

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Irena MORAVEC

**DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNE PREHRANSKE  
VLAKNINE Z ENCIMSKO METODO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Irena MORAVEC

**DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNE PREHRANSKE VLAKNINE  
Z ENCIMSKO METODO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF TOTAL DIETARY FIBRE CONTENT WITH  
ENZYME METHOD**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Analize so bile opravljene na Zavodu za zdravstveno varstvo Novo mesto v Sanitarno-kemičnem laboratoriju.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Terezija Golob in za recenzentko doc. dr. Nataša Šegatin.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Recenzentka: doc. dr. Nataša Šegatin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Irena Moravec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |   |
|----|---|
| ŠD | Dn  |
| DK | UDK 543.635.2:641.1 + 613.2 (043) = 163.6   |
| KG | živila/prehranska vlaknina/skupna prehranska vlaknina/določanje prehranske vlaknine/validacija/pravilnost/ponovljivost/obnovljivost/merilna negotovost/razširjena negotovost  |
| AV | MORAVEC, Irena  |
| SA | GOLOB, Terezija (mentorica)/ŠEGATIN, Nataša (recenzentka)   |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101   |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo   |
| LI | 2011  |
| IN | DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNE PREHRANSKE VLAKNINE Z ENCIMSKO METODO  |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)   |
| OP | X, 57 str., 10 pregl., 3 sl., 2 pril., 44 vir.  |
| IJ | sl  |
| Jl | sl/en   |
| AI | Definicija prehranske vlaknine in analizna metoda za njeno določanje sta medsebojno tesno povezani. Za pravilno označevanje in kontrolo nad živili se morajo analizne metode razvijati skladno z definicijo. Zato je bil namen diplomskega dela vpeljava in validacija najnovejše analizne metode AOAC 2009.01 za določanje skupne prehranske vlaknine v živilih, ki je v skladu z zadnjo sprejeto definicijo vlaknine iz leta 2009. Z validacijo smo želeli ugotoviti natančnost in pravilnost metode ter ovrednotiti merilno negotovost. Določili smo tudi delovno območje, mejo zaznavnosti in mejo določljivosti. Celoten potek validacije smo opravili do tiste stopnje metode, ki omogoča določitev skupne vsebnosti visokomolekularne prehranske vlaknine. Analize smo izvajali na 9 različnih živilih z različno vsebnostjo vlaknine, vode in maščobe. Dobljene rezultate smo primerjali z že obstoječimi v različnih virih in ugotovili, da so naše vrednosti za skupno prehransko vlaknino višje od tabeliranih. Z validacijo smo potrdili, da so karakteristike metode primerne za določanje skupne prehranske vlaknine. Iz podatkov validacije smo izračunali razširjeno negotovost, ki znaša 30 %. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

|    |  |
|----|--|
| DN | Dn   |
| DC | UDC 543.635.2:641.1 + 613.2 (043) = 163.6  |
| CX | foods/dietary fibre/total dietary fibre/determination of dietary fibre/validation/accuracy/repeatability/reproducibility/uncertainty of measurement/expanded uncertainty   |
| AU | MORAVEC, Irena   |
| AA | GOLOB, Terezija (supervisor)/ŠEGATIN, Nataša (reviewer)  |
| PP | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  |
| PB | University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology   |
| PY | 2011   |
| TI | DETERMINATION OF TOTAL DIETARY FIBRE CONTENT WITH ENZYME METHOD  |
| DT | Diplomsko delo (University studies)  |
| NO | X, 57 p., 10 tab., 3 fig., 2 ann., 44 ref.   |
| LA | Sl   |
| AL | sl/en  |
| AB | Definition of dietary fiber and analytical method for its determination are closely linked. For proper labeling and food control analytical methods must be developed in accordance with the definition. Therefore, the purpose of the thesis was introduction and validation of the latest analytical method AOAC 2009.01 for determination of total dietary fiber in foods, according to the current accepted definition of fiber in 2009. With the validation the repeatability, reproducibility and accuracy of the method, as well as the evaluation of the measurement uncertainty were determined. The work area, limit of detection and limit of quantification were also set. The entire course of the validation was conducted up to level that allows determination of total high molecular fiber. Analyses were performed on 9 different foods with different dietary fiber, water and fat content. The obtained results are compared with various existing literature, and found that our values of total dietary fiber are higher than the tabulated. With validation, we confirmed that the characteristics of the method are suitable for determination of total dietary. From data validation 30 % expanded uncertainty was calculated. |

## KAZALO VSEBINE

|  |      |
|--|------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA                                | III  |
| KEY WORDS DOCUMENTATION  | IV   |
| KAZALO VSEBINE   | V    |
| KAZALO PREGLEDNIC  | VII  |
| KAZALO SLIK  | VIII |
| KAZALO PRILOG  | IX   |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI   | X    |
| <b>1 UVOD</b>  | 1    |
| 1.1 DELOVNE HIPOTEZE   | 1    |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>   | 2    |
| 2.1 DEFINICIJA PREHRANSKE VLAKNINE                                 | 2    |
| 2.2 DELITEV PREHRANSKE VLAKNINE                                    | 4    |
| <b>2.2.1 Topna in netopna prehranska vlaknina</b>                  | 4    |
| <b>2.2.2 Fermentabilna in nefermentabilna prehranska vlaknina</b>  | 4    |
| <b>2.2.3 Viskozna in neviskozna PV</b>                             | 5    |
| 2.3 KOMPONENTE PREHRANSKE VLAKNINE IN NJIHOVA FUNKCIONALNOST       | 5    |
| <b>2.3.1 Pomembnejše komponente prehranske vlaknine</b>            | 6    |
| 2.3.1.1 Celuloza   | 6    |
| 2.3.1.2 Hemiceluloza   | 6    |
| 2.3.1.3 Rezistentni škrob  | 7    |
| 2.3.1.4 Pektin   | 7    |
| 2.3.1.5 Oligosaharidi  | 8    |
| 2.3.1.6 Inulin   | 8    |
| <b>2.3.2 Funkcionalne lastnosti prehranske vlaknine</b>            | 8    |
| 2.4 FIZIKALNO-KEMIJSKE IN FIZIOLOŠKE LASTNOSTI PREHRANSKE VLAKNINE | 10   |
| <b>2.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti prehranske vlaknine</b>      | 10   |
| <b>2.4.2 Fiziološke lastnosti prehranske vlaknine</b>              | 11   |
| 2.4.2.1 Netopna vlaknina   | 11   |
| 2.4.2.2 Topna prehranska vlaknina                                  | 12   |
| 2.5 VIRI PREHRANSKE VLAKNINE                                       | 14   |
| 2.6 VPLIV PREDELAVE NA PREHRANSKO VLAKNINO                         | 14   |
| 2.7 PRIPOROČILA ZA UŽIVANJE VLAKNINE                               | 15   |
| 2.8 METODE DOLOČANJA VSEBNOSTI PREHRANSKE VLAKNINE                 | 16   |
| <b>3 MATERIAL IN METODE</b>  | 20   |
| 3.1 NAČRT DELA   | 20   |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| 3.2          | MATERIAL  | 20 |
| 3.3          | METODE DELA   | 21 |
| <b>3.3.1</b> | <b>Določanje skupne prehranske vlaknine z metodo AOAC 2009.01</b> | 21 |
| <b>3.3.2</b> | <b>Določanje dušika v živilih po Kjeldahlu</b>                    | 25 |
| <b>3.3.3</b> | <b>Določanje vsebnosti pepela v živilih</b>                       | 27 |
| <b>3.3.4</b> | <b>Pregled parametrov validacije</b>                              | 28 |
| <b>3.3.5</b> | <b>Merilna negotovost (angl. uncertainty of measurement)</b>      | 30 |
| 3.4          | STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV                                     | 35 |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI Z RAZPRAVO</b>                                       | 37 |
| 4.1          | REZULTATI VALIDACIJE  | 37 |
| <b>4.1.1</b> | <b>Namen validacije</b>   | 37 |
| <b>4.1.2</b> | <b>Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)</b>         | 37 |
| <b>4.1.3</b> | <b>Delovno območje</b>  | 38 |
| <b>4.1.4</b> | <b>Pravilnost metode</b>  | 38 |
| <b>4.1.5</b> | <b>Vrednotenje natančnosti analiznega postopka</b>                | 40 |
| 4.1.5.1      | Ponovljivost- natančnost na krajši čas                            | 41 |
| 4.1.5.2      | Obnovljivost- natančnost na daljši čas                            | 42 |
| <b>4.1.6</b> | <b>Določitev merilne negotovosti</b>                              | 42 |
| 4.1.6.2      | Identifikacija možnih izvorov merilne negotovosti                 | 43 |
| 4.1.6.3      | Kvantitativno vrednotenje prispevkov merilne negotovosti          | 45 |
| 4.1.6.4      | Izračun kombinirane (uc) in razširjene (Uc) merilne negotovosti   | 47 |
| 4.2          | PRIMERJAVA NAŠIH REZULTATOV S PODATKI IZ<br>LITERATURE            | 48 |
| 4.3          | EKSPERIMENTALNO DELO  | 49 |
| <b>5</b>     | <b>SKLEPI</b>   | 50 |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK</b>   | 51 |
| <b>7</b>     | <b>VIRI</b>   | 53 |
|              | <b>ZAHVALA</b>  |    |
|              | <b>PRILOGE</b>  |    |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| Preglednica 1:  | Komponente prehranske vlaknine (Gray, 2006: 14)   | 6  |
| Preglednica 2:  | Naravni viri različnih komponent prehranske vlaknine (Gray, 2006: 18)   | 14 |
| Preglednica 3:  | Priporočila za dnevni vnos prehranske vlaknine (Institute of Medicine, 2005; Health Council of The Netherlands..., 2006)                                    | 15 |
| Preglednica 4:  | Podatki za izračun meje zaznavnosti in meje določljivosti skupne prehranske vlaknine v vzorcu sadnega soka  | 38 |
| Preglednica 5:  | Primerjava referenčne vsebnosti skupne prehranske vlaknine s povprečno izmerjeno vsebnostjo skupne prehranske vlaknine (g/100 g) v vzorcu pšenične moke CRM | 39 |
| Preglednica 6:  | Rezultat medlaboratorijskega primerjalnega testa za vsebnost skupne prehranske vlaknine v vzorcu ovsenih kosmičev T2443                                     | 40 |
| Preglednica 7:  | Podatki za opredelitev natančnosti analizne metode za določanje vsebnosti skupne prehranske vlaknine v krajšem času   | 41 |
| Preglednica 8:  | Podatki za opredelitev natančnosti analizne metode za določanje skupne prehranske vlaknine v daljšem času   | 42 |
| Preglednica 9:  | Podatki potrebni za izračun prispevka obnovljivosti (u(obn.)) k merilni negotovosti analizne metode za določanje skupne prehranske vlaknine v živilih       | 46 |
| Preglednica 10: | Primerjava naših rezultatov za vsebnost skupne prehranske vlaknine s podatki iz literature  | 48 |



## KAZALO SLIK

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Slika 1: | Shematska predstavitev komponent prehranske vlaknine, ki se jih določi/nedoloči z metodama AOAC 985.29 in 991.43 (McCleary in sod., 2009)   | 17 |
| Slika 2: | Shematičen prikaz določanja prehranske vlaknine z metodo AOAC 985.29 (Proskyjeva metoda) in metodo AOAC 2009.01 (Paeschke in Aimutis, 2011) | 18 |
| Slika 3: | Filtriranje oborjene vzorčne raztopine  | 24 |

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Posamezne vsebnosti SPV (g/100 g), povprečna vsebnost beljakovin - B (mg) in pepela - P (mg), povprečna vsebnost SPV (g/100 g), standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD) za vsako posamezno analizirano živilo za opredelitev natančnosti v krajšem času. 59
- Priloga B: Posamezne vsebnosti SPV (g/100 g), povprečna vsebnost beljakovin - B (mg) in pepela - P (mg), povprečna vsebnost SPV (g/100 g), standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD) v dnevnik in tedenskih ponovitvah za vsako posamezno analizirano živilo za opredelitev natančnosti v daljšem času. 60

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                 |  |
|-----------------|--|
| AACC            | American Association of Cereal Chemists  |
| AOAC            | Association of Official Analytical Chemists  |
| CAC             | Codex Alimentarius komisija (ang. Codex Alimentarius Commission)   |
| CCNFSDU         | Komite za prehrano ter za živila za posebne prehranske namene<br>(angl. Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses) |
| CRM             | Certificiran referenčni material   |
| GIT             | Gastrointestinalni trakt   |
| HMWDF           | Visokomolekularna prehranska vlaknina (ang. High molecular weight dietary fibre)   |
| HMWSDF          | Topna visokomolekularna prehranska vlaknina (ang. High molecular weight soluble dietary fibre)   |
| HPLC            | Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti   |
| IDF             | Netopna prehranska vlaknina (ang. Insoluble dietary fibre)   |
| LDL             | Lipoproteini nizke gostote (ang. Low density lipoprotein)  |
| LMWSDF          | Topna nizkomolekularna prehranska vlaknina (ang. Low molecular weight soluble dietary fibre)   |
| LOD             | Meja zaznavnosti   |
| LOQ             | Meja določljivosti   |
| OH              | Ogljikovi hidrati  |
| PV              | Prehranska vlaknina  |
| RSD             | Relativni standardni odmik   |
| RŠ              | Rezistentni škrob  |
| s               | Standardni odmik   |
| SPV             | Skupna prehranska vlaknina   |
| t.i.            | Tako imenovano   |
| $\Delta$        | Absolutna napaka   |
| $x_{izm}$       | Izmerjena vsebnost skupne prehranske vlaknine  |
| $\bar{x}_{izm}$ | Povprečna izmerjena vsebnost skupne prehranske vlaknine  |
| $x_{ref}$       | Referenčna vsebnost skupne prehranske vlaknine   |

## 1 UVOD

Potrošniki vse bolj verjamejo trditvam, da vlaknina ugodno vpliva na njihovo zdravje in kakovost življenja, zato se za vsebnost vlaknih v živilih vse bolj zanimajo. Prehransko vlaknino, zaradi njenih specifičnih učinkov na prebavo in presnovo, uvrščamo med funkcionalne komponente živil. Ker je vlaknina kompleksna mešanica, je nujno, da ima jasno opredelitev in metodologijo, ki omogoča določitev posameznih komponent. Znanih je mnogo analiznih metod za določanje vsebnosti vlaknine v živilih, največje število komponent, kot so rezistentni škrob in neprebavljivi oligosaharidi se določi z najnovejšo encimsko metodo AOAC 2009.01.

Namen diplomskega dela je bila vpeljava in validacija metode AOAC 2009.01 za določanje vsebnosti skupne prehranske vlaknine v različnih živilih. Postopek metode AOAC 2009.01 smo skrajšali za analizo vsebnosti topne nizkomolekularne prehranske vlaknine. Za takšen pristop smo se odločili, ker je izvedba analizirane vsebnosti topne nizkomolekularne prehranske vlaknine dolgotrajna, predraga in zahtevna. Poleg tega prispevek vsebnosti topne nizkomolekularne prehranske vlaknine zanemarljivo vpliva na končni rezultat - skupno prehransko vlaknino. Vrednosti skupne prehranske vlaknine, dobljene s skrajšano metodo AOAC 2009.01 smo primerjali z vrednostmi iz različne literature. S procesom validacije želimo preveriti zanesljivost, pravilnost in natančnost metode. Validacija kemijske metode za določanje sestavin živila ter ravnanje po pravilih dobre laboratorijske prakse pomeni povečanje zanesljivosti podatkov, ki prihajajo iz analitskih laboratorijev. Zato moramo z validacijo dokazati, da ima izbrana metoda ustrezno strokovno ozadje in da je pravilno prirejena za določen tip analize.

### 1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Pred začetkom raziskave smo postavili štiri hipoteze, in sicer smo predvidevali:

- da bo nova metoda omogočila analizo skupne prehranske vlaknine,
- da bodo parametri validacije pokazali zanesljivost, pravilnost in natančnost metode,
- da bodo vsebnosti skupne prehranske vlaknine v različnih živilih različne,
- da se bodo rezultati pridobljeni z novo metodo razlikovali od podatkov v literaturi.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 DEFINICIJA PREHRANSKE VLAKNINE

Čeprav obstaja veliko različnih definicij prehranske vlaknine (PV), ni bila še nobena dokončno sprejeta. Zadnje čase poteka veliko razprav o tem, kako naj bi bila PV definirana. Prehranska industrija, trgovci in državni organi potrebujejo natančno in dovolj jasno definicijo, za pravilno označevanje živilskih izdelkov (Gray, 2006). Podatek o vsebnosti skupne prehranske vlaknine je pomemben pri kontroli kakovosti in poznavanju hranilne vrednosti. Za dietetike in prehrabenike pa je podatek o vsebnosti vlaknine v živilih pomemben, saj tako lahko ocenijo, kako v dnevni prehrani zagotoviti priporočene količine (Golob in sod., 1997).

Prehransko vlaknino so poznali že pred več kot 2000 leti pod imeni otrobi, krma in seno. Izraz prehranska vlaknina se je prvič pojavil leta 1953, ko je Hipsley opisal PV kot del rastlinske celične stene. Prvo definicijo PV pa je opisal Trowell leta 1972, ki pravi, da je PV tisti del hrane, ki izhaja iz celične stene rastlin in jo ljudje zelo slabo prebavljamo (Gray, 2006). Leta 1976 Trowell in njegovi sodelavci izraz PV označijo kot vsoto rastlinskih polisaharidov in lignina, ki niso prebavljivi z endogenimi izločki prebavil (Salobir J. in Salobir B., 2001).

Nedavno predlagane definicije PV različnih organizacij:

- American Association of Cereal Chemists (AACC) iz leta 2001

PV je užiten del rastlin ali njim podobni ogljikovi hidrati, ki so rezistentni na prebavo in absorpcijo v človeškem tankem črevesu. S popolno ali delno fermentacijo pa so prebavljivi v debelem črevesu. PV vključuje polisaharide, oligosaharide, lignin in združene rastlinske snovi. PV pospešuje koristne fiziološke učinke skupaj z odvajanjem in/ali zmanjšuje nivo krvnega holesterola, in/ali zmanjšuje raven glukoze v krvi (AACC, 2001).

- Institute of Medicine iz leta 2002

PV vključuje neprebavljive ogljikove hidrate in lignin, ki so znotraj rastline intaktni. Funkcionalno vlaknino sestavljajo neprebavljivi ogljikovi hidrati, ki imajo blagodejen učinek na človeka. Skupna PV je vsota PV in funkcionalne vlaknine (Gray, 2006; Institute of Medicine, 2005).

- Codex Alimentarius Commison (CAC) iz leta 2006

PV pomeni polimere ogljikovih hidratov s tremi ali več monomerskimi enotami, ki se ne prebavijo niti absorbirajo v tankem črevesu človeka in spadajo v naslednje kategorije:

- užitni polimeri ogljikovih hidratov, naravno prisotni v živilih v obliki, v kateri se zaužijejo,
- užitni polimeri ogljikovih hidratov, ki so bili pridobljeni iz surovine za živilo s fizikalnimi, encimskimi ali kemijskimi sredstvi in ki imajo ugoden fiziološki učinek, dokazan s splošno sprejetim znanstvenim dokazom,
- užitni sintetični polimeri ogljikovih hidratov, ki imajo ugoden fiziološki učinek, dokazan s splošno sprejetim znanstvenim dokazom (Codex Alimentarius Commission, 2006; Gray, 2006; Pravilnik..., 2009).

