

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maša TOMINEC

**KVANTITATIVNA DOLOČITEV AMINOKISLIN V MEDU Z
METODO HPLC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN HONEY
BY HPLC METHOD**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Meritve na sistemu HPLC so bile opravljene v laboratoriju Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maša Tominec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 638.162. + 638.165.8: 543: 547.466:547.96(043) = 163.6
KG med/vrste medu/pristen med/potvorjen med/aminokislina/skupne beljakovine/
HPLC/ validacija HPLC metode/potvorbe medu
AV TOMINEC, Maša
SA GOLOB, Terezija (mentorica) / VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2010
IN KVANTITATIVNA DOLOČITEV AMINOKISLIN V MEDU Z METODO HPLC
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 68 str., 22 pregl., 15 sl., 64 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen raziskave je bil določiti vsebnost aminokislina prolina s spektrofotometrično metodo, skupnih beljakovin s Kjeldalovo metodo, kvantitativno določiti 21 aminokislin z metodo HPLC in ugotoviti razlike med pristnim in namerno potvorjenim medom. Raziskava je bila opravljena na skupno 113 vzorcih medu, petih različnih vrst: akacijevega (16), lipovega (16), kostanjevega (18), cvetličnega (18) in gozdnega (20) medu ter na 25 vzorcih namerno potvorjenega medu z različnimi deleži sladkornih sirupov. Vsebnost prolina, analizirana s spektrofotometrično metodo, je bila od 345 mg/kg do 796 mg/kg. Največja vsebnost je bila določena v kostanjevem, najmanjša pa v akacijevem medu. Vsebnost beljakovin je bila od 1364 mg/kg v akacijevem, do 3995 mg/kg v kostanjevem medu. Aminokislinsko sestavo smo analizirali z metodo HPLC z derivatizacijskim reagentom DEMM, ki smo jo modificirali in validirali. Določili smo 21 aminokislin, ki si glede na vsebnost sledijo v padajočem zaporedju: prolin, fenilalanin, alanin, glutamin, asparagin, glutaminska kislina, tirozin, lizin, serin, treonin, arginin, asparaginska kislina, histidin, valin, cistein, glicin, levcin, alo-izolevcin, metionin, izolevcin in triptofan. Skupna vsebnost vseh aminokislin je bila od 712 mg/kg v akacijevem medu do 994 mg/kg v gozdnem medu. Vsebnost najbolj zastopane aminokislina prolina je bila od 231 mg/kg v akacijevem, do 395 mg/kg v kostanjevem medu. S spektrofotometrično metodo smo v povprečju dobili višje vrednosti prolina kot s HPLC metodo (za 50 % pri akacijevem, 67 % pri cvetličnem, 70 % pri gozdnem in 100 % pri kostanjevem medu). Pri potvorjenih medovih smo dokazali, da se z večanjem deleža sirupa zmanjšuje delež aminokislin. S statistično obdelavo rezultatov smo poiskali zveze med obravnavanimi parametri.

DN Dn
DC UDC 638.162. + 638.165.8: 543: 547.466:547.96(043) = 163.6
CX honeys/authentic honey/ adulterated honey/amino acids/total proteins /HPLC/
validation of HPLC method/authenticity of honey
AU TOMINEC, Maša
AA GOLOB, Terezija (supervisor) / VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2010
TI QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN HONEY BY HPLC
METHOD
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 68 p., 22 tab., 15 fig., 64 ref.
LA sl
AL sl/en
AB

