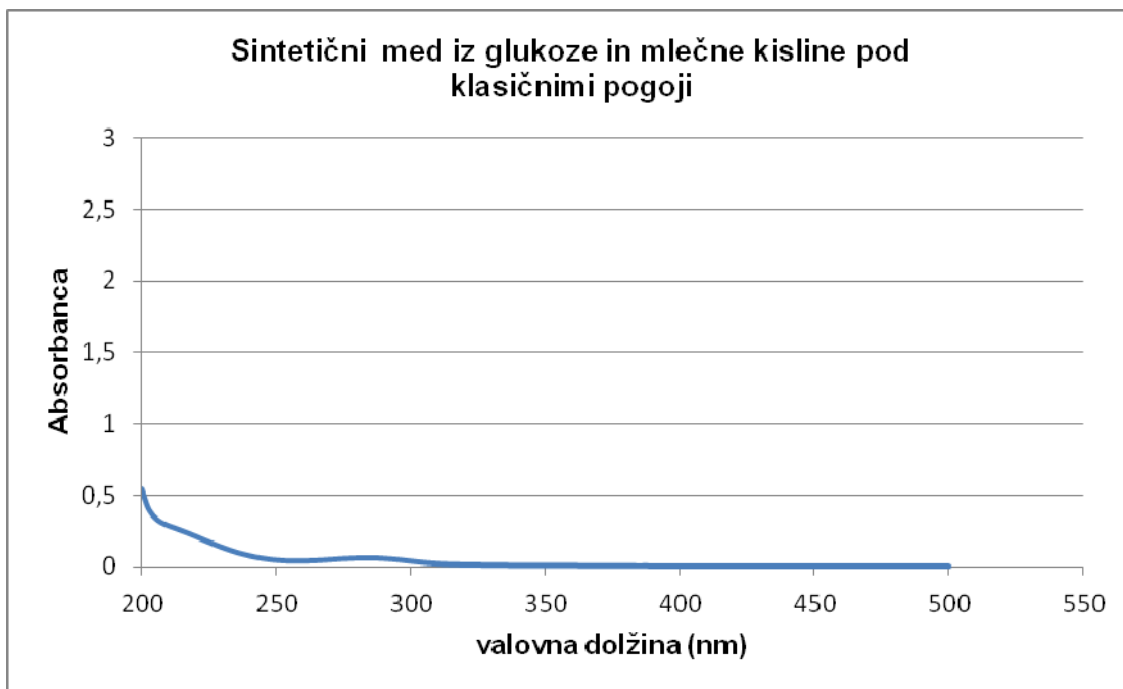
			  	H400		
Izopropanol ali propan-2-ol	C ₃ H ₈ O	60,1	 	H225 H319 H336	P210 P233 P305+P351+P338	67-63-0
Ocetna kislina ali etanojska kislina	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	 	H226 H290 H314	P210 P280 P303+P361+P353 P305+P351+P338 P310	64-19-7