Potreba po jasni opredelitvi PV, ki bi temeljila na prehranskih trditvah, je bila glavna tema komisije Codex Alimentarius od leta 1992. Novembra 2008 je Komite za prehrano ter za živila za posebne prehranske namene (CCNFSDU - Codex Committee on Nutrition and foods for special dietary uses) na 30. seji v Južni Afriki predlagalo novo definicijo PV. Po zaključku razprave je delegacija dosegla mednarodno soglasje (Lupton, 2010).

**Najnovejša definicija PV iz leta 2009 se torej glasi:**

PV je sestavljena iz polimernih<sup>1</sup> ogljikovih hidratov z 10 ali več monomernimi enotami<sup>2</sup>, ki niso hidrolizirani z endogenimi encimi v tankem črevesu človeka. Ti polimeri spadajo v naslednje kategorije:

- užitni polimeri ogljikovih hidratov, naravno prisotni v živilih v obliki, v kateri se zaužijejo,
- užitni polimeri ogljikovih hidratov, ki so bili pridobljeni iz surovine za živilo s fizikalnimi, encimskimi ali kemijskimi sredstvi in ki imajo ugoden fiziološki učinek, dokazan s splošno sprejetim znanstvenim dokazom,
- užitni sintetični polimeri ogljikovih hidratov, ki imajo ugoden fiziološki učinek, dokazan s splošno sprejetim znanstvenim dokazom (Lupton, 2010).

---

<sup>1</sup> Kadar izhajamo iz rastlinskega izvora, PV lahko vsebuje frakcije lignina in/ali druge spojine, kadar so povezane s polisaharidi v celični steni rastlin in, če so te spojine, ki jih določamo s AOAC gravimetrično metodo za analizo PV: frakcije lignina in druge spojine (proteinske frakcije, fenolne spojine, voski, saponini, fitati, kutin, fitosteroli, ind.) tesno »povezane« z rastlinskimi polisaharidi, ki se jih pogosto določa z metodo AOAC 991.43. Te snovi so vključene v definicijo PV, če so dejansko povezane s poli- ali oligosaharidnim delom vlaknine. Vendar, če so izločene ali celo ponovno dodane hrani, ki vsebuje neprebavljive polisaharide, tega ne moremo definirati kot PV. Kombiniranje s polisaharidi lahko prinese dodatne koristne učinke.

<sup>2</sup> Odločitev o tem, da se ogljikovim hidratom vključi vnos 3 – 9 monomernih enot, bi morala biti prepuščena nacionalnim organom.

To različico definicije PV je sprejela leta 2009 komisija Codex Alimentarius. Vprašanje vključitve ali izključitve oligosaharidov s 3 – 9 monomernimi enotami je še vedno razpravi (Lupton, 2010). Med skupno prehransko vlaknino (SPV) prištevamo visoko in nizko molekularno PV ter rezistentni škrob.

## 2.2 DELITEV PREHRANSKE VLAKNINE

### 2.2.1 Topna in netopna prehranska vlaknina

PV v osnovi delimo na dve frakciji: topno in netopno. Netopna PV zajema tiste snovi, ki jih človeški organizem s svojimi encimi ni sposoben razgraditi in se zato neprebavljene izločijo z blatom (celuloza, netopna hemiceluloza, lignin, protopektin, netopni pentozani). Topna PV pa zajema tiste snovi, ki se delno ali v celoti fermentirajo v debelem črevesu (topni pektin, glukan, topni pentozani, polisaharidne gume) (Batič, 2001).

Netopna PV je po definiciji frakcija skupne prehranske vlaknine (SPV), ki ni topna v vroči pufrski raztopini. Njena vsebnost lahko niha tudi glede na metodo določanja SPV (Mongeau in Brooks, 2003).

Topna in netopna vlaknina imata različen vpliv na človeški organizem. Topna vlaknina tvori viskozne raztopine in tako poveča viskoznost črevesne vsebine, ki deluje kot pregrada pri difuziji prebavljenih snovi, upočasni absorpcijo glukoze, veže holesterol in žolčne kisline. Netopna vlaknina pa vpliva na adsorpcijo žolčnih kislin, povečano količino izločenega blata in skrajšanje časa prehoda skozi prebavni trakt (Salobir J. in Salobir B., 2001).

### 2.2.2 Fermentabilna in nefermentabilna prehranska vlaknina

Nekatere komponente PV v črevesju s pomočjo bakterij fermentirajo, pri čemer nastajajo plini in kratkoverižne maščobne kisline (ocetna, propionska, maslena kislina), ki se nato lahko absorbirajo in porabijo za energijo ali pa so vir energije za notranjo plast črevesnih celic. Med fermentabilno vlaknino spadajo inulin, oligofruktoza,  $\beta$ -glukani, pektin in nekatere gume. Med nefermentabilno vlaknino spadata lignin in celuloza. Živila z visoko vsebnostjo fermentabilne vlaknine so ječmen, oves, sadje in zelenjava, nefermentabilno vlaknino pa vsebujejo žitarice in otrobi oz. živila z veliko vsebnostjo celuloze (Gray, 2006).

### 2.2.3 Viskozna in neviskozna PV

V kombinaciji z vodo nekatere komponente vlaknine tvorijo viskozne raztopine, ki upočasnjujejo absorpcijo nekaterih hranil in praznjenje želodca ter nižajo nivo krvnega holesterola. Med viskozno vlaknino spadajo nekatere gume, psilium, pektin in  $\beta$ -glukani. Sposobnost za tvorbo viskoznih raztopin je ena najpomembnejših lastnosti vlaknine. Neškrobni polisaharidi v raztopinah tvorijo tridimenzionalne mreže, v katere se lahko veže precejšnja količina vode. Viskoznost take raztopine je odvisna od vrste neškrobnega polisaharida oz. od fizikalno kemijske strukture molekule, vrednosti pH in koncentracije elektrolitov v okoliški tekočini. Zaradi tega se vlaknina v različnih delih prebavil tudi različno obnaša (Salobir J. in Salobir B., 2001).

## 2.3 KOMPONENTE PREHRANSKE VLAKNINE IN NJIHOVA FUNKCIONALNOST

Vlaknina je sestavljena predvsem iz polimernih ogljikovih hidratov (OH) (neškrobni polisaharidi), ki so sestavni del rastlinskih celičnih sten. Ta vključuje celulozo, hemicelulozo in pektin, kot tudi druge polisaharide rastlinskega ali algalnega izvora (gume, sluzi, inulin). Med polimerne OH so vključeni tudi analogi neprebavljivih OH (rezistentni škrob, frukto-oligosaharidi, galaktodisaharidi, modificirana celuloza in sintetizirani polimeri OH - polidekstroza), ki se fermentirajo v debelem črevesu. Lignin in manjše spojine, vključno z voski, kutinom, saponini, polifenoli, fosfati in fitosteroli, tudi spadajo med PV, le če so pridobljeni iz polisaharidov in oligosaharidov (Gray, 2006).

Polisaharidi imajo po definiciji lahko tudi od 100 do več tisoč monosaharidnih enot, medtem ko imajo oligosaharidi nizko stopnjo polimerizacije in pogosto med 2 do 20 monosaharidnih enot. Oligosaharidi se med seboj ločijo v dolžini verige, sestavi monosaharidov, stopnji polimerizacije in čistosti. V praksi je ločevanje med oligosaharidi in polisaharidi bolj empirično in nenatančno. Zato je v pripravi »funkcionalnih« živil največja težava v tem, da je npr. pri vlaknini kot funkcionalnem dodatku, težko dodati »čiste« in »dobro« definirane frakcije polisaharidov, ki bi omogočale nedvoumno razmerje med strukturo in aktivnostjo, kar bi jasno podkrepilo trditev na izdelku o ugodnem vplivu na zdravje človeka (Batič, 2001).

Med OH, ki so nerazgradljivi v tankem črevesu so za živilsko industrijo pomembne tri glavne skupine: neškrobni polisaharidi, nerazgradljivi oligosaharidi in rezistentni škrob.



Prehranski OH, predvsem polisaharidi, ki se izogonejo encimski razgradnji v zgornjem delu prebavnega trakta, so v osnovi substrat za rast bakterij v debelem črevesu in jih zato uvrščamo med prebiotike. Prebiotiki so po definiciji nerazgradljive sestavine živil s pozitivnim učinkom na človeka ob selektivni stimulaciji rasti in/ali aktivnosti enega ali omejenega števila bakterij v debelem črevesu z ugodnim vplivom na človekovo zdravje (Batič, 2001).

**Preglednica 1:** Komponente prehranske vlaknine (Gray, 2006: 14)

| <b>Neškrobni polisaharidi in neprebavljivi oligosaharidi</b> | <b>Analogi OH</b>                         | <b>Lignin in druge podobne spojine</b> |
|--|---|--|
| celuloza   | rezistentni škrob                         | lignini                                |
| hemiceluloza   | frukto-oligosaharidi                      | voski                                  |
| $\beta$ -glukani   | galakto-oligosaharidi                     | fitati                                 |
| gume   | neprebavljivi dekstrini                   | kutin                                  |
| sluzi  | modificirane ali sintetizirane spojine OH | tanini                                 |
| fruktani   | modificirana celuloza                     |  |
| inulin   | polidekstroza                             |  |
| frukto-oligosaharidi   |   |  |

### 2.3.1 Pomembnejše komponente prehranske vlaknine

#### 2.3.1.1 Celuloza

Celuloza je nerazvejan linearni polisaharid, ki je lahko sestavljen iz tudi do 10.000 glukoznih molekul. Linearne molekule, ki so med sabo povezane z  $\beta$ -1,4 glikozidno vezjo, so povezane tesno skupaj v dolga vlakna, zaradi česar je celuloza zelo netopna in odporna na prebavo. Človek v svojem prebavnem traktu nima encima, ki bi razgradil  $\beta$ -1,4 glikozidno vez, zato se večina zaužite celuloze izloči nespremenjena z blatom. Celuloza je glavna komponenta celične stene večine rastlin, zato je največ najdemo v sadju, zelenjavi in žitih (Gray, 2006).

#### 2.3.1.2 Hemiceluloza

Hemiceluloza je necelulozni, neškrobni in v vodi netopni kompleksni polisaharid, ki se nahaja v številnih rastlinskih tkivih. Hemiceluloza ni prekursor celuloze in ni udeležena v biosintezi celuloze v rastlinah. V rastlinski celici nastaja neodvisno kot strukturna sestavina celičnih sten. Hemicelulozo razvrščamo na osnovi sladkorjev, ki so prisotni v strukturi (manan, araban, ksilan). Pri pripravi kruha vpliva na naslednje tehnološke lastnosti: poveča

vezanje vode, izboljšuje gnetljivost testa, zmanjšuje energijo potrebno za gnetenje, podpira vključevanje proteinov, povečuje volumen in upočasnjuje hitrost staranja kruha (Batič, 2001).

### 2.3.1.3 Rezistentni škrob

Rezistentni škrob predstavlja skupina škrobov in produktov razgradnje škroba, ki se absorbirajo v tankem črevesu in so fizikalno nedostopni amilazam. Rezistentni škrob se razdeli na štiri skupine: fizično nedostopen škrob (RŠ1), rezistentna škrobna zrna (RŠ2), retrogradiran škrob (RŠ3) in kemijsko modificiran škrob (RŠ4). Glavni vir RŠ1 predstavljajo stročnice, saj s svojo debelo celično steno preprečijo encimom dostop do škroba. S kuhanjem in obdelavo (drobljenje, mletje) živila pa škrob postane bolj dostopen prebavnim encimom. Največ RŠ2 najdemo v nezrelih bananah in surovem krompirju. Z razliko od banane, se krompir pred zaužitjem skuha, kar povzroči ž elatinizacijo škroba. Kuhanje, ohlajanje in konzerviranje živil brez predhodnega sušenja povzroči retrogradacijo (rekristalizacijo) škroba (RŠ3). RŠ4 zajema zamrežen škrob, škrobne estre in etre. Kemijska modifikacija škroba je vzrok za zmanjšano prebavljivost v tankem črevesu. RŠ se kot naravni vir prehranske vlaknine lahko dodaja k različnim živilom (kruh, žitarice za zajtrk, ekstrudirana živila, prigrizki, testenine, piškoti, jogurt,...) brez negativnega učinka na okus in teksturo živila (Gray, 2006; Brown in sod., 2001).

### 2.3.1.4 Pektin

Pektin je strukturni heteropolisaharid, v katerem se izmenjuje galakturonska kislina z ramnozo. Pektin je neprebavljiv polisaharid in prehaja skozi človeško črevo v bolj ali manj nespremenjeni obliki. Je topna vlaknina in ga v rastlini najpogosteje najdemo v obliki protopektina, ki je del rastlinske celične stene. Danes ga pridobivamo večinoma z ekstrakcijo iz jabolčnih tropin in lupin citrusov. Pektin lahko tvori gele, ki nastanejo različno hitro in po različnih postopkih. Pektin znižuje raven krvnega holesterola in to tako, da v črevesu poveča viskoznost, s tem se zmanjša absorpcija holesterola. Zavira tudi razvoj tumorjev in nase veže težke kovine. V debelem črevesju ga črevesne bakterije razgradijo, in pri tem se sprostijo kratkoverižne maščobne kisline, ki dobro vplivajo na zdravje. Največ pektina vsebujejo jabolka, slive, kosmulje, pomaranče in drugi citrusi, malo pa ga je v češnjah, grozdju, jagodah,... Najpogosteje se pektin uporablja v prehrambeni industriji, kot sredstvo za želiranje, zgoščevanje in stabiliziranje (v marmeladah, želejih, sadnih sokovih, slaščicah, mlečnih in sirotkinih napitkih, solatnih prelivih, majonezah,...) (Kač in Jurca, 1994).

### 2.3.1.5 Oligosaharidi

Definicija oligosaharidov pravi, da so to glikozidi s 3 do 10 enostavnimi sladkorji povezanimi skupaj v verigo, ki pogosto vsebujejo nizek nivo mono- in di- ali polisaharidov. Lastnosti oligosaharidnih dodatkov so odvisne od kemijske strukture, molekulske mase in nivoja vsebnosti mono in disaharidov. Dodatki oligosaharidov z nizko molekulsko maso lahko vplivajo na temperaturo zamrzovanja živilskega izdelka. Oligosaharidi z dolgimi verigami pa lahko zaokrožijo občutek, ki ga daje živilo v ustih, in se zato uspešno uporabljajo v pripravi pijač s funkcionalnimi lastnostmi ali kot nadomestki maščob. Nahajajo se v številnih živilih, kot so sadje, zelenjava, mleko in med (Batič, 2001).

### 2.3.1.6 Inulin

Inulin je polisaharid iz fruktanov, ki se nahaja v različnih rastlinah kot rezervna oblika hrane. Dnevno povprečno zaužijemo 3 – 10 g inulina, največ z živali kot so cikorija, pšenica, čebula, por in česen. Večina inulina se za komercialno uporabo v živilski industriji pridobiva s sintezo iz saharoze ali z ekstrakcijo iz cikorijinih korenin. Cikorija je najbolj poznana kot nadomestek prave kave. Inulin lahko dobimo v obliki belega drobnega prahu, brez posebnega vonja, lahko je brez okusa ali pa blago sladek (10 % sladkosti saharoze). Živilska industrija vse pogosteje dodaja inulin v svoje izdelke, saj ima inulin izjemno prehransko in funkcionalno vrednost. Lahko ga uporabljamo kot nadomestek sladkorja, maščobe ali moke ter kot izboljševalec teksture živil. V vodi in mleku tvori mikrokristalne oblike, ki v ustih dajejo kremast občutek. Zaradi te organoleptične lastnosti lahko z inulinom nadomestimo maščobe v različnih namazih in kremah. Krajše molekule inulina (oligofruktoza) izboljšajo lastnosti živilom iz testa (pečeni izdelki so bolj voljni, piškoti so hrustljavi). Inulin izdelkom, ki so slajeni z umetnimi sladili, zakrije neprijetni okus po sladilih. Zaradi svojih prebiotičnih in fizioloških lastnosti ga uvrščamo med topno vlaknino (Meyer, 2001; Mičović, 2003).

## 2.3.2 Funkcionalne lastnosti prehranske vlaknine

Polisaharidi (rezistentni škrob, pektin, inulin, gume, itd.), ki se uporabljajo v živilstvu, imajo poleg lastnosti povečevanja vsebnosti PV v izdelku tudi ostale tehnološko pomembne lastnosti, kot so tvorba gelov, vezava vode, vezava olj, vezava mineralnih in organskih molekul. Tehnološke in fiziološke lastnosti funkcionalnih izdelkov z veliko vsebnostjo polisaharidov so povezane tudi s topnostjo v vodi. Polisaharidi (celuloza, hemiceluloza, itd.) so gradniki netopne PV predvsem rastlinskega izvora. Otrobi se že tradicionalno uporabljajo v pripravi izdelkov, kot so žitarice za zajtrk, različni kruhi in testenine. Slaba stran uporabe polisaharidnih dodatkov je omejeno vključevanje v živilske

izdelke, zaradi tehnoloških ovir (npr. zaradi sprememb konzistence in okusa izdelka (Batič, 2001).

Stranski produkti, ki nastanejo pri predelavi ali obdelavi hrane rastlinskega izvora: žitaric, sadja, zelenjave, tudi alg, so bogat vir PV. Ti stranski produkti z veliko vsebnostjo PV lahko obogatijo živila. Živila z dodano PV imajo zmanjšano energijsko vrednost, manjšo vsebnost holesterola in maščob. Stranski produkti lahko služijo tudi kot funkcionalna sestavina za izboljšanje fizikalnih in strukturnih lastnosti, od vezanja vode, zadrževanja maščob, viskoznosti, teksture, senzoričnih lastnosti in roka uporabnosti (Elleuch in sod., 2011).

Sekundarni produkti, bogati s PV in bioaktivnimi spojinami, so pomembni za predelovalce hrane. Potrošniki imajo raje naravne dodatke zaradi bojazni, da so sintetični dodatki vir toksičnosti. Najbolj reprezentativen primer stranskega produkta, bogatega z vlaknino, je ostanek pri industrijski predelavi lupine citrusov (obrobna površina perikarpa), ki predstavlja 25 % celotne teže sadeža. Sledijo mu sekundarni produkti pri predelavi ovsenih kosmičev, zelenih alg, pšeničnih otrobov, riževih kosmičev, sladkornega trsa in breskov koncentrat (Elleuch in sod., 2011).

Elleuch in sod. (2011) navajajo, da se stranski produkti z veliko vsebnostjo PV dodajajo v živilske izdelke kot poceni in brez energijska sredstva za povečevanje volumna živil. Delno lahko nadomestijo moko, maščobo in sladkor. Vplivajo na sposobnost zadrževanja vode in olja, ter povečajo antioksidantno učinkovitost in stabilnost emulzije. Odstotek vlaknine, ki se lahko dodaja pa je omejen. Previsoke količine vlaknine lahko povzročijo neželene spremembe v barvi in teksturi živil. Različni viri navajajo veliko poročil o dodatkih PV v živilske izdelke. Dodajajo jo v pecivo, pijače, slaščice, mlečne izdelke, zamrznjene mlečne izdelke, meso, testenine in juhe. Najpogosteje se vlaknina dodaja pekarskim izdelkom, ker jim zaradi svoje sposobnosti zadrževanja vode podaljšajo svežost. Na takšen način se zmanjšajo tudi ekonomske izgube. Dodatek vlaknine spremeni volumen, elastičnost, mehko in čvrstost kruha (Elleuch in sod., 2011).