The purpose of the study was to determine the differences between authentic and adulterated honey through determination of the content of amino acid proline with spectrophotometric method, total protein and quantitative determination of other amino acids with HPLC method. The research was conducted on a total of 113 samples of five different types of honey: acacia (16), linden (16), chestnut (18), floral (18) and forest (20) honey, and on the 25 intentionally adulterated samples of honey containing different proportions of sugar syrups. The proline content, analyzed by spectrophotometric method, ranged between 345 mg/kg and 796 mg/kg. Its highest content was determined in chestnut honey, while the lowest content was found in acacia honey. The protein content ranged from 1364 mg/kg in acacia honey, to 3995 mg/kg in chestnut honey. The amino acid composition was analyzed by means of modified and validated HPLC method, using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate reagent (DEMM). The following amino acids were determined in descending order: proline, phenylalanine, alanine, glutamine, asparagine, glutamic acid, tyrosine, lysine, serine, threonine, arginine, aspartic acid, histidine, valine, cysteine, glycine, leucine, allo-isoleucine, methionine, isoleucine and tryptophan. The total content of amino acids ranged from 712 mg/kg in acacia honey to 994 mg/kg in forest honey. The amount of proline ranged from 231 mg/kg in acacia honey to 395 mg/kg in chestnut honey. Comparing spectrophotometric and HPLC method, on average, higher values of proline were determined by spectrophotometric method (50% increase for acacia honey and 67% increase for floral honey, 70% increase for forest honey and 100% increase for chestnut honey). By increasing the proportion of syrup in adulterated honey samples the proportion of amino acids content is reduced. With a statistical evaluation of the results statistically significant relations among analyzed parameters and honey types were found.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS INFORMATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MED	3
2.2 BELJAKOVINE	4
2.2.1 Beljakovine v medu	5
2.2.2 Metode za določanje beljakovin	6
2.3 AMINOKISLINE	7
2.3.1 Aminokislina v medu	9
2.3.2 Določanje aminokislin v medu	11
2.3.2.1 Metode za določanje potvrjenosti medu	17
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 VZOREC	19
3.2 FIZIKALNO KEMIJSKE METODE	19
3.2.1 Določanje vsebnosti aminokislina prolin	19
3.2.2 Določanje vsebnosti skupnih beljakovin	21
3.2.3 Določanje vsebnosti aminokislin z metodo HPLC	22
3.2.4 Pregled parametrov validacije v danih pogojih	28
3.3 STATISTIČNA ANALIZA	31
3.3.1 Enovzorčna analiza	31
3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje	31
3.3.1.2 Varianca in standardni odklon	31
3.3.1.3 Koeficient variabilnosti	32
3.3.1.4 Mediana	32
3.3.2 Analiza povezanosti dveh spremenljivk	32
3.3.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu	32
3.3.2.2 Koeficient determinacije	33
3.3.3 Večvzorčna analiza ene spremenljivke	33
3.3.3.1 Parametrični in neparametrični testi	34
3.3.3.2 Levenov test homogenosti variance	34
3.3.3.3 ANOVA – Analiza variance	35
3.3.3.4 Duncanov test	35
3.3.3.5 Studentov t-test	35
4 REZULTATI	37
4.1 USTREZNOST KROMATOGRAFSKEGA SISTEMA (SST)	37
4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI BELJAKOVIN IN AMINOKISLIN	43
4.2.1 Vsebnost beljakovin in aminokislin v vzorcih medu	43
4.2.2 Zveze med analiziranimi parametri v vzorcih medu	44