Tabela 3: Varnostna opozorila kemikalij

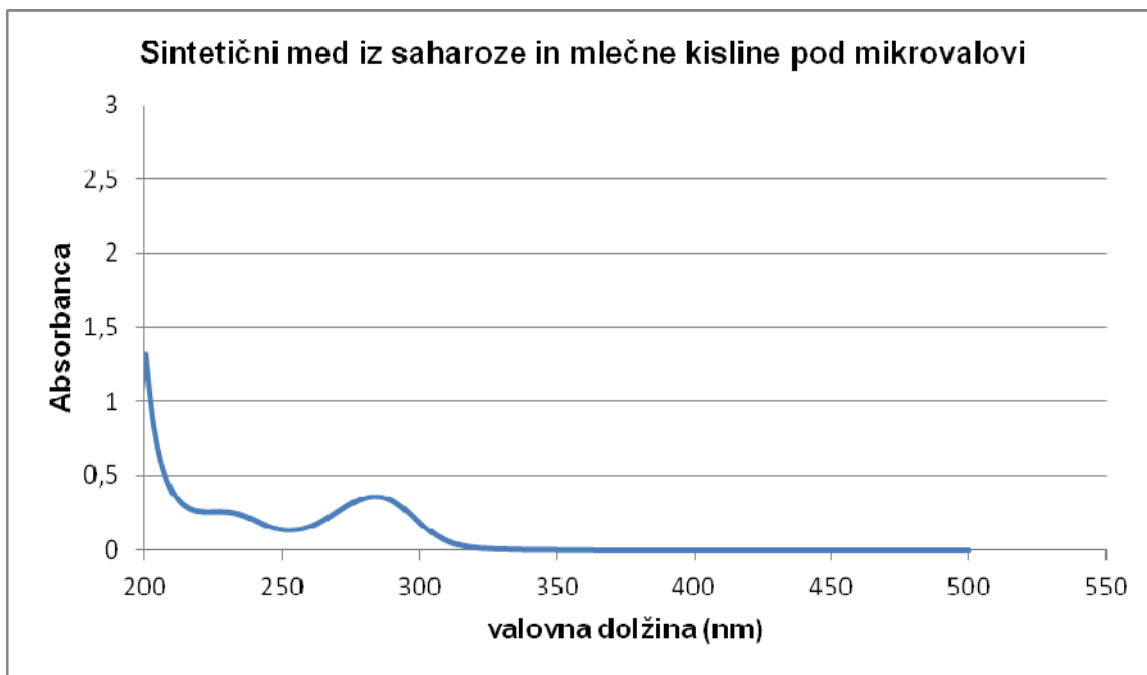
7.2 UV/VIS SPEKTRI VZORCEV MEDU



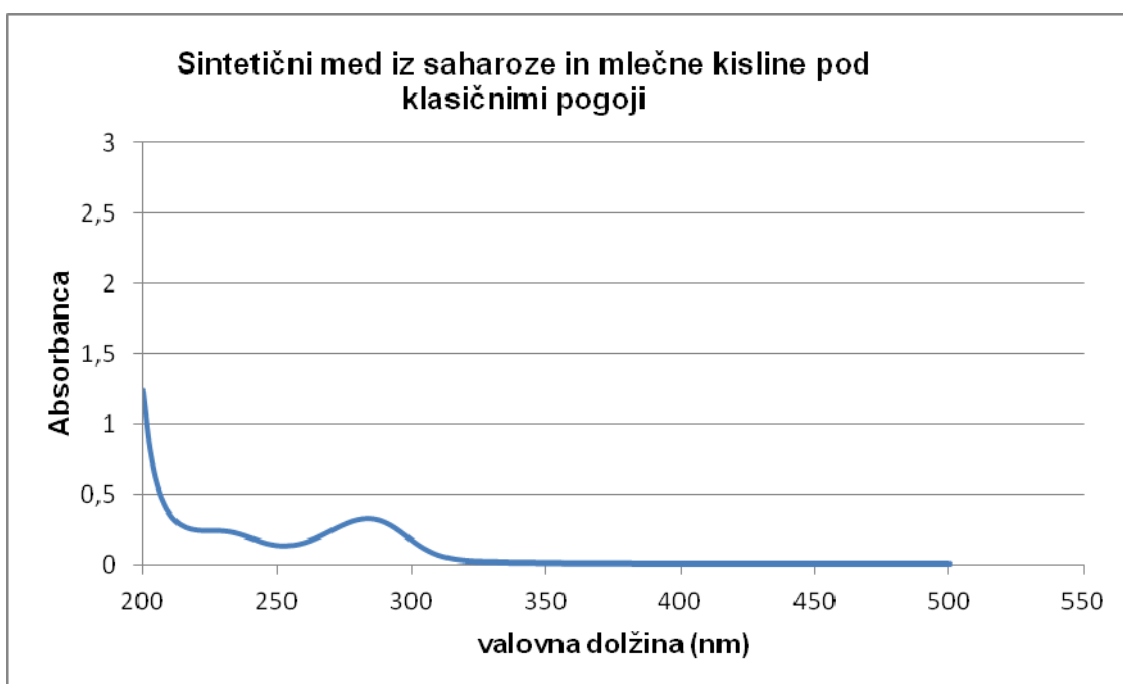
Graf 2: Sintetični med iz glukoze in mlečne kisline pod mikrovalovi