Čedalje bolj je razširjena uporaba PV v mlekarški industriji. Najpogosteje se dodaja inulin, ki izboljšuje teksturo sirov in sladoledov. Zmanjšuje sinerezo v jogurtu in drugih fermentiranih mlečnih izdelkih. Izboljšuje teksturo in gladkost sladoleda, povečuje zaželeno odpornost na taljenje in ovira rast kristalov med nihanjem skladiščne temperature (Elleuch in sod., 2011).

Raziskave (Elleuch in sod., 2011) so pokazale, da lahko vlaknina nadomesti del industrijskega pektina v marmeladah. Jagodnemu džemu so dodali breskovo kašo, ki vsebuje veliko količino PV in tako ugotovili, da džemu izboljša psevdoplastične lastnosti, viskoznost in vsebnost PV.

PV se čedalje bolj uporablja tudi v mesno-predelovalni industriji. Mesnim izdelkom (sesekljano meso, klobase, fermentirane salame,...) dodatek vlaknine zmanjša energijsko vrednost, izboljša teksturo in stabilnost. Znani so tudi dodatki vlaknine v ribjih izdelkih. Rezultati raziskave (Elleuch in sod., 2011) kažejo, da dodatek topne PV, kot je npr. karagenan iz alg, guar ali ksantan iz semen, izboljša funkcionalnost ribjih izdelkov. Izboljša vezavo vode, zgoščevanje, emulzivnost in želirne sposobnosti zmletega ribjega mesa.

## 2.4 FIZIKALNO-KEMIJSKE IN FIZIOLOŠKE LASTNOSTI PREHRANSKE VLAKNINE

Raziskave o vplivu PV na človeški organizem so pokazale, da komponente vlaknine niso pomembne le za pravilno delovanje gastrointestinalnega trakta (GIT), temveč vplivajo tudi na metabolizem lipidov in glukoze ter celo na ravnotežje mineralov v sledovih. Ti vplivi PV izvirajo predvsem iz fizikalnih lastnosti, ki jih te snovi imajo (Koch in sod., 1993).

### 2.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti prehranske vlaknine

- **Sposobnost zadrževanja vode**

Kapaciteta zadrževanja vode ali hidracija vlaknine je definirana kot količina vode, ki se obdrži v 1 g suhe vlaknine pod posebnimi pogoji: temperatura, čas nabrekanja in hitrost centrifugiranja. Lastnost hidratacije PV je povezana s kemijsko strukturo vlaknine in drugih dejavnikov, kot so: poroznost, velikost delcev, ionska oblika, vrednost pH, temperatura, ionska moč, vrsta ionov v raztopini in fizikalna obdelava vlaknine (Elleuch in sod., 2011). Največjo sposobnost zadrževanja vode imajo pektinske snovi, sluzi in hemiceluloza, celuloza in lignin pa v manjšem obsegu (Jalili in sod., 2007). Zaradi vezave vode PV v prebavilih nabrekne in tako vpliva na hitrost praznjenja želodca, na absorpcijo hranljivih snovi v tankem črevesu, na prehod hrane skozi črevesje in povečanje količine izločenega blata (Koch in sod., 1993).

- **Viskozna in želirna sposobnost**

Nekatere komponente topne PV (npr.  $\beta$ -glukan iz ovsca), postanejo zelo viskozne ob prisotnosti vode. Pektinske snovi pa ob prisotnosti vode kažejo želirne sposobnosti. Te komponente vlaknine vplivajo na čas praznjenja črevesja in čas absorpcije v tankem črevesu (Mongeau in Brooks, 2003). Viskoznost narašča z višanjem koncentracije PV, pada pa ob povečevanju temperature raztopine (Elleuch in sod., 2011).

- **Antioksidativna učinkovitost**

Rastlinski neškrobni polisaharidi kažejo antioksidativne lastnosti in zato se jih lahko uporabi kot morebitne nove antioksidante. Različne frakcije polisaharidov iz riževih otrobov ponujajo zaščito pred superoksidnimi radikali, prostimi vodikovimi radikali in lipidno peroksidacijo. Kažejo tudi dober potencial zmanjševanja energije in kelacije kovinskih ionov (Elleuch in sod., 2011).

- **Kationska izmenjava**

Komponente PV se obnašajo kot šibki ionski izmenjevalci, saj vsebujejo veliko karboksilnih skupin. Kationska izmenjava je delno odvisna od prisotnosti uronske kisline v neesterificirani obliki. Več kot vlaknina vsebuje uronske kisline, večja je afiniteta do izmenjave kationov. Kadar govorimo o afiniteti mineralov do karboksilne skupine imata zelje in pšenični otrobi zelo veliko kapaciteto za izmenjavo kationov v primerjavi z pektinom. Ugotovljeno je bilo, da vlaknina iz pšeničnih otrobov lahko nase veže težke kovine in tako zmanjša njihovo toksičnost (Mongeau in Brooks, 2003).

- **Adsorpcija**

Gre za pojav adsorpcije organskih molekul, kot so žolčne kisline, steroli, toksične spojine. Netopna vlaknina, še posebej lignin, je sposobna vezati v svoj matriks gela substance, ki jih naše telo želi izločiti (Koch in sod., 1993).

- **Fermentabilnost**

Večina PV ostane nespremenjena dokler ne doseže debelega črevesa, kjer je razsežnost fermentacije odvisna od vira PV in drugih faktorjev, vključno s fizikalno strukturo, prisotnostjo določenih komponent vlaknine, vira dušika, bakterijske adaptacije in časa prehoda skozi gastrointestinalni trakt (GIT) (Mongeau in Brooks, 2003). Znane so različne ravni bakterijske razgradnje različnih komponent vlaknine v debelem črevesu. Npr., pektin, sluzi in gume se skoraj popolnoma fermentirajo, medtem ko se celuloza in hemiceluloza le delno razgradita. Lignin ostane nespremenjen. Vlaknina iz sadja in zelenjave velja za bolj fermentabilno, kot vlaknina iz žitnih otrobov (Jalili in sod., 2007).

## **2.4.2 Fiziološke lastnosti prehranske vlaknine**

Topna in netopna vlaknina se v GIT različno obnašata.

### **2.4.2.1 Netopna vlaknina**

Pri netopni vlaknini gre za »biodinamični« efekt v GIT. Komponente vlaknine nabrekajo v odvisnosti od njihove kapacitete zadrževanja vode in so v zelo majhnem obsegu substrati

intestinalne flore. Glavna značilnost netopne vlaknine je, da deluje kot t.i. balastna snov, kar pomeni da:

- poveča maso fecesa,
- skrajša čas prehoda skozi prebavni trakt,
- zmanjša absorpcijo maščob in žolčnih kislin, saj se le te ujamejo v fibrozno mrežo,
- zmanjša absorpcijo kancerogenih substanc, kar ima velik pomen pri preventivi raka na črevesju (Mason, 2007).

### Lignin

Lignin kot netopna vlaknina ima posebne lastnosti. Ne gre za polisaharid (ima le karakteristike podobne polisaharidom), tudi njegova aktivnost/učinek v GIT je drugačen od ostale netopne vlaknine. Njegova struktura je sestavljena iz polifenilpropanola, ki se n-krat ponavlja v strukturi. Lignin ima prav posebno vlogo pri preventivi raka. Intestinalna mikroflora transformira lignin v hormonsko podobne spojine (enterodiol in enterolaktron), ki imajo antiestrogene funkcije. Te spojine zmanjšujejo tvorbo tumorjev, ki so direktno povezani s hormonskim neravnovesjem (Mason, 2007).

#### 2.4.2.2 Topna prehranska vlaknina

Topna vlaknina je odporna na prebavne encime v tankem črevesu. Ima vlogo pri zmanjšanju telesne teže, saj v GIT tvori zelo viskozne raztopine, ki upočasnijo praznjenje črevesja in poleg tega daje občutek sitosti. Komponente vlaknine, kot so  $\beta$ -glukani in glukomanani povečajo viskoznost med prebavljanjem in s tem zmanjšajo absorpcijo substanc, kot so žolčne kisline in glukoza (Mason, 2007). Vse to ima velik pomen pri štirih glavnih aktivnostih komponent topne vlaknine:

- **Hipoholesterolni učinek**

Topna PV zmanjša nivo holesterola in LDL (lipoproteini nizke gostote), saj zmanjša vsebnost žolčnih kislin v tankem črevesu (zmanjša se njihova reabsorpcija), kar privede do zmanjšanja njihove koncentracije v enterohepatičnem ciklu. Tako morajo jetra za sintezo novih žolčnih kislin uporabiti plazmatski LDL (LDL v plazmi se tako zmanjša) (Gray, 2006).

- **Fermentacija**

Topno vlaknino v debelem črevesu delno metabolizira mikroflora. Torej se z vnosom topne vlaknine poveča število bifidobakterij in laktoznih bakterij (prebiotični učinek) na račun patogenih bakterij. Poveča se tudi produkcija maščobnih kislin s kratko verigo (propionska, očetna, maslena,...) (Jalili in sod., 2007).

Fiziološki učinek črevesne mikroflore:

- deluje kot imunomodulator, npr. absorbira prokarcinogene, spodbuja napad na maligne celice,
- zavira rast večine škodljivih plesni in bakterij,
- izboljša absorpcijo mineralov,
- zmanjša preobčutljivost in alergije na hrano,
- spodbuja rast zdrave črevesne mikroflore,
- zmanjša vsebnost nezaželenih snovi (amini, amoniak, fenoli, sekundarne žolčne kisline),
- produkcija hranil (vitamini B-kompleksa) in prebavnih encimov (Gray, 2006).

- **Zmanjšanje postprandialne glukoze**

Topna PV v prebavnem traktu regulira hitrost prebave in tako vpliva na glikemijski odziv telesa na zaužito hrano. Topna PV tako lahko:

- zadržuje prebavo škrobnih polisaharidov v želodcu,
- upočasnjuje prehod želodčne vsebine v dvanajstnik, znižuje difuzijo različnih saharidov v tankem črevesu, zadržuje hidrolizo polisaharidov v zgornjem delu tankega črevesa in
- zadržuje absorpcijo monosaharidov preko mikroresic epitelnih celic v jejunumu in zgornjem ileumu.

Rezultat teh procesov je počasnejši in postopnejši prehod glukoze iz prebavnega trakta v krvni obtok in s tem tudi manjši dvig krvnega sladkorja (Koch in sod., 1993).

- **Izboljšanje razpoložljivosti elementov (Mg, Ca, Cu, Zn)**

Netopna vlaknina ujame v svojo strukturo ione nekaterih elementov. Novejše študije so pokazale, da je zmožnost vlaknine, da kelira kovine povezana s pH vrednostmi v GIT (kelacija je večja, kadar je pH višji). Torej netopna vlaknina kelira kovine v najmanjši meri v želodcu (vrednost pH~2), potem pa se ta sposobnost kelacije večja tekom prebave (duodenum < ileum). Ravno obratno pa je pri topni vlaknini, ki izboljša biorazpoložljivost mineralov, kot so Ca, Mg in Fe. Pri topni vlaknini namreč pride do fermentacije in nastanka maščobnih kislin s kratko verigo, ki znižajo pH v tankem črevesu ter tako povečajo absorpcijo Ca v debelem črevesu (Gray, 2006).



## 2.5 VIRI PREHRANSKE VLAKNINE

Glavni vir PV je hrana rastlinskega izvora, to so žitna zrna, stročnice, zelenjava, sadje in semena, kot je prikazano v preglednici 2.

Delež skupne PV v hrani je odvisen od različnih faktorjev, kot so: sorta rastline, stopnja zrelosti, rastni pogoji in način predelave. Večina sadja in zelenjave vsebuje nizke količine PV (1,0 – 2,2 % SPV). Stročnice vsebujejo srednjo vrednost PV (okoli 4 % SPV), žita vsebujejo 1 – 2,2 % SPV (koruzna zrna) in 15,5 – 15,8 % SPV (ovseni otrobi). Vsebnost PV je odvisna tudi od vsebnosti vode v živilu. Žita imajo večjo vsebnost PV ravno zaradi manjše vsebnosti vode (do 10 % največ), medtem ko sadje in zelenjava vsebujeta od 80 – 90 % vode in posledično tudi manjšo vsebnost PV (Mongeau in Brooks, 2003).

**Preglednica 2:** Naravni viri različnih komponent prehranske vlaknine (Gray, 2006: 18)

| <b>Komponenta vlaknine</b>                  | <b>Glavni vir</b>   |
|---|---|
| celuloza                                    | zelenjava, lesnate rastline, žitni otrobi   |
| hemiceluloza                                | žitna zrna  |
| lignin                                      | žitni otrobi, luščine riža in stročnic, lesnate rastline  |
| β-glukan                                    | zrna (ovsa, ječmena, rži, pšenice)  |
| pektin                                      | sadje, zelenjava, stročnice, sladkorna pesa, krompir  |
| gume  | stročnice, morske alge, mikroorganizmi  |
| inulin in oligofruktani/fruktooligosaharidi | cikorija, artičoka, čebula  |
| oligosaharidi                               | humano mleko, zrnate stročnice  |
| rezistentni škrob                           | semena stročnic, žitna zrna, semena, surov krompir, zelene banane, staran kruh, koruzni kosmiči, ohlajen kuhan krompir in riž |

## 2.6 VPLIV PREDELAVE NA PREHRANSKO VLAKNINO

Preden živilo zaužijemo, ga v večini primerov tudi predhodno predelamo. Živila lahko skuhamo, konzerviramo, zamrznemo, blanširamo, predkuhamo (parboiled riž), ekstrudiramo, meljemo (Mongeau in Brooks, 2003). Pri toplotni obdelavi se porušijo glikozidne vezi, kar vodi do spremembe razmerja med topno in netopno PV, vsebnost SPV se zmanjša, fizikalno-kemijske lastnosti vlaknine se spremenijo (Elleuch in sod., 2011). Toplotna obdelava lahko tudi zmanjša celotno dolžino polisaharidnih verig, kar zmanjša viskoznost in kapaciteto zadrževanja vode. Ekstrudiranje žit poveča vsebnost SPV in topne PV. Pri predelavi riža (luščenje, predkuhanje) se odstrani semenski plašč, s tem pa tudi

večina PV (Mongeau in Brooks, 2003). Mehanska obdelava živil, kot je mletje, močno vpliva na lastnosti PV. Uničijo se mesta za vezavo vode in s tem se posledično zmanjša sposobnost vezave vode. Pri mletju postane endosperm žitnega zrna dostopen prebavnim encimom v zgornjem delu prebavnega trakta, s tem pa postane PV bolj dostopna črevesni mikroflori. Encimska obdelava živil spremeni razmerje med topno in netopno PV (Elleuch in sod., 2011).

## 2.7 PRIPOROČILA ZA UŽIVANJE VLAKNINE

Orientacijska vrednost za vnos SPV določena za odrasle je najmanj 30 g na dan; to je približno 12,5 g na 1000 kcal zaužite energije pri ženskah in 10 g na 1000 kcal zaužite energije pri moških. Če je vnos energije nižji od starostno in spolno specifičnih orientacijskih vrednosti, mora biti vnos vlaknine večji od 3 g (12,5 oz. 10 g/1000 kcal). Za otroke mlajše od enega leta slovenska zakonodaja ne navaja orientacijskih vrednosti za vnos PV. Materino mleko sicer vsebuje oligosaharide, ne pa prehranske vlaknine (Referenčne vrednosti..., 2004).

Ameriška priporočila za uživanje PV svetujejo, da naj bi odrasel človek zaužil 25 – 30 g SPV na dan ali 10 – 13 g/1000 kcal; dodajajo pa še, da naj bi bilo razmerje netopne proti topni vlaknini 3:1 (Gray, 2006).

**Preglednica 3:** Priporočila za dnevni vnos prehranske vlaknine (Institute of Medicine, 2005; Health Council of the Netherlands..., 2006)

| <b>Priporočila za vnos SPV (g/dan)</b> |                                |   |
|--|--------------------------------|---|
| <b>Starost</b>                         | Institute of Medicine,<br>2005 | Health Council of The<br>Netherlands..., 2006 |
| <b>otroci do 1 leta</b>                | nedoločeno                     | nedoločeno                                    |
| <b>otroci</b>                          |                                |   |
| 1-3 leta                               | 19                             | 15  |
| 4-8 let                                | 25                             | 25  |
| <b>moški</b>                           |                                |   |
| 9-13 let                               | 31                             | 30  |
| 14-50 let                              | 38                             | 40  |
| 51-70 let                              | 30                             | 35  |
| > 70 let                               | 30                             | 30  |
| <b>ženske</b>                          |                                |   |
| 9-13 let                               | 26                             | 25  |
| 14-50 let                              | 25                             | 30  |
| 51-70 let                              | 21                             | 25  |
| > 70 let                               | 21                             | 25  |
| <b>nosečnice</b>                       | 28                             | + 5   |

## 2.8 METODE DOLOČANJA VSEBNOSTI PREHRANSKE VLAKNINE

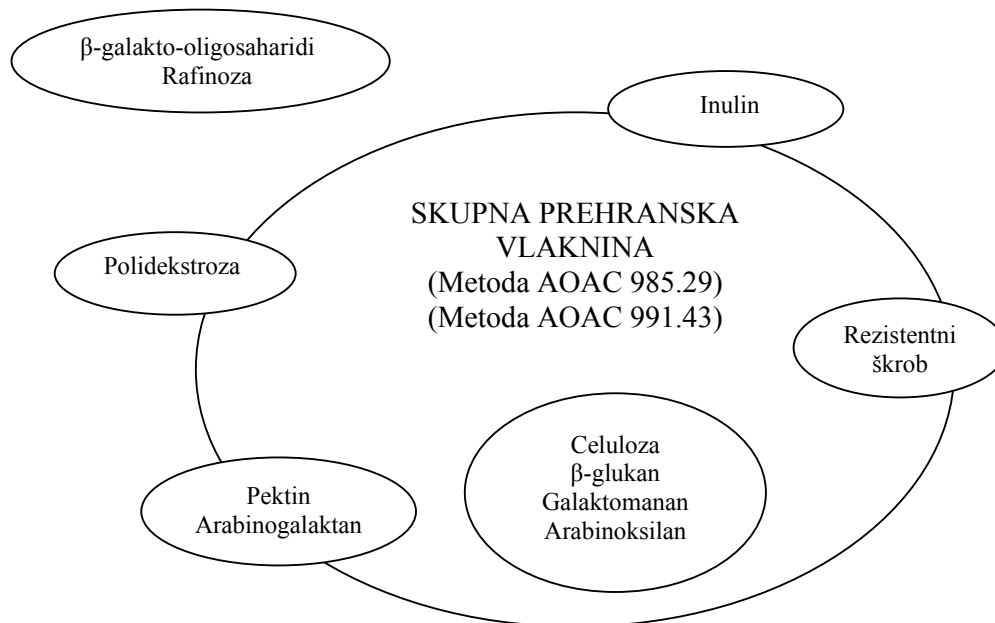
Izraz prehranska vlaknina vključuje skupino različnih komponent, zato mora biti vsaka metoda za določanje vsebnosti PV tesno povezana z definicijo PV (McCleary, 2007).

Raziskovalci iz Evrope in ZDA so na osnovi Trowellove definicije razvili primerno analizno metodo. Ta metoda je bila odobrena kot uradna metoda AOAC 985.29, katero bolje poznamo pod imenom Proskyjeva metoda. Tej metodi so sledile poznejše spremembe, kot je npr. metoda AOAC 991.43, pri kateri je zamenjan pufer. Cilj teh metod je bila natančna določitev vsebnosti SPV v rastlinskih proizvodih in živilih. Natančneje, cilj metod je bila hidrolizacija in odstranjevanje škroba ter beljakovin iz živilskega matriksa. Vsak vzorec se analizira v dveh ponovitvah, oborjen ostanek se posuši in stehta. Ena ponovitev se porabi za analizo vsebnosti pepela, druga pa za analizo vsebnosti beljakovin. Končne mase se odštejejo od povprečne mase ostanka (Megazyme, 2011).

Pri uporabi metod so ugotovili, da se pri analiznem postopku škrob ne hidrolizira in odstrani v celoti. To je pripeljalo do odkritja t.i. rezistentnega škroba (RŠ). Nato pa se je pojavilo vprašanje, ali naj se RŠ določi in doda skupni prehranski vlaknini ali ga je treba analitično odstraniti in prezreti. Ker se RŠ izogne prebavi v človeškem tankem črevesu, je bilo soglasno mnenje, da ga je treba vključiti v analizo PV. Raziskava v 90-tih letih je pokazala, da metoda AOAC 991.43 RŠ ne določi v celoti, zato so se razvile alternativne metode, s katerimi naj bi RŠ določili natančno. Večina teh metod je podajala podobne rezultate o vsebnosti RŠ v podobnih vzorcih, vendar ni nobena prestala medlaboratorijskega ocenjevanja (Megazyme, 2011).

V sredini 90-ih let je bil sprejet dogovor, da se med PV vključi tudi neškrobne polisaharide. Temu je sledil razvoj novih analiznih metod: za določanje vsebnosti fruktana (in frukto-oligosaharidov) metodi AOAC 997.08 in 999.03, za galakto-oligosaharide metoda AOAC 2001.03 in za polidekstrozo metoda AOAC 2000.11. Razvite metode so postale zelo uporabne za analitsko določanje specifičnih komponent PV. Vendar se je pri določitvi SPV v živilih pojavil problem dvojnega štetja nekaterih komponent vlaknine.

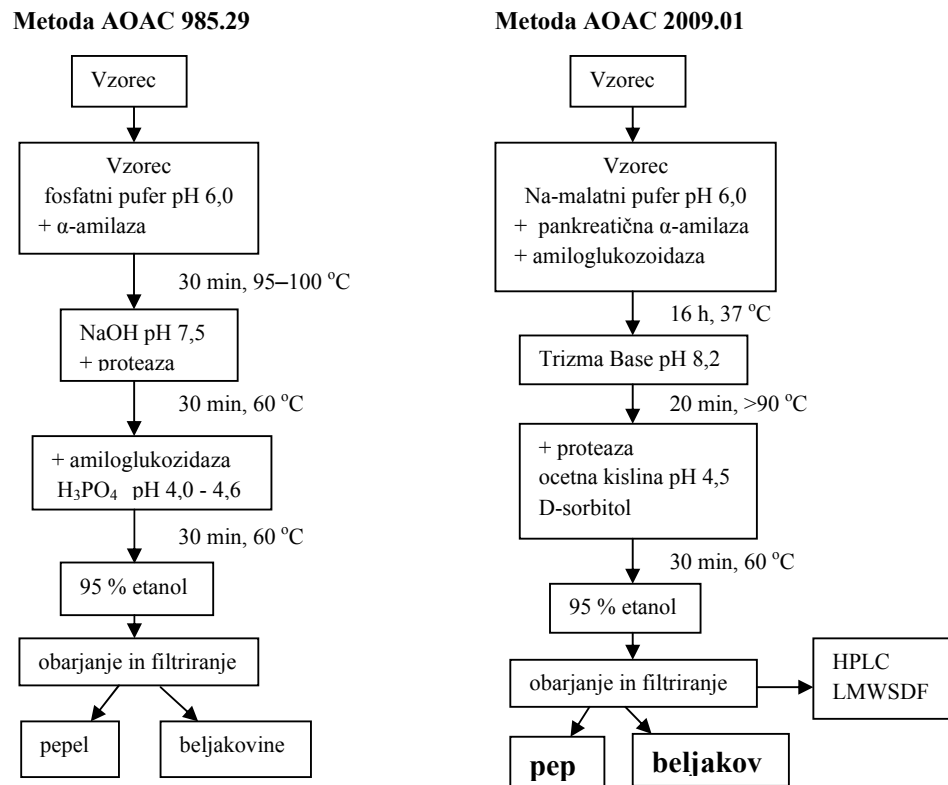
Za mnoge komponente PV (vključno z RŠ, inulinom, rezistentnimi maltodekstrini, itd.) se del komponent določi že z metodo AOAC 991.43. Če komponento (npr. RŠ) določamo ločeno, končne vsebnosti ne moremo preprosto prišteti vrednosti za SPV, ker se bodo komponente PV, ki so znotraj velikega obroča (slika 1) štete dvakrat (Megazyme, 2011).



**Slika 1:** Shematska predstavitev komponent prehranske vlaknine, ki se jih določi/nedoloči z metodama AOAC 985.29 in 991.43 (McCleary in sod., 2009b)

Problem dvojnega štetja je raziskovalce vodil k razvoju takšne metode, ki bi omogočila določanje SPV, vključno z RŠ in neprebavljivimi oligosaharidi. McCleary je leta 2007 objavil enotno analizo metodo za določanje SPV, v kateri združuje več metod AOAC: 2002.02 (RŠ), 991.43 (topna in netopna vlaknina), 2001.03 (rezistentni maltodekstrini) in 985.29 (SPV). Ta enotna metoda za določanje vsebnosti SPV z nazivom AOAC 2009.01 je bila leta 2009 uspešno priznana s strani AOAC International. Z metodo se lahko ločeno določi netopno PV (IDF – insoluble dietary fibre), topno visoko in nizko molekularno PV (HMWSDF – high molecular weight soluble dietary fibre in LMWSDF – low molecular weight soluble dietary fibre) (Megazyme, 2011).

Metoda AOAC 2009.01 z zagotavljanjem 16-urne razgradnje škrobnega deleža pri 37 °C natančneje posnema razgradnjo OH v človeškem telesu kot predhodni metodi AOAC 985.29 in 991.43, pri katerih se škrob razgrajuje pri 100 °C v 30 minutah (slika 2).



**Slika 2:** Shematičen prikaz določanja prehranske vlaknine z metodo AOAC 985.29 (Proszyjeva metoda) in metodo AOAC 2009.01 (Paeschke in Aimutis, 2011)

Metoda AOAC 2009.01 uporablja encim  $\alpha$ -amilazo iz prašičje trebušne slinavke, medtem ko se pri metodi AOAC 985.29 in 991.43 uporablja termostabilna glivična  $\alpha$ -amilaza, ki slabše posnema prebavo sesalcev. Nedvomno je nova metoda za določanje vsebnosti PV v primerjavi z drugimi metodami veliko boljša, čeprav se z njo ne določi deleža topne viskozne PV, kot se z metodo AOAC 991.43 (Paeschke in Aimutis, 2011). Nova metoda zagotavlja korak naprej pri analizi vseh komponent PV, vključenih v Codex Alimentarius definicijo. S to metodo bolje določamo tisto komponento vlaknine, ki je fiziološko pomembna (McCleary in sod., 2009a).

Ključni koraki v metodi so:

- a. Inkubacija vzorca s pankreatično  $\alpha$ -amilazo in amiloglukozidazo za izvedbo hidrolize nerezistentnega škroba. V tej stopnji je ključna čistost encimov, da ne pride do depolimerizacije in izgub HMWSDF ter, da ne pride do degradacije LMWSDF.
- b. Denaturacija beljakovin z inkubacijo vzorca pri 90 – 100 °C. Ta korak je potreben za toplotno neobdelane vzorce, saj se drugače beljakovine ne bi pod vplivom proteaze hidrolizirale in depolimerizirale. Prilagoditev vrednosti pH na 8 pred segrevanjem na 90 – 100 °C prepreči delovanje amiloglukozidaze med samim segrevanjem. Pankreatična  $\alpha$ -amilaza se inaktivira precej pod temperaturo želiranja RŠ (>60 °C).
- c. Prilagoditev vrednosti pH do ~ 4,3 in obarjanje HMWSDF s 4-kratno količino etanola. Nabiti polisaharidi se lahko pri različnih pH vrednostih različno obarjajo. Zato je izbrana pH vrednost za to stopnjo ostala enaka kot pri metodi AOAC 985.29.
- d. Filtriranje oborjenih HMWSDF in netopne PV na steklenih filtrirnih lončkih, spiranje z etanolom in acetonom ter sušenje do konstantne teže (sušina). Po prilagoditvi vrednosti pH reakcijske raztopine na 4,3 se alikvot (1.0 mL) raztopine odstrani za določitev dostopnih OH. Doda se 1 mL internega standarda (D-sorbitol). LMWSDF se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) zato se filtrat koncentrira, razsoli in rekoncentrira.

Opisana metoda je bila pod okriljem AACC in AOAC International predmet medlaboratorijskega ocenjevanja. Sodelovalo je 18 laboratorijev in od teh jih je 16 podalo veljavne rezultate. Testirali so 16 testnih vzorcev, ki so vsebovali različne tradicionalne komponente PV, RŠ in neprebavljive oligosaharide. Vsebnost SPV v 8 poskusnih parih se je gibala med 11,57 – 47,83 %. Ponovljivost standardne deviacije je znašala med 0,41 – 1,43, obnovljivost standardne deviacije pa se je gibala med 1,18 – 5,44. Ti rezultati so bili primerljivi z ostalimi uveljavljenimi metodami za določanje vsebnosti PV, zato je bila metoda ne tej stopnji sprejeta kot metoda AACC 32-45.01 in kot metoda AOAC 2009.01 (McCleary, 2010).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT DELA

Cilj naše raziskave je bila vpeljava in validacija skrajšane metode AOAC 2009.01 za določanje vsebnosti prehranske vlaknine v različnih živilih. Z validacijo smo želeli potrditi ustreznost izbrane analizne metode, ter določiti mejo zaznavnosti (LOD), mejo določljivosti (LOQ) in delovno območje. Preverili smo njeno pravilnost, ponovljivost in obnovljivost. Iz dobljenih podatkov validacije smo izračunali kombinirano in razširjeno negotovost izbrane metode. Del dobljenih rezultatov smo primerjali z že obstoječimi v literaturi.

#### 3.2 MATERIAL

V raziskavi smo uporabili več vrst različnih živil z različno vsebnostjo prehranske vlaknine, vode, maščobe, OH in beljakovin. Za validacijo analizne metode in vrednotenje merilne negotovosti je potrebno upoštevati različne tipe vzorcev, matriksa in različna koncentracijska območja analita.

Za analizo smo uporabili naslednje vzorce:

- pšenično moko CRM (Wheat flour T2438),
- radič Castelfranco, (kupljen na tržnici Koper, izvor Primorska, sveži vzorec vsebuje 90,6 % vode in 9,4 % suhe snovi, zračno sušen vzorec pa vsebuje 8,50 % vode in 91,5 % suhe snovi),
- prepečenec (kupljen v trgovini, povprečna hranilna vrednost na 100 g: beljakovine: 10,9 g, OH: 71,0 g, maščoba: 6,6 g, PV: 5,0 g),
- cvetačo (hitro zamrznjen izdelek, kupljena v trgovini, povprečna hranilna vrednost na 100 g: beljakovine: 2,0 g, OH: 5,3 g, maščobe: 0,1 g),
- mini roladice - polnjen biskvit z mlečno kremo (kupljene v trgovini, povprečna hranilna vrednost na 100 g : beljakovine: 5 g, OH: 55 g, maščobe: 26 g),
- ovsene kosmiče (Porridge oats T2443),
- fižol Češnjevec (v zrnju, kupljen na tržnici Koseze, izvor Ljubljana, vzorec vsebuje 13,01 % vode in 86,99 % suhe snovi),
- špinačo (zračno sušena, 100 g suhi vzorec vsebuje 3,45 % vode, 96,55 % suhe snovi, 15,18 % pepela, 37,0 % beljakovin in 31,6 % PV),

- 100 % sok iz sveže stisnjenega grozdja, jagod, malin in jabolk (kupljen v trgovini, povprečna hranilna vrednost na 100 ml: beljakovine: 0,49 g, OH: 13,9 g, maščobe: 0,0 g, PV: 0,53 g).

Vzorci smo homogenizirali na gospodinjskem mlinčku in jih dobro zaprte v plastičnih posodah hranili v hladilniku. Vzorec cvetače smo zaradi hitre pokvarljivosti hranili v zamrzovalniku in ga pred uporabo odtalili na sobni temperaturi.

### 3.3 METODE DELA

Kemijske analize in celotno raziskovalno delo je bilo opravljeno na Zavodu za zdravstveno varstvo Novo mesto v Sanitarno-kemičnem laboratoriju.

#### **3.3.1 Določanje skupne prehranske vlaknine z metodo AOAC 2009.01** (AOAC Official Method 2009.01..., 2010)

Pri našem delu smo izvajali vse korake metode, opisane pod točko 2.8, zadnji del metode – določanje topne nizkomolekularne prehranske vlaknine (LMWSDF) pa smo izpustili.

#### **Princip**

Skrajšana metoda je primerna za določanje skupne prehranske vlaknine (SPV), vključno z rezistentnim škrobom. Metoda združuje ključne faze metod AOAC 2002.02, AOAC 985.29, AOAC 991.43 in AOAC 2001.03. Vzorec v dveh vzporednih določitvah inkubiramo s pankreatično  $\alpha$ -amilazo in amiloglukozidazo 16 ur pri 37 °C v zaprtih 250 mL steklenicah v mešalni vodni kopeli. Med tem časom nerezistentni škrob pod vzajemnim učinkom obeh encimov postane topen in hidrolizira v D-glukozo in maltozo. Reakcijo ustavimo s prilagoditvijo vrednosti pH in začasnim segrevanjem. Beljakovine v vzorcu razgradimo z dodatkom proteaze. Za določanje visoko molekularne PV (HMWDF) dodamo etanol. Preostanek ujete netopne in oborjene topne PV speremo z etanolom in acetonom, posušimo in stehtamo. Eno določitev preostanka uporabimo za določanje beljakovin, drugo pa za določanje pepela. Vzporedno z vzorcem analiziramo tudi slepi vzorec, da ugotovimo vplive reagentov na ostanek. Delež SPV v vzorcu predstavlja ostanek po sušenju, ki mu odštejemo vsebnost beljakovin in pepela ter vsebnost SPV v slepem vzorcu.



## Aparature

- mlinček,
- inkubacijske steklenice (250 mL),
- filtrirni lončki,
- presesalna buča,
- tesnila za filtriranje,
- vakuumška črpalka,
- mešalna vodna kopel,
- tehtnica,
- sušilnik,
- štoparica,
- eksikator,
- pH meter,
- termometer,
- avtomatska pipeta,
- magnetno mešalo,
- žarilna peč,
- ultrazvočna kopel,
- centrifuga.

## Reagenti

- etanol 95 % (v/v),
- etanol 78 % (v/v),
- aceton,
- raztopina amiloglukozidaze (3,4 enot/mL) in pankreatične  $\alpha$ -amilaze (50 enot/mL)),
- proteaza (50 mg/mL; 350 tirozinskih enot/mL),
- Trizma Base (0,75 M),
- Na-malatni pufer,
- raztopina očetne kisline (2 M),
- raztopina Na-azida (0,02 % w/v),
- pH standardi,
- celit,
- krom žveplena kislina ( $\text{Cr-H}_2\text{SO}_4$ ),
- standardizirana 0,1 M HCl,
- n-heksan.

## Postopek

### Priprava filtrirnih lončkov

Filtrirne lončke dobro očistimo in speremo z destilirano vodo. Dodatno čistost dosežemo z uporabo krom žveplene kisline. Nato lončke s pomočjo vakuuma spiramo z večjo količino destilirane vode in 78 % etanolom. V rahlo osušene lončke natehtamo približno 1 g celita in ga pod vakuumom dobro speremo z destilirano vodo in nato še z 78 % etanolom, dokler ni filtrat bister. Paziti moramo, da se celit dobro premeša in da na dnu filtrirnega lončka tvori enakomerno razporejeno plast. Posušene lončke žarimo v žarilni peči 1 h na 525 °C, ohladimo v eksikatorju in stehamo z natančnostjo  $\pm 0,001$  g.

### Priprava vzorca

Vzorce pripravimo v takšni obliki, kot so primerni za uživanje (npr: testo spečemo, testenine skuhamo,...). Če je v vzorcu več kot 10 % maščobe, vzorec razmastimo. Za vzorce z veliko vsebnostjo vode (>25 %) je priporočljiva predhodna liofilizacija. Vzorec zmeljemo na približno 0,5 mm velike delce, ga pretresemo v plastičen lonček s širokim vratom, dobro premešamo in zapremo. Do uporabe ga hranimo v hladilniku.

### Razmaščevanje vzorca

Če vzorec vsebuje več kot 10 % maščob, ga razmastimo. K odtehti vzorca dolijemo 20 mL n-heksana in pretresemo v ultrazvočni kopeli. Vzorec nato prelijemo v epruveto in centrifugiramo 15 min pri 3000 obratih/min. Heksan z raztopljeno maščobo odlijemo in postopek ponavljamo do bistrega supernatanta.

### **Analiza**

Vzporedno z vzorcem delamo tudi slepi vzorec, da ugotovimo vplive reagentov na ostanek. Slepi vzorec analiziramo v dveh ponovitvah, po enakem postopku kot za vzorec, vendar brez dodanega živila.

#### a. Encimska razgradnja vzorca

Odtehtamo  $1,000 \pm 0,005$  g vzorca v 250 mL steklenico s širokim vratom. Če je potrebno vzorec razmastiti odtehtamo približno 1,2 g nerazmaščene vzorca. Vzorec omočimo z 1 mL etanola in dodamo 40 mL mešanice pankreatične  $\alpha$ -amilaze in amiloglukozidaze. Vzorčno raztopino inkubiramo v mešalni vodni kopeli pri 37 °C točno 16 ur. Po končani inkubaciji vzamemo steklenice iz vodne kopeli in takoj dodamo 3 mL 0,75 M raztopine Trizma Base, da s spremembo vrednosti pH na 8,2 zaključimo reakcijo. Steklenice rahlo zapremo in postavimo v vodno kopel (ne-mešalna) s 95 – 100 °C za 20 minut. Občasno ročno premešamo in preverimo temperaturo. Steklenice nato vzamemo iz vroče kopeli in jih ohladimo na približno 60 °C. V raztopino odpipetiramo 0,1 mL raztopine proteaze in jih ponovno inkubiramo na 60 °C za 30 minut. Delovanje proteaze zaustavimo z dodatkom 4 mL 2 M raztopine očetne kisline (znižanje vrednosti pH na 4,3) in dobro premešamo.