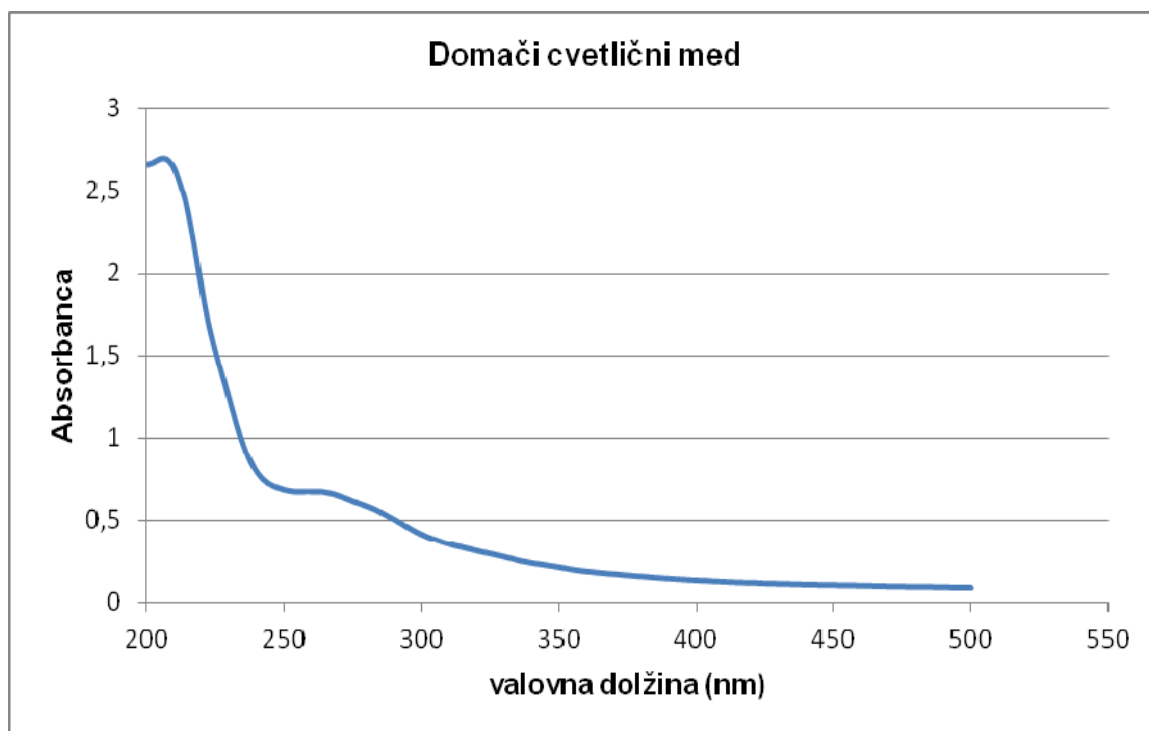
Graf 3: Sintetični med iz glukoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji



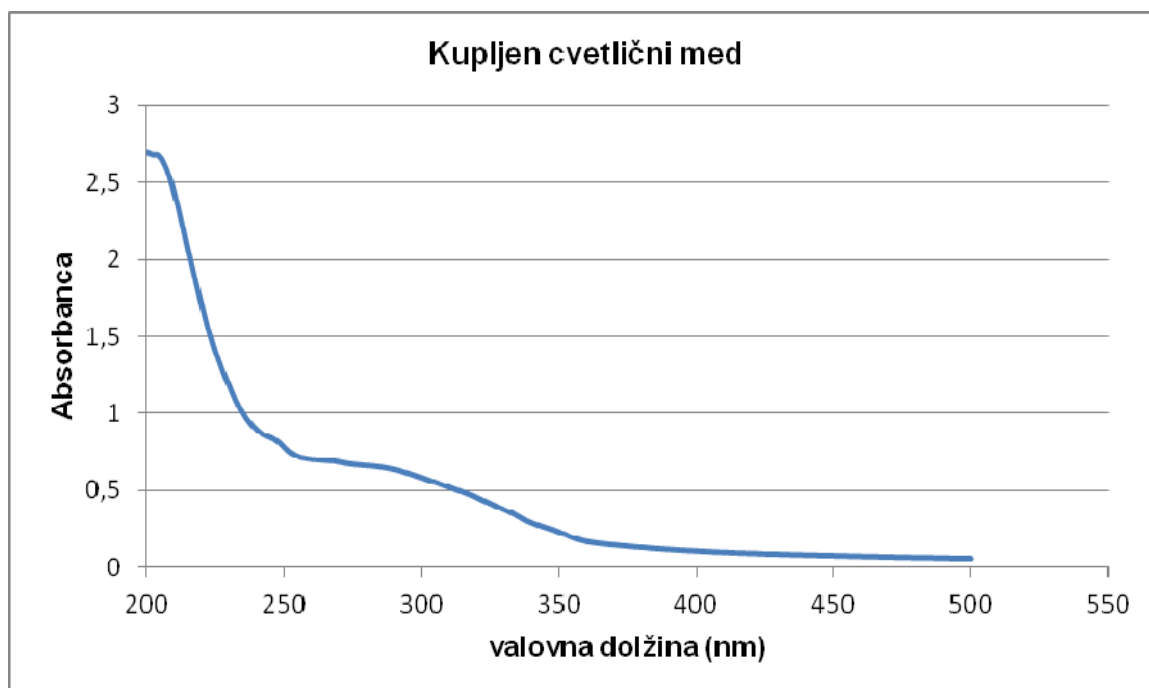
Graf 4: Sintetični med iz saharoze in mlečne kisline pod mikrovalovi