#### b. Obarjanje skupne prehranske vlaknine

Pri sobni temperaturi odmerimo 180 mL 95 % etanola, ga segrejemo na 60 °C in dodamo raztopini vzorca. Previdno premešamo in pustimo obarjati 1 uro na sobni temperaturi. Oborino, ki vsebuje topno in netopno PV s pomočjo vakuumske črpalke prefiltriramo skozi

pripravljen in predhodno stehtan filtrirni lonček. Preostanek na filtru spiramo: 2-krat s 15 mL 78 % etanola, 2-krat s 15 mL 95 % etanola in 2-krat s 15 mL acetona.



**Slika 3:** Filtriranje oborjene vzorčne raztopine

Filtrirne lončke z ostankom na celitu dve uri sušimo v sušilniku pri 105 °C, ohladimo v eksikatorju (1 h) in stehtamo z natančnostjo ± 0,001 g. Ostanek ene ponovitve uporabimo za določanje vsebnosti beljakovin po Kjeldahlu, drugega pa za določanje pepela.

### Izračun

$$\text{Vsebnost SPV (g/100 g)} = \frac{(S - B - P - SL) \cdot 100}{m \cdot 1000} \quad \dots(1)$$

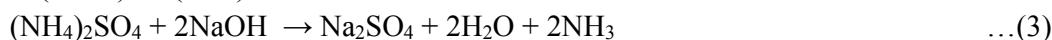
- S masa ostanka vzorca po sušenju (mg) =  $(m_2 - m_1) \cdot 1000$ ,  
 $m_1$  masa praznega filtrirnega lončka (g),  
 $m_2$  masa filtrirnega lončka z ostankom po sušenju (g),  
 B masa beljakovin v vzorcu (mg) (enačba 7),  
 P masa pepela v vzorcu (mg) (enačba 8),  
 SL vsebnost vlaknine v slepem vzorcu (mg) =  $S - B - P$ ,  
 m odtehta vzorca (g),  
 100 faktor za pretvorbo na 100 g,  
 1000 faktor za pretvorbo v g.

### 3.3.2 Določanje dušika v živilih po Kjeldahlu

(ISO 1871:2009(E), 2009)

#### Princip

Metoda temelji na oksidativnem razklopu vzorca s koncentrirano žveplovo kislino v prisotnosti katalizatorja. Pri tem se prevede organski dušik v amonijev sulfat. Dodamo prebitok natrijevega hidroksida, sproščeni amoniak predestiliramo z vodno paro v prebitno količino borove kisline. Sledi titracija raztopine nastalega amonijevega borata s standardizirano klorovodikovo kislino. Vsebnost dušika v vzorcu izračunamo glede na porabo klorovodikove kisline.



Če enačbi (4) in (5) združimo:



Iz enačb (2) - (6) sledi:

$$1 \text{ mol HCl} = 1 \text{ mol N} = 14 \text{ g N}$$

$$n_{\text{HCl}} = n_{\text{N(živilo)}}$$

Metoda je primerna za določanje dušika v živilih in krmilih, v koncentracijskem območju nad 0,02 % N. Z metodo ne določamo nitritov in nitratov.

#### Reagenti

Topila in raztopine:

- koncentrirana žveplova kislina ( $\rho_{20}(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/mL}$ ),
- katalizator (Kjeldahlove tabletki - bakrov(II) sulfat(VI), brez Hg, Se),
- natrijev hidroksid (NaOH 33 %),
- raztopina borove kisline ( $\text{H}_3\text{BO}_4$  4 % (m/V)),
- raztopina standardizirane klorovodikove kisline  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$ .

## Aparature

- epruvete za sežig in destilacijo v Büchijevi aparaturi,
- sežigna enota Büchi s pralnikom plinov,
- destilacijska enota KjelFlex,
- merilni valj ali merilna pipeta,
- polnilne pipete (10 mL in 50 mL),
- erlenmajerice (300 mL s širokom grlom),
- titrator (naziv: 848 Titrino plus, proizvajalec: Metrohm, serijska številka: titrino: 1848001010149, elektroda: uniroda Pt1000 WOC (Plug U), program: DUSIK).

## Postopek

### Priprava slepega in kontrolnega vzorca - test razklopa

Slepi vzorec izvajamo v dveh vzorednih določitvah, v vsaki seriji meritev. Namesto vzorca odtehtamo približno 0,5 g saharoze (da se porabi kislina) in dalje postopamo enako kot z vzorcem.

Test razklopa delamo v dveh vzorednih določitvah, v vsaki seriji meritev. Namesto vzorca odtehtamo 180 mg standarda - triptofana, dodamo približno 0,5 g saharoze in delamo po spodaj opisanem postopku. Izkoristek sežiga in destilacije skupaj mora biti med 98 – 101 %. Teoretična vrednost vsebnosti dušika v triptofanu znaša 13,58 %. Če meritve presegajo dovoljene vrednosti, mora analitik poiskati vzroke in serijo ponoviti. Možni vzroki so lahko npr. napaka v izračunu, napaka pri pripravi standardnih raztopin in reagentov, pretečeni rok uporabe standardov in reagentov, kontaminacija ali nedosledno izvajanje analiznega postopka.

## Analiza

### a. Razklop

Vsebino filtrirnega lončka (sušina + celit) kvantitativno prenesemo v Kjeldahlovo epruveto, dodamo 2 tableti katalizatorja bakrovega sulfata ter 25 mL žveplave kisline. V Büchijevi sežigni enoti sprva sežigamo počasi pri 180 – 230 °C, do belih par, nato pa na visoki temperaturi pri 410 – 430 °C približno 2 uri oz. dokler ni vzorec bister.

## b. Destilacija

Ohlajen vzorec razredčimo s 25 mL destilirane vode in vstavimo v KjellFlex destilacijsko aparaturu. Destilat lovimo v erlenmajerico s širokim grlom ali v čaše, v kateri je 60 mL borove kisline. Količina destilata naj bo vsaj 150 mL in naj bo dovolj hladen (največ 25 °C). Konica cevke, po kateri se steka destilat, mora biti potopljena v borovo kislino.

## c. Titracija

Destilat titriramo z 0,1 M HCl do ekvivalentne točke oz. do vrednosti pH 4,65. Ekvivalentno točko določimo potenciometrično. Porabo kisline zabeležimo.

## Izračun

$$\text{Beljakovine (mg/100 g)} = \left( \frac{(V_1 - V_0) \cdot c_t \cdot 14}{m \cdot 100} \right) \cdot 6,25 \quad \dots(7)$$

|       |  |
|-------|--|
| m     | masa ostanka po sušenju (g),             |
| $c_t$ | koncentracija HCl (mol/L),               |
| $V_0$ | poraba HCl za slepo,                     |
| $V_1$ | poraba HCl za vzorec,                    |
| 14    | molska masa dušika (g/mol),              |
| 6,25  | faktor za preračun dušika v beljakovine. |

### 3.3.3 Določanje vsebnosti pepela v živilih (AOAC Official Method 2009.01..., 2010)

#### Princip

Vzorec sežigamo pri temperaturi 525 °C. Preostanek po sežigu stehamo.

#### Postopek

Filtrirne lončke s sušino žarimo v žarilni peči 5 ur, pri 525 °C. Ko se peč ohladi na približno 100 °C, lončke s pepelom prenesemo v eksikator, pustimo, da se ohladijo na sobno temperaturo in stehamo.

## Izračun

$$\text{Vsebnost pepela (mg)} = (m_2 - m_1) \cdot 1000 \quad \dots(8)$$

$m_1$  masa praznega filtrirnega lončka (g),  
 $m_2$  masa filtrirnega lončka s pepelom (g),  
 1000 faktor za pretvorbo v mg.

### 3.3.4 Pregled parametrov validacije

Validacija metode je zadnji korak v postopku razvoja analizne metode. Validacija analizne metode je postopek, s katerim ovrednotimo karakteristike analizne metode in potrdimo, ali je metoda primerna za določeno analizno uporabo ali ne. Metoda mora biti ponovljiva v izvedbi drugih analitikov na drugi ekvivalentni opremi, v drugih dneh in lokacijah in ves čas uporabe te analizne metode (Lukša, 1996).

V laboratoriju moramo, če hočemo validirati neko metodo, najprej pripraviti plan dela, nato izvesti meritve, ki nedvoumno odgovorijo na zastavljena vprašanja in vse skupaj natančno dokumentirati. Z validacijo moramo dokazati, da ima izbrana metoda ustrezno strokovno ozadje in da je pravilno prirejena za določen tip analize. Validacija metode in kasnejša rutinska analitika se delata samo z dokumentirano validirano merilno opremo in s primerno usposobljenim osebjem. Po priporočilih dobre laboratorijske prakse moramo pri validaciji metode določiti naslednje parametre: selektivnost, natančnost, pravilnost, linearnost, delovno območje, mejo zaznavnosti, mejo določljivosti in robustnost metode (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Analizno metodo za določanje vsebnosti skupne prehranske vlaknine AOAC 2009.01 smo ovrednotili z naslednjimi validacijskimi parametri:

- **Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)**

LOQ je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko kvantitativno ovrednotimo s sprejemljivo natančnostjo in točnostjo. Vzorec z najnižjo koncentracijo preiskovane količine analiziramo v 9 vzporednih določitvah po danem analiznem postopku v krajšem času, izračunamo povprečno vrednost in standardni odmik. LOD izračunamo kot 3-kratno vrednost standardnega odmika, LOQ pa izračunamo kot 10-kratno vrednost standardnega odmika (Eurachem Working Group, 1998).

$$\text{LOD} = 3 \cdot s \quad \dots(9)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot s \quad \dots(10)$$

- **Delovno območje**

Delovno območje metode je interval, v katerem predpisana metoda daje rezultate, ki imajo ustrezno ponovljivost, točnost in linearnost. Določimo ga z merjenjem vzorcev, ki vsebujejo različne koncentracije merjene spojine (Eurachem Working Group, 1998).

- **Pravilnost (angl. accuracy)**

Pravilnost ali točnost analizne metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analizne metode dobimo pravilne (točne) rezultate. Točnost je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Pravo vrednost dobimo na dva načina. Eden je primerjanje rezultatov z analizo certificiranih referenčnih materialov (CRM). Preverjanje poteka tako, da ustrezen CRM analiziramo po predpisanem postopku in dobljeno povprečno vrednost primerjamo s certificirano vrednostjo. Dobljena povprečna vrednost se mora nahajati znotraj intervala: certificirana vrednost  $\pm$  interval zaupanja (Eurachem Working Group, 1998).

Referenčni materiali so pomembno orodje za uresničevanje številnih vidikov kakovosti merjenja, saj se uporabljajo za validacijo metod, kalibracijo, ocenjevanje merilne negotovosti, šolanje in notranje obvladovanje kakovosti, pa tudi za zunanje preverjanje usposobljenosti (proficiency testing). Za različne funkcije se zahtevajo različni referenčni materiali. Tako je na primer za validacijo metod zaželen certificiran referenčni material (CRM), ki je po definiciji referenčni material s priloženim certifikatom, katerega ena ali več vrednosti določene lastnosti je certificiranih s postopkom, ki vzpostavlja sledljivost do točne realizacije enote, v kateri so vrednosti te lastnosti izražene, in pri kateri vsako certificirano vrednost spremlja negotovost z navedeno stopnjo zaupanja (Slovenska akreditacija 0A06, 2005).

Drugi način določanja pravilnosti metode je medlaboratorijska primerjava.

Medlaboratorijska primerjava pomeni organizacijo, izvedbo in ovrednotenje rezultatov merjenja ali preskušanja istih ali podobnih preskušancev/vzorcev, ki jih opravita dva ali več laboratorijev skladno z vnaprej določenimi pogoji. Medlaboratorijske primerjave so eno izmed najpomembnejših orodij, s katerimi laboratorij spremlja in obvladuje kakovost izvajanja akreditiranih dejavnosti in rezultatov ter njihovo primerljivost z rezultati drugih laboratorijev, ki delujejo na istem področju. Rezultati iz medlaboratorijskih primerjav omogočajo identifikacijo morebitnih problemov in so še posebej pomembni za verifikacijo dela laboratorija ob vpeljavi sprememb ali uvajanju novih dejavnosti. Uspešno sodelovanje v medlaboratorijskih primerjavah laboratoriju pomaga dokazovati tudi usposobljenost (Slovenska akreditacija 0A05, 2009). Pravilnost metode ugotovimo s primerjavo naše



izmerjene vrednosti s pravo vrednostjo (povprečna vrednost medlaboratorijskega preskusa).

#### a) Natančnost (angl. precision)

Natančnost analiznega postopka predstavlja ujemanje rezultatov v seriji meritev, pridobljenih z večkratnim vzorčenjem istega homogenega vzorca v predpisanih pogojih. Pove nam, koliko rezultati meritev med seboj nihajo in je merilo za velikost slučajne napake. Običajno jo podajamo kot standardni odmik (s). Iz vrednosti standardnega odmika meritev pri dani analizni metodi lahko ovrednotimo njeno natančnost: čim manjši je standardni odmik, bolj natančna je metoda (Eurachem Working Group, 1998).

Natančnost metode podajamo na dva načina:

- a) PONOVLJIVOST - **natančnost v krajšem časovnem obdobju (angl. repeatability)**: isti analitik, isti reagenti, ista oprema, v krajšem časovnem obdobju. Izberemo tipične matrikse. Za vsak matriks izberemo vsaj 2 vzorca: enega s koncentracijo na spodnjem delu delovnega območja (spodnja meja delovnega območja je meja določljivosti) in enega s koncentracijo na zgornjem delu območja. Vsak vzorec analiziramo vsaj 6-krat v enem dnevu. Izračunamo povprečno vrednost, standardni odklon in relativni standardni odklon (Eurachem Working Group, 1998).
- b) OBNOVLJIVOST - **natančnost v daljšem časovnem obdobju (angl. reproducibility)**: po možnosti različni analitiki, različni izvori reagentov, različna oprema, v daljšem časovnem obdobju. Postopamo enako kot pri natančnosti v krajšem obdobju. Vzorce analiziramo vsaj 6-krat v daljšem časovnem obdobju in izračunamo povprečno vrednost, standardni odklon in relativni standardni odklon (Eurachem Working Group, 1998).

#### 3.3.5 Merilna negotovost (angl. uncertainty of measurement)

(Ellison in sod., 2000; Slovenska akreditacija 0A03, 2005)

Merilna negotovost je parameter, ki je povezan z merilnim rezultatom in označuje raztros vrednosti, ki jih je mogoče upravičeno pripisati merjeni veličini. Je parameter, ki določa, v katerih mejah okrog izmerjene vrednosti je pravi rezultat in s kakšno verjetnostjo. Ta parameter je lahko npr. standardni odmik (ali njegov večkratnik) ali polovična širina intervala, ki ima določeno stopnjo zaupanja.

Postopek ovrednotenja merilne negotovosti:

Koristen pristop pri ovrednotenju merilne negotovosti predstavlja identifikacija stopenj preskusne metode in uporaba diagrama vzrokov in učinkov («ribja kost») za predstavitev izvorov in komponent merilne negotovosti. Pri ovrednotenju merilne negotovosti je potrebno upoštevati različne tipe vzorcev, matriksa in različna koncentracijska območja analita.

Koraki v postopku ugotavljanja merilne negotovosti pri kemijskem preskušanju so:

#### **a) Definicija merjenca**

Merjenec mora biti jasno definiran. V kemijski analizi je merjenec običajno koncentracija določenega analita v matriksu. V našem primeru je merjenec skupna prehranska vlaknina, ki je podrobno definirana v točki 2.1.

#### **b) Identifikacija izvorov merilne negotovosti**

Ena glavnih in kritičnih stopenj študije je identifikacija vseh možnih izvorov merilne negotovosti. Narediti je treba seznam, ki vsebuje vse možne izvore negotovosti za posamezno metodo. Upoštevati moramo vse parametre, ki nastopajo v enačbah eksplicitno ter druge parametre (čas inkubacije, temperatura,...), ki pa v enačbah ne nastopajo eksplicitno, predstavljajo pa potencialen vir negotovosti. V procesu identifikacije posameznih izvorov merilne negotovosti je potrebno ugotoviti, kateri bistveno prispevajo k kombinirani merilni negotovosti. V praksi se izkaže, da jih je običajno malo.

Izvori merilne negotovosti so:

- nepopolna definicija problema,
- vzorčenje,
- vplivi osnove analiznega vzorca (matriksa in interference),
- vplivi okolja,
- merjenje mase ,
- merjenje volumna,
- referenčne vrednosti,
- približki in predpostavke povezane z metodo in postopkom,
- naključne spremenljivke.

### c) Kvantifikacija komponent negotovosti

Posamezne prispevke merilne negotovosti izrazimo kot standardne merilne negotovosti ( $u$ ), izražene kot standardni odmik. Glede na podatke, ki jih imamo na razpolago in tudi glede na princip metode, se odločimo na kakšen način bomo merilno negotovost vrednotili.

Možna sta dva pristopa:

- matematični pristop, kjer izhajamo iz matematičnega modela - vsak parameter v enačbi moramo ovrednotiti kot standardno negotovost, nato pa vse prispevke kombiniramo med seboj,
- pristop, kjer posamezne vire negotovosti združujemo; ponavadi upoštevamo podatke natančnosti, pravilnosti (bias) in ostale prispevke, za katere menimo, da so pomembni.

V praksi velikokrat kombiniramo oba načina, večino potrebnih informacij pa dobimo z eksperimentalnim delom, meritvami na CRM, validacijskimi študijami, medlaboratorijskimi primerjalnimi testi, kontrolnimi kartami, pa tudi literaturnimi podatki in certifikati. Pri presoji virov in oceni merilne negotovosti so pomembne izkušnje, znanje o principu metode in kritična presoja analitika.

### d) Izračun kombinirane in razširjene negotovosti

Za vrednotenje merilne negotovosti smo uporabili podatke validacije, in sicer podatke natančnosti na daljši čas (obnovljivosti) in odstopanje od prave vrednosti (bias). Dobljena natančnost preskusnega postopka je običajno bistvena komponenta kombinirane merilne negotovosti. Upoštevati mora vse aktualne tipe vzorcev in koncentracijska območja. Bias pa določimo z ustreznimi referenčnimi materiali.

#### **Kombinirana standardna negotovost (angl. combined standard uncertainty, $u_c$ )**

(Ellison in sod., 2000)

Kombinirana standardna negotovost rezultata je standardni odmik enak kvadratnemu korenu celotne variance, ki ga dobimo s kombinacijo vseh komponent negotovosti ovrednotenih z upoštevanjem zakona o širjenju negotovosti. Izračunamo jo iz prispevkov pravilnosti ( $u(\text{bias})$ ) in obnovljivosti ( $u(\text{obn.})$ ).

$$u_c = \sqrt{u(\text{bias})^2 + u(\text{obn.})^2} \quad \dots(11)$$

### Prispevek pravilnosti ( $u(\text{bias})$ ) k merilni negotovosti:

$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{bias}^2 + u(\text{Cref})^2 + \left(\frac{\text{RSD}_{\text{izm}}}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad \dots(12)$$

$n$             število meritev,

$\text{RSD}_{\text{izm}}$     povprečni relativni standardni odmik izmerjenih meritev.

$$\text{bias} = \frac{(x_{\text{ref}} - \bar{x}_{\text{izm}})}{x_{\text{ref}}} \cdot 100\% \quad \dots(13)$$

Bias        odstopanje od prave vrednosti,

$x_{\text{ref}}$         referenčna vsebnost SPV (g/100 g),

$\bar{x}_{\text{izm}}$       izmerjena povprečna vsebnost SPV (g/100 g).

Interval zaupanja referenčne vrednosti pretvorjen v merilno negotovost referenčne vrednosti. Interval zaupanja določata njegova spodnja in zgornja meja v kateri se s 95 % verjetnostjo nahaja referenčna oz. certificirana vrednost (Ellison in sod., 2000).

$$u(\text{Cref}) = \frac{s(\text{Cref})}{x_{\text{ref}}} \cdot 100\% \quad \dots(14)$$

$$s(\text{Cref}) = \frac{\text{interval zaupanja ref. vrednosti}}{k} \quad \dots(15)$$

$u(\text{Cref})$ )    Merilna negotovost referenčne vrednosti,

$(s(\text{Cref}))$    Standardni odmik referenčne vrednosti,

$k$             faktor pokritja odvisen od stopnje zaupanja normalne porazdelitve ( $k = 2$  pri 95 % stopnji zaupanja) (Ellison in sod., 2000).

### Prispevek obnovljivosti ( $u(\text{obn})$ ) k merilni negotovosti:

Prispevek obnovljivosti je podan kot standardni odklon razpona ( $s_r$ ). Razpon ( $r$ ) pomeni razliko med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo (Magnusson in sod., 2004).

$$u(\text{obn.}) = s_r(\%) = \frac{r(\%)}{d_2} \quad \dots(16)$$

$$r (\%) = \frac{\Delta}{\bar{x}_{izm}} \cdot 100 \% \quad \dots(17)$$

- $s_r$  standardni odklon razpona,  
 $r$  razpon,  
 $d_2$  faktor pretvorbe odvisen od števila opravljenih meritev ( $n = 2$ , zato je  $d_2 = 1,128$ ),  
 $\Delta$  absolutna napaka med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo,  
 $\bar{x}_{izm}$  izmerjena povprečna vsebnost SPV (g/100 g) (Magnusson in sod., 2004).

### **Razširjena negotovost (angl. expanded uncertainty, $U_c$ )**

Razširjena negotovost je interval, v katerem se nahaja rezultat z določeno stopnjo zaupanja.  $U_c$  dobimo z množenjem kombinirane standardne negotovosti s faktorjem pokritja  $k$  (Ellison in sod., 2000).

$$U_c = u_c \cdot k \quad \dots(18)$$

### 3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Vsi podatki in končni rezultati so bili izračunani in urejeni s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excell.

Določene rezultate kemijskih analiz smo statistično obdelali in ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri:

- aritmetična sredina,
- varianca,
- standardni odklon,
- relativni standardni odklon,
- interval zaupanja,
- z - vrednost.

**Aritmetično sredino ali povprečje** ( $\bar{x}$ ) dobimo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh enot (meritev) in vsoto delimo s številom enot (meritev) (Ellison in sod., 2000).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots(19)$$

n - število meritev

i - indeks meritev

$x_i$  - vrednosti posameznih meritev

**Varianco** ( $s^2$ ) opredelimo kot povprečje kvadratov odklonov vrednosti številske spremenljivke (posameznih meritev) od aritmetične sredine meritev. Je merilo odstopanja vrednosti posameznih meritev od povprečne vrednosti meritev (Ellison in sod., 2000).

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \dots(20)$$

**Standardni odklon (s)** je definiran kot kvadratni koren variance. Je merilo za natančnost oz. sipanje vrednosti  $x_i$ . Velik standardni odklon kaže na veliko razpršenost enot v populaciji, tj. enote so razporejene v velikem obsegu okoli aritmetične sredine. Majhen standardni odklon pa nasprotno predstavlja veliko koncentracijo statističnih enot okoli aritmetične sredine (Ellison in sod., 2000).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \dots(21)$$

**Relativni standardni odmik (RSD)** ali koeficient variacije je standardni odziv izražen v odstotkih glede na povprečno vrednost meritev (Ellison in sod., 2000).

$$\text{RSD} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad \dots(22)$$

**z-vrednost** je definirana kot razlika vrednosti konkretne enote ( $x_{izm}$ ) in aritmetične sredine populacije ( $x_{ref}$ ) v razmerju s standardnim odklonom ( $s_{ref}$ ) (Ellison in sod., 2000).

$$z = \frac{\bar{x}_{izm} - x_{ref}}{s_{ref}} \quad \dots(23)$$

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Rezultate z razpravo predloženega dela prikazujemo v treh sklopih:

- rezultati validacije skupaj z določitvijo merilne negotovosti,
- primerjava naših rezultatov s podatki iz literature in
- težave med eksperimentalnim delom.

Z izbrano metodo AOAC 2009.01 (brez določanja LMWSDF) smo analizirali različna živila z različno vsebnostjo SPV, vode, maščobe, OH in beljakovin kakor zahteva validacijski postopek. Iz dobljenih podatkov validacije smo izračunali kombinirano in razširjeno negotovost analizne metode.

### 4.1 REZULTATI VALIDACIJE

#### 4.1.1 Namen validacije

Z validacijo smo želeli potrditi ustreznost izbrane analizne metode za določanje vsebnosti skupne prehranske vlaknine v različnih vrstah živil. Glede na namen rezultatov smo si postavili naslednje cilje:

- določiti mejo zaznavnosti (LOD), mejo določljivosti (LOQ) in delovno območje,
- določiti pravilnost metode preveriti z:
  - analizo certificiranega referenčnega materiala (CRM); kriterij – dobljena povprečna vrednost mora ustrezati referenčni vrednosti,
  - medlaboratorijskim primerjalnim testom; kriterij – vrednost  $z < 2$ ,
- ovrednotiti natančnost metode v daljšem in krajšem časovnem obdobju (RSD (%) < 15 %),
- ovrednotiti možne izvore merilne negotovosti,
- kvantitativno ovrednotiti pomembnejše prispevke k merilni negotovosti in izračunati razširjeno merilno negotovost.

#### 4.1.2 Meja zaznavnosti (LOD) in meja določljivosti (LOQ)

Mejo zaznavnosti in mejo določljivosti smo določili iz standardnega odklona serije meritev vzorca 100 % sadnega soka, ki vsebuje zelo majhno vsebnost SPV. Sadni sok smo analizirali v 9 ponovitvah po opisanem postopku 3.3.1. Iz dobljenih podatkov za vsebnost



SPV ( $x_{izm}$ ) v vzorcu smo izračunali povprečno vrednost SPV ( $\bar{x}_{izm}$ ), standardni odklon (s), relativni standardni odklon (RSD) ter mejo zaznavnosti (LOD) in mejo določljivosti (LOQ), ki ju predstavljata enačbi 9 in 10. Izmerjene in izračunane vrednosti so predstavljene v preglednici 4.

**Preglednica 4:** Podatki za izračun meje zaznavnosti in meje določljivosti skupne prehranske vlaknine v vzorcu sadnega soka

| <b>Sadni sok</b>         |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| <b>Število ponovitev</b> | <b><math>x_{izm}</math> (g/100 g)</b> |
| 1                        | 0,644                                 |
| 2                        | 0,804                                 |
| 3                        | 0,784                                 |
| 4                        | 0,824                                 |
| 5                        | 0,654                                 |
| 6                        | 0,754                                 |
| 7                        | 0,904                                 |
| 8                        | 0,854                                 |
| 9                        | 0,734                                 |
| $\bar{x}_{izm}$          | 0,772                                 |
| s                        | 0,087                                 |
| RSD %                    | 11                                    |
| <b>LOD</b>               | <b>0,3</b>                            |
| <b>LOQ</b>               | <b>1</b>                              |

Meja zaznavnosti (LOD) SPV v analiznem vzorcu je 0,3 g/100 g vzorca, meja določljivosti (LOQ) pa je 1 g SPV/100 g vzorca. Vrednost LOQ smo potrdili s sprejemljivo natančnostjo (RSD 11 %; RSD < 15 %).

#### 4.1.3 Delovno območje

Sprejemljivo pravilnost in natančnost metode AOAC 2009.01 za določanje vsebnosti SPV dobimo v območju od 1 – 80 g SPV/100 g vzorca. Za najnižjo vrednost smo vzeli LOQ, za najvišjo pa največjo možno vsebnost SPV v nekem živilu.

#### 4.1.4 Pravilnost metode

Pravilnost analizne metode za določanje vsebnosti SPV v živilih smo preverili na dva načina:

- z analizo certificiranega referenčnega materiala (CRM),
- z medlaboratorijskim primerjalnim testom.

Da bi preverili pravilnost dobljenih rezultatov za vsebnost SPV z dano metodo, smo analizirali pšenično moko CRM in ovsene kosmiče T2443. Referenčne vrednosti za oba vzorca so pridobljene iz FAPAS-a (FAPAS, 2010; FAPAS, 2011).

#### • Pravilnost s CRM

Po opisanem postopku 3.3.1 smo v 7 ponovitvah analizirali pšenično moko CRM. Izračunali smo vsebnost SPV v g/100 g ( $x_{izm}$ ) pšenične moke CRM ter povprečno vrednost ( $\bar{x}_{izm}$ ) primerjali z referenčno vrednostjo ( $x_{ref}$ ) (FAPAS, 2010). Da so rezultati pravilni, se mora izmerjena povprečna vrednost gibati znotraj intervala: certificirana vrednost  $\pm$  interval zaupanja. Vsi podatki za ugotovitev pravilnosti metode s CRM so predstavljeni v preglednici 5.

**Preglednica 5:** Primerjava referenčne vsebnosti skupne prehranske vlaknine s povprečno izmerjeno vsebnostjo skupne prehranske vlaknine (g/100 g) v vzorcu pšenične moke CRM

| <b>Pšenična moka CRM</b> |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| <b>Število ponovitev</b> | <b><math>x_{izm}</math> (g/100 g)</b> |
| 1                        | 3,514                                 |
| 2                        | 3,425                                 |
| 3                        | 3,584                                 |
| 4                        | 3,460                                 |
| 5                        | 3,687                                 |
| 6                        | 3,591                                 |
| 7                        | 3,569                                 |
| $\bar{x}_{izm}$          | <b>3,547</b>                          |
| s                        | 0,088                                 |
| RSD %                    | 2,5                                   |
| $x_{ref}$                | <b>3,41 <math>\pm</math> 0,93</b>     |

Glede na dobljen rezultat ( $\bar{x}_{izm} = 3,547$ ) lahko rečemo, da je metoda pravilna, saj se naš rezultat giblje znotraj intervala: certificirana vrednost  $\pm$  interval zaupanja (3,41  $\pm$  0,93).

- **Pravilnost z medlaboratorijskim primerjalnim testom**

Pravilnost analizne metode smo preverili tudi z medlaboratorijskim primerjalnim testom.

Osnovni kriterij za opredelitev pravilnosti z medlaboratorijskim preskušanjem je z-vrednost, ki mora biti nižja od 2. Vzorec ovsenih kosmičev T2443 smo po postopku 3.3.1 analizirali v treh ponovitvah. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali povprečno vsebnost SPV v g/100 g vzorca in z-vrednost. Za izračun z-vrednosti (enačba 23) smo potrebovali tudi referenčno vsebnost  $SPV(x_{ref})$  in standardni odmik referenčne vsebnosti ( $s_{ref}$ ) (FAPAS, 2011). Vsi potrebni podatki in izračunana z-vrednost so podani v preglednici 6.

**Preglednica 6:** Rezultat medlaboratorijskega primerjalnega testa za vsebnost skupne prehranske vlaknine v vzorcu ovsenih kosmičev T2443

| <b>Ovseni kosmiči T2443</b> |                                       |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| <b>Število ponovitev</b>    | <b><math>x_{izm}</math> (g/100 g)</b> |
| 1                           | 10,912                                |
| 2                           | 11,616                                |
| 3                           | 11,571                                |
| $\bar{x}_{izm}$             | 11,366                                |
| $x_{ref}$                   | 9,23                                  |
| $s_{ref}$                   | 1,26                                  |
| <b>z-vrednost</b>           | <b>1,7</b>                            |

Ali so naši izmerjeni rezultati primerljivi z referenčno vsebnostjo ugotovimo z z-vrednostjo, ki ji lahko rečemo tudi pogoj sprejemljivosti. Če se izračunana z-vrednost giblje med  $\pm 2$  je rezultat v redu. V našem primeru je z-vrednost 1,7, kar pomeni, da so naši rezultati medlaboratorijskega primerjalnega testa sprejemljivi.

#### 4.1.5 Vrednotenje natančnosti analiznega postopka

Natančnost analiznega postopka vrednotimo z opredelitvijo natančnosti v krajšem in daljšem časovnem obdobju. Natančnost v krajšem času oz. ponovljivost metode ovrednotimo z analizo različnih živil, ki jih dnevno analiziramo z izbrano metodo v večih ponovitvah. Natančnost v daljšem času oz. obnovljivost pa ovrednotimo z analizo istih živil kot za ponovljivost, vendar jih analiziramo enkrat tedensko v večih ponovitvah. Da

lahko trdimo, da je analizna metoda za določanje vsebnosti SPV ponovljiva in obnovljiva, morajo biti izmerjene vrednosti RSD (%) < 15 %.

#### 4.1.5.1 Ponovljivost- natančnost na krajši čas

Za določitev ponovljivosti analizne metode smo uporabili 9 različnih živil in jih analizirali po postopku 3.3.1. Vzorce živil smo analizirali v 5 – 9 ponovitvah. Dobljenim rezultatom smo izračunali povprečno vsebnost SPV (g/100 g), standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD), ki je kriterij ponovljivosti. Z izračunom RSD vrednosti želimo preveriti ali ustrezajo zahtevi validacije (RSD (%) < 15 %).

Preglednica 7 prikazuje podatke za ugotavljanje natančnosti analizne metode za določanje SPV na krajši čas. Vsebuje podatke o povprečni vsebnosti SPV (g/100 g) za analizirana živila ( $\bar{x}_{izm}$ ), število opravljenih meritev, izračunan standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD) za vsako posamezno analizirano živilo. Podatki vsake posamezne ponovitve so prikazani v prilogi A.

**Preglednica 7:** Podatki za opredelitev natančnosti analizne metode za določanje vsebnosti skupne prehranske vlaknine v krajšem času

| Vzorec živila        | $\bar{x}_{izm}$<br>(g/100 g) | Število<br>ponovitev | s<br>(g/100 g) | RSD<br>(%)  |
|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------|-------------|
| pšenična moka CRM    | 3,547                        | 7                    | 0,088          | <b>2,5</b>  |
| radič                | 39,480*                      | 7                    | 0,63           | <b>1,6</b>  |
| prepečenec           | 5,308                        | 6                    | 0,11           | <b>1,9</b>  |
| cvetača              | 2,424                        | 6                    | 0,038          | <b>1,6</b>  |
| roladice             | 2,413                        | 7                    | 0,083          | <b>3,4</b>  |
| ovseni kosmiči T2443 | 11,446                       | 5                    | 0,25           | <b>2,2</b>  |
| fižol                | 60,980                       | 6                    | 0,67           | <b>0,64</b> |
| špinača              | 38,942*                      | 5                    | 0,36           | <b>0,93</b> |
| sadni sok            | 0,772                        | 9                    | 0,087          | <b>11</b>   |

\* V zračno suhem vzorcu.

Pri izračunih za vsebnost SPV (g/100 g) je pri vseh vzorcih RSD (%) manjši od 15 % in tako zadošča kriteriju validacije. Zato lahko rečemo, da je metoda ponovljiva.

Glede na rezultate je razvidno, da je najvišji RSD ravno pri vzorcih z majhno vsebnostjo SPV. To je lepo razvidno pri vzorcu sadnega soka, ki vsebuje najmanj SPV (g/100 g soka) v primerjavi z ostalimi živali, ima pa najvišji RSD. Nižja kot je vsebnost SPV v vzorcu, večji je vpliv slučajnih napak na končni rezultat (višji je RSD).

#### 4.1.5.2 Obnovljivost- natančnost na daljši čas

Obnovljivost analizne metode smo preverili tako, da smo štiri vzorce različnih živil analizirali po postopku 3.3.1 v daljšem časovnem obdobju, enkrat tedensko. Rezultatom smo izračunali povprečno vsebnost SPV v g/100 g vzorca, standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD). Z vrednostjo RSD smo želeli preveriti ali je sipanje rezultatov še vedno manjše od 15 %, kot zahteva validacija.

Preglednica 8 prikazuje podatke za ugotavljanje natančnosti analizne metode na daljši čas. Vsi podatki o povprečni vsebnosti SPV (g/100 g), število opravljenih dnevnih in tedenskih meritev, izračunan standardni odmik in relativni standardni odmik za vsako posamezno analizirano živilo so prikazani v prilogi B.

**Preglednica 8:** Podatki za opredelitev natančnosti analizne metode za določanje skupne prehranske vlaknine v daljšem času

| Vzorec živila        | $\bar{x}_{izm}$<br>(g/100 g) | Število meritev | s<br>(g/100 g) | RSD<br>(%) |
|----------------------|------------------------------|-----------------|----------------|------------|
| pšenična moka CRM    | 3,546                        | 3               | 0,082          | 2,3        |
| ovseni kosmiči T2443 | 11,948                       | 5               | 0,84           | 7,01       |
| fižol                | 59,726                       | 5               | 0,41           | 1,2        |
| sadni sok            | 0,813                        | 5               | 0,66           | 8,7        |

Vrednosti RSD v posameznih vzorcih se v daljšem času skoraj nič ne spremenijo v primerjavi z RSD vrednostmi iz ponovljivosti. Relativni standardni odmiki so še vedno nižji od 15 %, zato lahko rečemo, da je metoda obnovljiva. Če vzorce živil analiziramo v petih tednih, (če so pravilno skladiščeni, nizka temperatura, sok originalno zaprt, čim manj stika z zrakom) dobimo pravilne rezultate.

#### 4.1.6 Določitev merilne negotovosti

Laboratoriji, ki so akreditirani pri Slovenski akreditaciji, morajo izpolnjevati zahteve standarda SIST EN ISO/IEC 17025 v povezavi z oceno merilne negotovosti in poročanjem o merilni negotovosti pri preskušanju. Poznavanje merilne negotovosti pri kvantitativnem preskušanju je pomembno za veljavnost ali uporabo rezultatov preskušanja. Bistvo merilne negotovosti je identifikacija izvorov in komponent, ki bistveno prispevajo k merilni negotovosti in ovrednotenje njihovega prispevka (Slovenska akreditacija OA03, 2005).

Celoten potek določanja merilne negotovosti je bil opravljen v skladu s priporočili EURACHEM Guide (Ellison in sod., 2000).

#### 4.1.6.2 Identifikacija možnih izvorov merilne negotovosti

Glede na princip analizne metode, ki je opisan po točko 3.3.1, smo identificirali možne izvore merilne negotovosti.

#### VZOREC

- shranjevanje vzorcev,
- homogenost,
- mletje vzorca (kontaminacija, velikost vzorca),
- matriks,
- odtehta vzorca (ponovljivost tehtanja, točnost tehtnice).