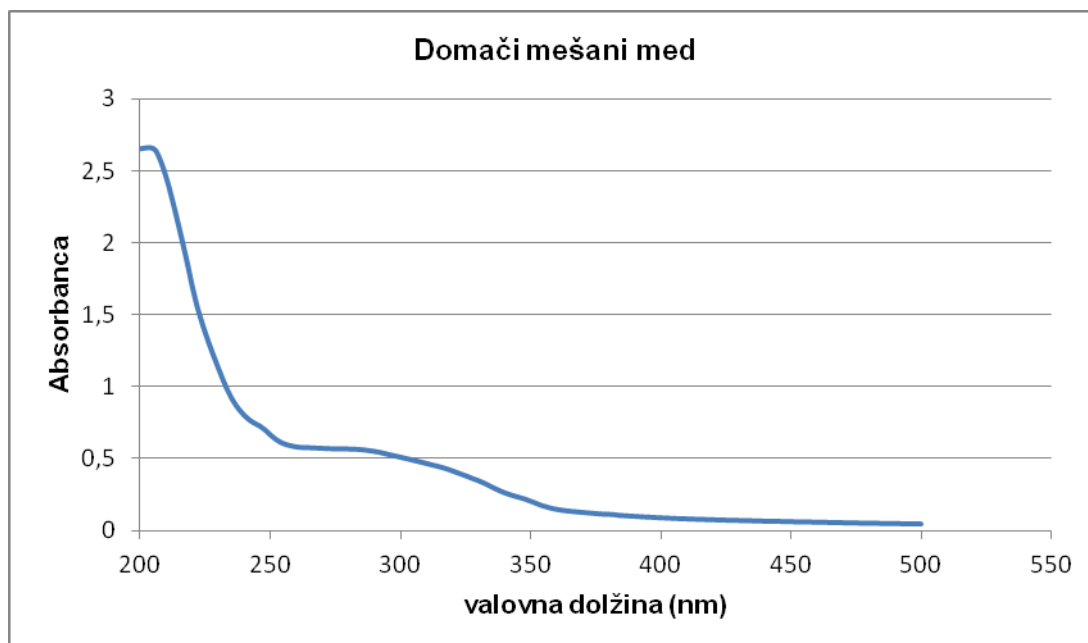
Graf 5: Sintetični med iz saharoze in mlečne kisline pod klasičnimi pogoji



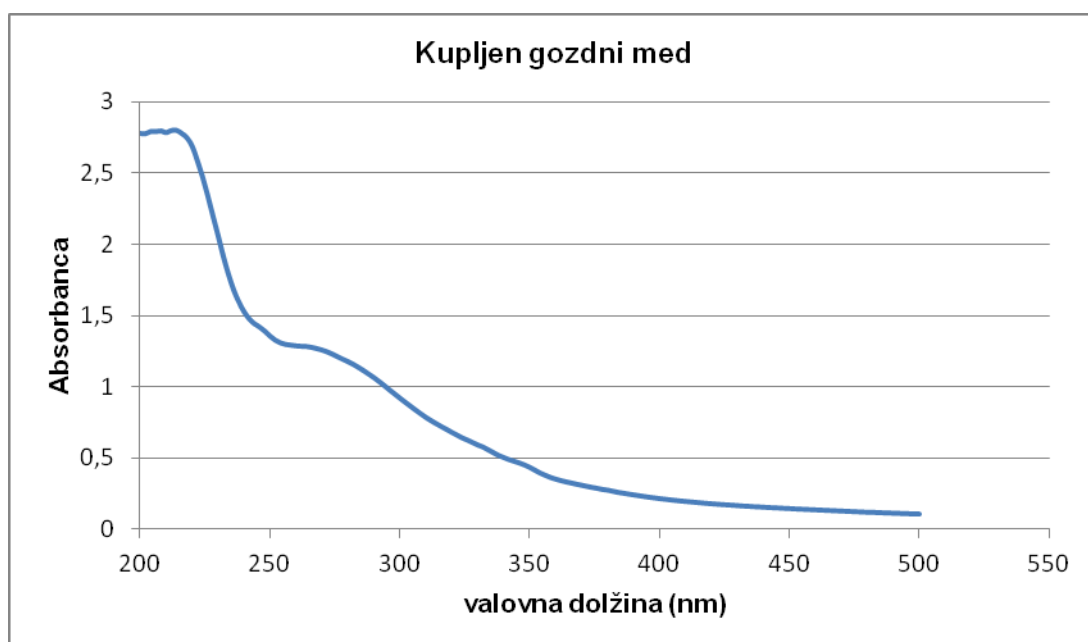
Graf 6: Domači cvetlični med



Graf 7: Kupljeni cvetlični med



Graf 8: Domači mešani med



Graf 9: Kupljeni gozdni med



Graf 10: Sintetični med iz glukoze in citronske kisline pod mikrovalovi