#### POSTOPEK

- Priprava filtrirnih lončkov
  - tehtanje celita 1 g (kalibracija tehtnice, ponovljivost tehtanja),
  - žarjenje v žarilni peči (čas, temperatura, kalibracija žarilne peči),
  - tehtanje prežarjenih filtrirnih lončkov s celitom (kalibracija tehtnice, ponovljivost tehtanja).
- Razmaščevanje vzorca
  - dodani reagenti (volumen heksana (20 mL),
  - čas razmaščevanja.
- Encimski razklop vzorca
  - dodani volumni reagentov (temperatura, ponovljivost polnjenja, kalibracija),
  - inkubacije vzorca (temperatura, čas, kalibracija kopeli).
- Obarjanje vzorca
  - temperatura,
  - čas obarjanja,
  - volumen raztopine etanola,
  - koncentracija etanola.
- Filtracija vzorca
  - kvantitativen prenos raztopine,
  - temperatura raztopine vzorca,
  - volumen raztopin za spiranje, njihova koncentracija in temperatura.

- Določanje ostanka po sušenju
  - sušenje filtrirnih lončkov z ostankom (temperatura, čas sušenja kalibracija sušilnika),
  - tehtanje filtrirnih lončkov z ostankom po sušenju (kalibracija tehtnice, ponovljivost tehtanja).
  
- Določanje vsebnosti pepela
  - sežig v žarilni peči (čas, temperatura, kalibracija žarilne peči, kvantitativen sežig),
  - tehtanje filtrirnega lončka s pepelom (kalibracija tehtnice, ponovljivost tehtanja),
  - izračun.
  
- Določanje vsebnosti beljakovin po Kjeldahlu
  - razklop vezanega dušika v amonijev ion
  - dodani reagenti
    - volumen  $H_2SO_4$  (25 mL) (temperatura, ponovljivost polnjenja, kalibracija),
    - katalizator (sestava in masa katalizatorja).
  
  - segrevanje – mineralizacija vzorca (ostanka po sušenju)
    - čas, enakomernost in temperatura segrevanja,
    - razmerje kislina/sol,
    - odesavanje par – izgube dušika, izgube kisline – kristalizacija,
    - nepopolna oksidacija.
  
  - destilacija amonijevega iona v raztopino borove kisline
    - volumen dodanega NaOH (35 mL) (koncentracija NaOH),
    - izkoristek destilacije (čas, hitrost in temperatura destilacije, koncentracija borove kisline, količina destilata).
  
  - titracija
    - koncentracija HCl (priprava oz. redčenje standardne raztopine, kvantitativen prenos, kalibracija bučke, ponovljivost polnjenja, vpliv temperature, čistoča, molska masa),
    - volumen HCl pri titraciji (natančnost birete, polnjenje birete, odčitek na bireti),
    - indikator (ekvivalentna točka).

#### 4.1.6.3 Kvantitativno vrednotenje prispevkov merilne negotovosti

Pri izračunu merilne negotovosti upoštevamo samo prispevke, ki bistveno prispevajo h kombinirani negotovosti. To so:

- prispevek pravilnosti ( $u(\text{bias})$ ) – odstopanje od certificirane vrednosti ( $x_{\text{CRM}}$ ),
- prispevek obnovljivosti ( $u(\text{obn.})$ ) – analiza na daljši rok, zajame vse možne napake v ponovljivih stopnjah postopka.

#### ❖ Prispevek pravilnosti ( $u(\text{bias})$ ) k merilni negotovosti

Za določitev prispevka pravilnosti smo uporabili podatke iz določanja pravilnosti za vzorec pšenične moke CRM, ki smo ga analizirali po postopku 3.3.1 v 7 ponovitvah. Vsi podatki potrebni za izračun prispevka pravilnosti (enačba 13) so podani v preglednici 5.

Za izračun prispevka pravilnosti ( $u(\text{bias})$ ) k merilni negotovosti je potrebno določiti dve komponenti. To sta:

##### 1. Bias

Izražen v % kot absolutna razlika med referenčno vsebnostjo SPV (g/100 g) in laboratorijsko pridobljeno vrednostjo SPV (g/100 g) proti referenčni. Bias označuje sistematično napako danega analiznega postopka in je (pozitiven ali negativen) odmik rezultata analize od prave vrednosti. Izračuna se ga po enačbi 13.

$$\text{bias} = \frac{(3,41 - 3,55) \cdot 100\%}{3,41} = -4,11\%$$

##### 2. Negotovost referenčne vrednosti ( $u(\text{Cref})$ )

Negotovost referenčne vrednosti pomeni merilna negotovost referenčne vrednosti izražena v %, ki jo izračunamo po enačbi 14. Referenčna vsebnost SPV (g/100 g) v pšenični moki –  $x_{\text{CRM}} = 3,41 \pm 0,93$ . Ker je rezultat podan s 95 % stopnjo zaupanja je faktor pokritja  $k = 2$ . Standardni odmik CRM ( $s(\text{Cref})$ ) izračunamo tako, da interval zaupanja ( $\pm 0,93$ ) delimo z 2: ( $s(\text{Cref}) = 0,93/2 = 0,465$ ) (enačba 15).

$$u(\text{Cref}) = \frac{0,465}{3,41} \cdot 100\% = 13,6\%$$



Za izračun  $u(\text{bias})$  je potreben samo še RSD izmerjenih meritev ( $\text{RSD}_{\text{izm}}$ ), ki znaša 2,49 %. Podatek je podan v preglednici 5.

Izračun prispevka pravilnosti (enačba 12) k merilni negotovosti:

$$u(\text{bias}) = \sqrt{-4,11^2 + 13,6^2 + \left(\frac{2,49}{\sqrt{7}}\right)^2} = 14,24 \%$$

#### ❖ Prispevek obnovljivosti $u(\text{obn.})$ k merilni negotovosti

Prispevek obnovljivosti dobimo iz povprečja dveh ponovitev (najvišje in najnižje dobljene povprečne vsebnosti SPV) analiziranih živil za določitev obnovljivosti. Povprečnim vrednostim za SPV smo izračunali standardni odmik ( $s$ ), relativni standardni odmik (RSD), absolutno razliko ( $\Delta$ ) in razpon ( $r$ ) v % (enačba 17). Podatki, ki so potrebni za izračun prispevka obnovljivosti so podani v preglednici 9 ter v prilogi A in B. Prispevek obnovljivosti je podan kot standardni odklon razpona ( $s_r$ ), izračunan po enačbi 16 in znaša 3,7 %.

**Preglednica 9:** Podatki potrebni za izračun prispevka obnovljivosti ( $u(\text{obn.})$ ) k merilni negotovosti analize metode za določanje skupne prehranske vlaknine v živilih

| Živilo      | $x_1$  | $x_2$  | $\bar{x}$<br>(g/100 g) | $s$   | RSD<br>(%)      | $\Delta$                         | $r$<br>(%) |
|-------------|--------|--------|------------------------|-------|-----------------|----------------------------------|------------|
| špinača     | 38,462 | 39,318 | 38,890                 | 0,61  | 1,6             | 0,856                            | 2,2        |
| moka        | 3,588  | 3,612  | 3,600                  | 0,017 | 0,47            | 0,024                            | 0,67       |
|             | 3,425  | 3,687  | 3,556                  | 0,19  | 5,2             | 0,262                            | 7,4        |
|             | 3,389  | 3,656  | 3,523                  | 0,19  | 5,4             | 0,267                            | 7,6        |
| radič       | 36,814 | 35,155 | 35,985                 | 1,2   | 3,3             | 1,118                            | 4,6        |
| prepečenec  | 5,389  | 5,271  | 5,330                  | 0,083 | 1,6             | 0,123                            | 2,2        |
| cvetača     | 2,370  | 2,445  | 2,408                  | 0,053 | 2,2             | 0,075                            | 3,1        |
| roladice    | 2,312  | 2,525  | 2,419                  | 0,15  | 6,2             | 0,213                            | 8,8        |
| ovsena kaša | 11,007 | 11,645 | 11,326                 | 0,45  | 3,9             | 0,638                            | 5,6        |
|             | 10,912 | 11,571 | 11,242                 | 0,47  | 4,2             | 0,659                            | 5,9        |
|             | 11,667 | 12,926 | 12,297                 | 0,89  | 7,2             | 1,259                            | 10         |
|             | 11,759 | 11,303 | 11,531                 | 0,32  | 2,8             | 0,456                            | 3,9        |
|             | 13,582 | 13,014 | 13,298                 | 0,40  | 3,0             | 0,568                            | 4,3        |
| fižol       | 59,851 | 61,746 | 60,789                 | 1,3   | 2,2             | 1,895                            | 3,1        |
|             | 59,834 | 58,955 | 59,395                 | 0,62  | 1,1             | 0,878                            | 1,5        |
|             | 59,171 | 59,432 | 59,302                 | 0,19  | 0,31            | 0,261                            | 0,44       |
|             | 59,031 | 59,755 | 59,393                 | 0,51  | 0,86            | 0,724                            | 1,2        |
|             | 59,267 | 60,072 | 59,669                 | 0,57  | 0,95            | 0,805                            | 1,3        |
|             |        |        |                        |       | <b>RSD: 2,9</b> | <b><math>\bar{r}</math> (%):</b> | <b>4,1</b> |

$$s(\bar{x}): \quad 3,7$$

#### 4.1.6.4 Izračun kombinirane ( $u_c$ ) in razširjene ( $U_c$ ) merilne negotovosti

Kombinirano merilno negotovost smo izračunali tako, da smo sešteli kvadrate relativnih vrednosti (v %) posameznih komponent, in sicer prispevka pravilnosti ( $u(\text{bias})$ ) in prispevka obnovljivosti ( $u(\text{obn.})$ ) (enačba 11).

$$u_c = \sqrt{14,24^2 + 3,7^2} = 14,7 \%$$

Razširjeno merilno negotovost smo izračunali tako, da smo kombinirano merilno negotovost pomnožili s faktorjem pokritja  $k = 2$  (enačba 18).

$$U_c = u_c \cdot 2 = 14,7 \% \cdot 2 = 30 \%$$

#### PODAJANJE MERILNE NEGOTOVOSTI

Izračunana merilna negotovost je na celem koncentracijskem območju enaka in jo podamo kot:

$$\text{Vsebnost SPV (g/100 g)} = x \pm U_c$$

$x$  – vsebnost SPV (g/100 g) v vzorcu

## 4.2 PRIMERJAVA NAŠIH REZULTATOV S PODATKI IZ LITERATURE

Kot že omenjeno, je bil namen diplomskega dela tudi primerjava dobljenih rezultatov s podatki iz obstoječe literature. Podatki za vsebnost SPV, prikazani v preglednici 10, so bili določeni z različnimi metodami za določanje vsebnosti SPV.

Če primerjamo rezultate, ki smo jih določili na ZZV Novo mesto z ostalimi podanimi podatki, opazimo velike razlike. V različnih virih je vsebnost SPV manjša v primerjavi z našimi rezultati. Najmanjše odstopanje je pri vzorcu cvetače. Najverjetneje zato, ker cvetača vsebuje manj škroba, predvsem RŠ. Za ostala živila so bili naši rezultati pričakovano višji od ostalih podatkov iz literature. Višje rezultate smo pričakovali zato, ker z novo metodo AOAC 2009.01 določimo več komponent PV (predvsem RŠ), kot s starejšimi encimskimi metodami.

**Preglednica 10:** Primerjava naših rezultatov za vsebnost skupne prehranske vlaknine s podatki iz literature

| Živilo     | Vsebnost SPV (g/ 100 g) |      |     |     |      |
|------------|-------------------------|------|-----|-----|------|
|            | ZZV Novo mesto          | A    | B   | C   | D    |
| radič      | 3,66**                  | 0,9* | 0,9 | -   | 1,26 |
| prepečenec | 5,31                    | 4,3  | 1,5 | 0,1 | 3,50 |
| cvetača    | 2,42                    | 1,8* | 1,6 | 1,0 | 2,92 |
| fižol      | 60,98                   | -    | -   | -   | 23,2 |
| špinača    | 3,82**                  | 1,6* | 3,1 | 0,7 | 2,58 |

\* Englyst metoda

\*\* v svežem vzorcu

- ni podatka

**A** Vegetables, herbs and spices: The composition of foods (Holland in sod., 1991),

**B** Food tables and labelling (Bender A. in Bender D., 1999),

**C** Tablice o sastavu i prehrabenoj vrijednosti namirnica i pića (Brodarec, 1971),

**D** Food composition and nutrition tables (Souci in sod., 2008).

Najbolj očitno odstopanje med podatki za vsebnost vlaknine je pri vzorcu fižola. V literaturah A, B, C in D se vsebnost PV giblje okoli 20 g/100 g fižola. V našem vzorcu fižola Češnjevca pa smo določili več kot 60 g SPV/100 g vzorca. Vzorec fižola Češnjevca so analizirali tudi na Biotehniški fakulteti z metodo AOAC 991.43. To je metoda, s katero se določa vsebnost topne in vsebnost netopne PV, vsebnost SPV pa je vsota obeh. Njihov rezultat je 33 g SPV/100 g fižola (še neobjavljeni podatek). Ta podatek je zelo presenetljiv, saj smo uporabili isto sorto fižola. Čeprav smo analizirali različna vzorca, tako velike razlike med rezultatoma nismo pričakovali. Kljub temu, da na vsebnost SPV v fižolu

vpliva mnogo zunanjih dejavnikov, od sestave tal, načina gojenja, stopnje zrelosti, vsebnosti vode, itd., je razlika prevelika. Pričakovali smo odstopanja v vsebnosti vlaknine za nekaj gramov/100 g. Edini možen razlog so različni pogoji analize, ki pri naši metodi omogočijo, da določimo ves rezistentni škrob. Saj vzorec z  $\alpha$ -amilazo in mešanico inkubiramo 16 ur pri 37 °C. Pri metodi 991.43 pa po dodatku termostabilne  $\alpha$ -amilaze, mešanico segrevajo 30 min na 95 – 100 °C. Zaradi visoke temperature se verjetno velik del škroba razgradi, kar vpliva na končni rezultat. Z inkubacijo vzorca pri 37 °C pa večina škroba ostane nedotaknjena, zaradi česar je končni rezultat višji.

### 4.3 EKSPERIMENTALNO DELO

Analizna metoda AOAC 2009.01 za določanje vsebnosti SPV živilih je kot uradna metoda AOAC poznana šele od leta 2009. Zato je med laboratoriji in analitiki še nepoznana in nerazširjena. Na začetku uvajanja metode smo imeli kar nekaj težav, ki smo jih uspešno rešili. Že po nekaj opravljenih analizah smo ugotovili, da so rezultati nepravilni. Nekateri rezultati so bili prenizki, vrednosti za slepi vzorec in vsebnost pepela pa negativni. Vzrok smo našli v premočnem vakuumu pri filtriranju. Ker je bil vakuum v vakuumski črpalki premočan, je iz filtrirnega lončka potegnilo tudi nekaj celita in najverjetneje tudi vzorca. Težavo smo rešili z montažo regulacijskega ventila na vakuumsko črpalko in s tem smo vakuum močno zmanjšali.

Na začetku smo imeli tudi nekaj težav s celitom, filtracijskim sredstvom v obliki belega prahu. Tekom filtriranja se je celit močno pomešal z vzorcem in neenakomerno porazdelil po dnu filtrirnega lončka. Pri vzorcih z usedlino to ni predstavlja večjih težav, saj so trdni delci nad celitom tvorili novo filtrirno plast. Neenakomerna porazdelitev celita je močno vplivala na slepe vzorce, ki vsebujejo le pufer in encime. Zaradi tega so zelo bistri in ne vsebujejo skoraj nikakršnih manjših delcev, ki bi tvorili dodatno plast na celitu. Tam, kjer je bila plast celita tanjša, je večina delcev prišla skozi filtrirni lonček. Rezultati za slepi vzorec so bili zato velikokrat negativni. Zadevo smo rešili tako, da smo vzorčno raztopino v filtrirni lonček kvantitativno prenesli s pomočjo steklene palčke. Raztopino smo počasi spuščali po stekleni palčki ob steni filtrirnega lončka. Celit je tako lepo ostal enakomerno porazdeljen po dnu filtrirnega lončka.

Potrebno je tudi omeniti, da se med 16-urno inkubacijo nekateri vzorci v manjšem deležu pritrdijo na steno inkubacijske steklenice. Spiranje z etanolom in acetonom ni imelo učinka, zato smo steklenico z etanolom za nekaj časa postavili v ultrazvočno kopel. Prilepljeni delci so brez težav odstopili.

## 5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov kemijskih analiz in statistične obdelave pridobljenih podatkov lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Analizna metoda AOAC 2009.01 za določanje skupne prehranske vlaknine daje sprejemljivo pravilnost in natančnost v območju od 1 – 80 g SPV/100 g vzorca.
- Meja zaznavnosti (LOD) metode znaša 0,3 g/100 g vzorca, meja določljivosti (LOQ) pa 1 g/100 g vzorca. Vrednost LOQ smo potrdili s sprejemljivo natančnostjo (RSD 11,22 %; RSD < 15 %).
- Metoda daje pravilne rezultate, saj se analizirana vsebnost SPV za vzorec pšenične moke CRM giblje znotraj intervala: certificirana vrednost  $\pm$  interval zaupanja.
- Rezultat medlaboratorijskega primerjalnega testa je sprejemljiv, saj je izračunana z-vrednost v okviru zahteve ( $\pm 2$ , rezultati sprejemljivi).
- Metoda daje ponovljive in obnovljive rezultate. Pri analizi na daljši in krajši čas so RSD vrednosti nižje od 15 % kakor zahteva validacija.
- Razširjena merilna negotovost, izračunana iz prispevka pravilnosti in obnovljivosti k merilni negotovosti, znaša 30 %.
- Analizne vsebnosti SPV v posameznih živilih so večje od podatkov v literaturi.

## 6 POVZETEK

Prehranska vlaknina je bila še nedavno tega označena kot balastna snov, danes pa je ena ključnih sestavin vsakodnevne prehrane. Dnevna prehrana z veliko prehranske vlaknine znižuje tek oz. zmanjša energijski vnos hrane, upočasni prebavo hranil, daje občutek večje sitosti, upočasni praznjenje želodca in znižuje postprandialno raven glukoze ter inzulina v krvi. Najnovejša definicija prehranske vlaknine, ki je bila sprejeta leta 2009 pravi, da je prehranska vlaknina sestavljena iz polimernih ogljikovih hidratov z 10 ali več monomernimi enotami, ki se ne hidrolizirajo z endogenimi encimi v tankem črevesu človeka. Ker izraz prehranska vlaknina vključuje veliko skupino različnih komponent, mora biti vsaka analizna metoda za določanje vsebnosti vlaknine tesno povezana z definicijo prehranske vlaknine. Glede na najnovejšo definicijo je bila metoda za določanje vsebnosti SPV, ki jo je vpeljal McCleary in sod. (2007), sprejeta kot uradna metoda AOAC 2009.01.

Ker je metoda še zelo nerazširjena in nepoznana, je bil namen diplomskega dela vpeljava in validacija skrajšane metode AOAC 2009.01. Z validacijo smo želeli ugotoviti njeno zanesljivost, pravilnost in natančnost ter potrditi, da je metoda primerna za analitsko uporabo. Metodo smo ovrednotili z naslednjimi parametri: natančnost v krajšem in daljšem časovnem obdobju, pravilnost, meja zaznavnosti (LOD) ter meja določljivosti (LOQ). Določili smo tudi merilno negotovost v skladu zahteve standarda SIST EN ISO/IEC 17025.

Rezultati analiz so pokazali, da je metoda AOAC 2009.01 primerna za določanje vsebnosti skupne prehranske vlaknin v različnih živilih, v območju od 1 – 80 g/100 g vzorca. Mejo zaznavnosti (LOD) in mejo določljivosti (LOQ) smo določili na vzorcu sadnega soka, ki vsebuje zelo majhno vsebnost prehranske vlaknine. Rezultati so pokazali, da LOD znaša 0,3 g/100g vzorca, LOQ pa 1 g/100 g vzorca. Pravilnost metode smo preverili z analizo certificiranega referenčnega materiala in z medlaboratorijskim primerjalnim testom. Rezultati so zadostili pogoju, da se izmerjena vsebnost skupne prehranske gible znotraj intervala certificirana vrednost  $\pm$  interval zaupanja, zato lahko rečemo, da metoda daje pravilne rezultate. Z medlaboratorijskim primerjalnim testom smo dokazali, da so naši rezultati sprejemljivi, saj je izračunana z-vrednost v okviru zahteve.

Natančnost metode smo ovrednotili z relativnim standardnim odmikom (RSD). Izračunali smo ga iz rezultatov meritev skupne prehranske vlaknine pri ponavljanju analiznega postopka v krajšem času (1 dnevu), ter v daljšem časovnem obdobju (5 tednov). Metoda je natančna, saj je sipanje rezultatov tako v daljšem kot krajšem časovnem obdobju manjše od 15 %, kakor zahteva validacija. Iz prispevkov pravilnosti in ponovljivosti k merilni

negotovosti smo podali 30 % razširjeno merilno negotovost. Iz dobljenih rezultatov in primerjav podatkov, lahko zaključimo, da je metoda pravilna, natančna in zanesljiva.

Čeprav smo izvedli le del metode in nismo posebej analizirali vsebnosti topne nizko molekularne prehranske vlaknine, smatramo, da s postopkom določimo večje število komponent prehranske vlaknine (rezistentni škrob, komponente topne in netopne visokomolekularne prehranske vlaknine) kot z ostalimi predhodnimi metodami. Posledično s tem, je vsebnost skupne prehranske vlaknine v analiziranih vzorcih višja od podatkov iz literature.

## 7 VIRI

- American Association of Cereal Chemists (AACC). 2001. The definition of dietary fibre. St. Paul, Cereal Foods World: 112-129
- AOAC Official Method 2009.01. Integrated total dietary fibre. V: Official methods of analysis of AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. Current through revision. Vol. 3. 2010. Horwitz W., Latimer G.W., Jr. (eds.). Gaithersburg, AOAC International, Chapter 45: 131-137
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Batič M. 2001. Polisaharidi - prebiotiki. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, 8. in 9. november 2001, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 38-48
- Bender A.E., Bender D.A. 1999. Food tables and labelling. Oxford, Oxford University Press: 112 str.
- Brodarec A. 1971. Tablice o sestavu i prehrambenoj vrijednosti namirnica i pića. 2. izd. Zagreb, Republički zavod za zaščito zdravlja: 99 str.
- Brown I.L., McNaught K.J., Andrews D., Morita T. 2001. Resistant starch: Plant breeding, applications development and commercial use. V: Advanced dietary fibre technology. McCleary B., Prosky L. (eds.). London, Blackwell Science Ltd: 401-410
- Codex Alimentarius Commission (CAC). 2006. Report of the 27th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for special dietary uses. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 108 str.  
[http://64.76.123.202/cclac/documentos/CCNFSDU/2006/alinorm/al06\\_26e.pdf](http://64.76.123.202/cclac/documentos/CCNFSDU/2006/alinorm/al06_26e.pdf)
- Elleuch M., Bedigian D., Roiseux O., Besbes S., Blecker C., Attia H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. Food Chemistry, 124: 411-421
- Eurachem Working Group. 1998. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Prague, Eurachem: 61 str.



- Ellison S.L.R., Rosslein M., Williams A. (eds.). 2000. Quantifying uncertainty in analytical measurement: Eurachem CITAT guide. 2<sup>nd</sup> ed. Prague, Eurachem: 115 str.
- FAPAS. 2010. Test material specification sheet T2438. Sand Hutton, The Food and Environment Research Agency: 1 str.  
<http://www.fapas.com/downloadDocument.cfm?id=445> (avgust 2011)
- FAPAS. 2011. Test material specification sheet T2443. Sand Hutton, The Food and Environment Research Agency: 1 str.  
<http://www.fapas.com/tmspecsheet.cfm?testmaterialid=6289> (september 2011)
- Golob T., Kutoš T., Plestenjak A. 1997. Vlaknina v mokah in kruhah V: Tehnologija, hrana, zdravje. 1. Slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, 21.-25. april 1996, Bled. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 652-658
- Gray J. 2006. Dietary fibre: Definition, analysis, physiology and health. Brussels, ILSI Europe: 36 str.
- Health Council of the Netherlands. 2006. Guideline for dietary fibre intake. Hague, Health Council of the Netherlands: 86 str.  
[http://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/Dietary%20fibre%20intake\\_0.pdf](http://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/Dietary%20fibre%20intake_0.pdf)  
(junij 2011).
- Holland B., Unwin I.D., Buss D.H. 1991. Vegetables, herbs and spices: The composition of foods. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: 163 str.
- Institute of Medicine of the National Academies. 2005. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, D.C., National Academic Press: 1331 str.  
[http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=10490&page=R1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=10490&page=R1) ( julij 2011).
- ISO 1871:2009(E). Food and feed products: General guidelines for the determination of nitrogen by Kjeldahl method. 2<sup>nd</sup> ed. 2009: 7 str.
- Jalili T., Medeiros D.M., Wildman R.E.C. 2007. Dietary fibre and coronary heart disease. V: Handbook of nutraceuticals and functional foods. 2<sup>nd</sup> ed. Wildman R.E.C. (eds.). London, CRC Press: 131-142

- Kač M., Jurca S. 1994. Pektin: kemijske in fizikalne lastnosti, uporaba v živilstvu. V: Aditivi: dodatki, tehnologija, zdravje. Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevov in 1. simpozij živilcev, 9. in 10. junij 1994, Bled. Raspor P. (ur.). Ljubljana Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 229-232
- Koch V., Pavčič M., Salobir K. 1993. Vlaknine v prehrani. V: Ogljikovi hidrati. 15. Bitenčevi živilski dnevi 1993, 10. in 11. junij 1993, Ljubljana. Plestenjak A., Žlender B., Hribar J., Zelnik-Blatnik M. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 39-58
- Lukša J. 1996. Validacija bioanalitskih metod. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 703-709
- Lupton J.R. 2010. Codex definition of dietary fibre and issues requiring resolution. V: Dietary fibre: new frontiers for food and health. Kamp J.W., Jones J., McCleary B., Topping D. (eds.). Wageningen, Academic Publishers: 15-24
- Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M. 2004. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. 2<sup>nd</sup> ed. Espoo, Nordtest: 41 str.
- Mason P. 2007. Dietary supplements. 3<sup>rd</sup> ed. London, Pharmaceutical Press: 417 str.
- McCleary B. 2003. Dietary fibre analysis. Proceeding of the Nutrition Society, 62: 3-9
- McCleary B. 2007. An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389: 291-308
- McCleary B. 2010. Development of an integrated total dietary fibre method consistent with the Codex Alimentarius Definition. AACC International Report, 55, 1: 24-28
- McCleary B., Devries J.W., Rader J.I., Cohen G., Prosky L., Mugford D.C., Champ M., Okuma K. 2009a. Determination of total dietary fiber (CODEX Definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. Wicklow, Megazyme International: 27 str.
- McCleary B., Mills C., Draga A. 2009b. Development and evaluation of an integrated method for the measurement of total dietary fibre. Wicklow, Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 1, 4: 213-224

- Megazyme. 2011. Integrated total dietary fibre assay procedure. Wicklow, Megazyme International: 23 str.  
<http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/K-INTDF.pdf> (marec 2011)
- Meyer D., Tunland B. 2001. Non-digestible oligosaccharides and polysaccharides: Their physiological effects and health implications. V: Advanced dietary fibre technology. McCleary B., Prosky L. (eds.). London, Blackwell Science Ltd: 455-470
- Mičović E. 2003. Kakovost funkcionalnega izdelka-čokolade z inulinom. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 105 str.
- Mongeau R., Brooks S.P.J. 2003. Dietary fibre: Properties and sources. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1813-1823
- Paeschke T.M., Aimutis W.R. 2011. Introduction to fiber and nondigestible carbohydrates: Definition, health aspects, and perspectives V: Nondigestible carbohydrates and digestive health. Paeschke T.M., Aimutis W.R. (eds.). Ames, Blackwell Publishing Ltd., Institute of Food Technologists: 1-13
- Pravilnik o spremembah Pravilnika o označevanju hranilne vrednosti živil. 2009. Uradni list Republike Slovenije, 19, 87: 11789 - 11790
- Prošek M., Golc Wondra A. 1997. Validacija analiznih metod v tankoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 129 str.
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izdaja. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 20-131
- Salobir J., Salobir B. 2001. Funkcionalnost prehranske vlaknine. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51-65
- Slovenska akreditacija OA03. 2005. Merilna negotovost pri kemijskem preskušanju v skladu s standardom SIST EN ISO/IEC 17025. Ljubljana, Slovenska akreditacija: 10 str.  
[http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/SA\\_info\\_doc/OA03.pdf](http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/SA_info_doc/OA03.pdf) (avgust 2011)
- Slovenska akreditacija OA06. 2005. Prevod EA 04/14: Izbira in uporaba referenčnih materialov. Ljubljana, Slovenska akreditacija: 13 str.  
[http://www.sa.gov.si/teksti-1/slo/SA\\_info\\_doc/OA06.pdf](http://www.sa.gov.si/teksti-1/slo/SA_info_doc/OA06.pdf) (avgust 2011)

Slovenska akreditacija OA05. 2009. Sodelovanje v medlaboratorijskih primerjavah.  
Ljubljana, Slovenska akreditacija: 6 str.

[http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/SA\\_info\\_doc/OA05.pdf](http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/SA_info_doc/OA05.pdf) (avgust 2011)

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 2008. Food composition and nutrition tables. 7<sup>th</sup> ed.  
London, Taylor and Francis Group: 1364 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Tereziji Golob in recenzentki doc. dr. Nataši Šegatin za vso pomoč, strokovne nasvete in pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se Janji Papež in Majdi Ivanušič za vso izdatno pomoč in nasvete pri praktičnem izvajanju diplomske naloge ter predstojniku Sanitarno-kemičnega laboratorija Dušanu Fortuni, za omogočeno praktično opravljanje diplomskega dela na Zavodu za zdravstveno varstvo Novo mesto

Prav tako se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Zavodu za zdravstveno varstvo Novo mesto, ki so mi na kakršenkoli način pomagali pri praktičnem delu.

Hvala Lini Burkan Makivić in Ivici Hočevnar za pomoč pri iskanju in urejanju literature.

Še posebej se zahvaljujem svoji družini in fantu Gregorju za vso potrpežljivost, razumevanje in finančno podporo tekom celotnega študija.

## PRILOGE

**Priloga A:** Posamezne vsebnosti SPV (g/100 g), povprečna vsebnost beljakovin – B (mg) in pepela – P (mg), povprečna vsebnost SPV (g/100 g), standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD) za vsako posamezno analizirano živilo za opredelitev natančnosti v krajšem času.

| število ponovitev | Vsebnost SPV (g/100 g) v živilu |              |             |              |              |                      |              |              |              |
|-------------------|---------------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
|                   | pšenična moka CRM               | radič        | prepečenec  | cvetača      | roladice     | ovseni kosmiči T2443 | fižol        | špinača      | sok          |
| 1                 | 3,514                           | 39,727       | 5,389       | 2,482        | 2,326        | 11,506               | 61,746       | 38,462       | 0,644        |
| 2                 | 3,425                           | 39,510       | 5,337       | 2,416        | 2,525        | 11,513               | 61,260       | 38,939       | 0,804        |
| 3                 | 3,584                           | 39,225       | 5,271       | 2,427        | 2,426        | 11,007               | 60,914       | 38,730       | 0,784        |
| 4                 | 3,460                           | 38,822       | 5,438       | 2,370        | 2,454        | 11,645               | 60,652       | 39,318       | 0,824        |
| 5                 | 3,687                           | 39,642       | 5,137       | 2,445        | 2,312        | 11,559               | 59,851       | 39,261       | 0,654        |
| 6                 | 3,591                           | 40,633       | 5,273       | 2,402        | 2,360        |                      | 61,456       |              | 0,754        |
| 7                 | 3,569                           | 38,803       |             |              | 2,487        |                      |              |              | 0,904        |
| 8                 |                                 |              |             |              |              |                      |              |              | 0,854        |
| 9                 |                                 |              |             |              |              |                      |              |              | 0,734        |
| B (mg)            | 0,115                           | 0,126        | 0,162       | 0,154        | 0,249        | 0,147                | 0,15         | 0,115        | 0,232        |
| P (mg)            | 5,7                             | 64,8         | 1,8         | 0,30         | 6,3          | 7,8                  | 21,2         | 76,4         | 2,8          |
| $\bar{x}_{izm}$   | <b>3,547</b>                    | <b>39,48</b> | <b>5,31</b> | <b>2,424</b> | <b>2,413</b> | <b>11,45</b>         | <b>60,98</b> | <b>38,94</b> | <b>0,772</b> |
| s                 | <b>0,088</b>                    | <b>0,63</b>  | <b>0,11</b> | <b>0,038</b> | <b>0,083</b> | <b>0,25</b>          | <b>0,68</b>  | <b>0,36</b>  | <b>0,087</b> |
| RSD (%)           | <b>2,5</b>                      | <b>1,6</b>   | <b>1,9</b>  | <b>1,58</b>  | <b>3,4</b>   | <b>2,2</b>           | <b>0,64</b>  | <b>0,93</b>  | <b>11</b>    |

**Priloga B:** Posamezne vsebnosti SPV (g/100 g), povprečna vsebnost beljakovin – B (mg) in pepela – P (mg), povprečna vsebnost SPV (g/100 g), standardni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD) v dnevni in tedenski ponovitvi za vsako posamezno analizirano živilo za opredelitev natančnosti v daljšem času.

| Vsebnost SPV (g/100 g) v živilu |   |       |       |  |        |        |        |        |
|---------------------------------|---|-------|-------|--|--------|--------|--------|--------|
| teden<br>št.<br>ponovitev       | pšenična moka CRM                                 |       |       | ovseni kosmiči T2443                             |        |        |        |        |
|                                 | 1   | 2     | 3     | 1  | 2      | 3      | 4      | 5      |
| 1                               | 3,514   | 3,596 | 3,389 | 11,506   | 10,912 | 11,120 | 11,721 | 13,582 |
| 2                               | 3,425   | 3,588 | 3,424 | 11,513   | 11,616 | 12,055 | 11,759 | 13,014 |
| 3                               | 3,584   | 3,612 | 3,656 | 11,007   | 11,571 | 12,926 | 11,303 | 13,582 |
| 4                               | 3,460   |       |       | 11,645   |        | 11,667 |        |        |
| 5                               | 3,687   |       |       | 11,559   |        |        |        |        |
| 6                               | 3,591   |       |       |  |        |        |        |        |
| 7                               | 3,569   |       |       |  |        |        |        |        |
| B (mg)                          | 0,115   | 0,056 | 0,122 | 0,147  | 0,104  | 0,152  | 0,145  | 0,155  |
| P (mg)                          | 5,7   | 6,4   | 6,1   | 7,8  | 12,2   | 12,9   | 13,2   | 12,2   |
| $\bar{x}_{izm}$                 | 3,547   | 3,599 | 3,49  | 11,45  | 11,37  | 11,942 | 11,59  | 13,39  |
| s                               | 0,088   | 0,012 | 0,15  | 0,25   | 0,39   | 0,903  | 0,25   | 0,33   |
| RSD                             | 2,5   | 0,35  | 4,2   | 2,2  | 3,5    | 7,6    | 2,2    | 2,4    |
|                                 | $\bar{x}_{izm} = 3,450$<br>s = 0,082<br>RSD = 2,3 |       |       | $\bar{x}_{izm} = 11,95$<br>s = 0,84<br>RSD = 7,0 |        |        |        |        |

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Posamezne vsebnosti SPV (g/100 g), povprečna vsebnost beljakovin – B (mg) in pepela – P (mg), povprečna vsebnost SPV (g/100 g), standardni odmik (s) in relativni odmik (s) in relativni standardni odmik (RSD) v dnevni in tedenski ponovitvi za vsako posamezno analizirano živilo za opredelitev natančnosti v daljšem času.

| Vsebnost SPV (g/100 g) v živilu |   |        |        |        |        |  |       |       |       |       |
|---------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--|-------|-------|-------|-------|
| teden<br>št.<br>ponovitev       | fižol   |        |        |        |        | sadni sok  |       |       |       |       |
|                                 | 1   | 2      | 3      | 4      | 5      | 1  | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 1                               | 61,746  | 59,689 | 59,452 | 59,031 | 59,267 | 0,644  | 0,828 | 0,936 | 0,643 | 0,798 |
| 2                               | 61,260  | 59,834 | 59,320 | 59,311 | 60,072 | 0,804  | 0,888 | 0,986 | 0,613 | 0,788 |
| 3                               | 60,914  | 58,955 | 59,171 | 59,755 | 59,518 | 0,784  | 0,858 | 0,866 | 0,833 | 0,848 |
| 4                               | 60,652  | 58,933 | 59,432 |        |        | 0,824  |       |       |       |       |
| 5                               | 59,851  |        |        |        |        | 0,654  |       |       |       |       |
| 6                               | 61,456  |        |        |        |        | 0,754  |       |       |       |       |
| 7                               |   |        |        |        |        | 0,904  |       |       |       |       |
| 8                               |   |        |        |        |        | 0,854  |       |       |       |       |
| 9                               |   |        |        |        |        | 0,734  |       |       |       |       |
| B (mg)                          | 0,150   | 0,103  | 0,096  | 0,105  | 0,106  | 0,232  | 0,239 | 0,299 | 0,297 | 0,242 |
| P (mg)                          | 21,2  | 21,4   | 22,1   | 23,1   | 21,2   | 2,8  | 3,1   | 3,3   | 3,5   | 3,9   |
| $\bar{x}_{izm}$                 | 60,98   | 59,35  | 59,31  | 59,37  | 59,62  | 0,772  | 0,858 | 0,929 | 0,69  | 0,811 |
| s                               | 0,68  | 0,47   | 0,14   | 0,37   | 0,41   | 0,087  | 0,030 | 0,060 | 0,12  | 0,032 |
| RSD                             | 0,64  | 0,79   | 0,24   | 0,62   | 0,69   | 11   | 3,5   | 6,5   | 17    | 3,9   |
|                                 | $\bar{x}_{izm} = 59,73$<br>$s = 0,41$<br><b>RSD = 0,6</b> |        |        |        |        | $\bar{x}_{izm} = 0,81$<br>$s = 0,66$<br><b>RSD = 8,5</b> |       |       |       |       |