4.2.3	Rezultati določanja beljakovin in aminokislin v vzorcih potvorjenega medu	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA	49
5.1.1	Primerjava povprečnih vrednosti preiskovanih parametrov	49
5.1.2	Primerjava naših rezultatov z domačo in tujo literaturo	51
5.1.3	Vpliv dodatka sirupa na merjene parametre v vzorcih medu	54
5.1.4	Regresijska analiza preiskovanih parametrov	56
5.1.4.1	Zveza med vsebnostjo prolina analiziranega s HPLC metodo in vsebnostjo beljakovin	56
5.1.4.2	Zveza med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina analiziranega s SPF metodo	57
5.1.4.3	Zveza med vsebnostjo skupnih aminokislin in vsebnostjo prolina analiziranega s SPF metodo	58
5.1.4.4	Zveza med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s HPLC metodo	59
5.1.4.5	Zveza med skupno vsebnostjo beljakovin in vsoto aminokislin s HPLC metodo	60
5.2	SKLEPI	61
6	POVZETEK	62
7	VIRI	64
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Najmanjše in največje vrednosti aminokislin v medu (mg/kg) (Cotte in sod., 2003; Hermosin in sod., 2003; Nozal in sod., 2004; Bernal in sod., 2005)	11
Preglednica 2: Raziskave aminokislinske sestave medu različnih avtorjev	13
Preglednica 3: Povprečne vsebnosti (\bar{x}) v (mg/kg) in standardna deviacija (SD) v(mg/kg) s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in posameznih aminokislin s HPLC metodo, v vzorcih medu (Bernal in sod. 2005)	16
Preglednica 4: Referenčni standardi za določanje aminokislinske sestave in njihove karakteristike	25
Preglednica 5: Gradient mobilne faze	25
Preglednica 6: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti med spremenljivkama (Seljak, 1996)	33
Preglednica 7: Rezultati preiskovanih referenčnih standardov za ustreznost kromatografskega sistema	37
Preglednica 8: Kriteriji sprejemljivosti validacijskih parametrov	38
Preglednica 9: Natančnost (dnevna in meddnevna ponovljivost) metode HPLC za določanje aminokislin	39
Preglednica 10: Izkoristki aminokislinske prolin (%) in RSD med izkoristki (%), glede na standardni dodatek aminokislinske prolin	39
Preglednica 11: Retencijski časi aminokislin ($\min \pm 0,2$ min)	41
Preglednica 12: Povprečne vrednosti (\bar{x}) v (mg/kg) in standardna deviacija (SD) v (mg/kg), vsebnost prolina spektrofotometrično (prolin SPF), skupnih beljakovin s Kjeldalovo metodo (beljakovine) in posameznih aminokislin s HPLC metodo, v petih vrstah medu	43
Preglednica 13: Zveza med analiziranimi parametri (korelacijski koeficienti (r)) v vzorcih medu)	45
Preglednica 14: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih akacijevnega medu letnika 2010, potvorjenega z različnimi deleži sirupov	46
Preglednica 15: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih cvetličnega medu letnika 2010, potvorjenega z različnimi deleži sirupov	47
Preglednica 16: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih gozdnega medu letnika 2010, potvorjenega z različnimi deleži sirupov	48
Preglednica 17: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih sladkornih sirupov	48
Preglednica 18: Povprečne vrednosti (\bar{x}) v (mg/kg) in standardna deviacija (SD) v (mg/kg) v vzorcih medu. Vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo (prolin SPF), beljakovin (beljakovine) in vsebnost aminokislin (\sum AK HPLC)	49
Preglednica 19: Rezultati Duncanovega testa	50
Preglednica 20: Primerjava vsebnosti prolina (mg/kg) v petih vrstah medu, s spektrofotometrično metodo (prolin SPF), med našimi meritvami in meritvami Golob, (2006)	51
Preglednica 21: Primerjava vsebnosti skupnih beljakovin (g/100 g), v petih vrstah medu, s Kjeldalovo metodo, med našimi meritvami in meritvami Golob, (2006)	52
Preglednica 22: Primerjava vsebnosti aminokislinske sestave (HPLC) in prolina s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) v različnih vrstah medu, med našimi meritvami in meritvami Bernal in sod.,(2005)	53

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Splošna strukturna formula aminokislin (Vrtačnik in Zupančič Brouwer; 2003)	7
Slika 2: Strukturne formule 20 aminokislin (Vrtačnik in Zupančič Brouwer, 2003)	8
Slika 3: Reakcija aminokislina z derivacijskim reagentom DEMM (Alaiz in sod., 1992)	27
Slika 4: Shematski prikaz ovrednotenja LOQ in LOD (Snyder in sod.,1997)	30
Slika 5: Kromatogram slepega vzorca	40
Slika 6: Primer kromatograma raztopine vzorca medu	41
Slika 7: Določanje linearnosti metode HPLC s standardno raztopino prolina	42
Slika 8: Vsebnost prolina določena s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in skupnih aminokislin (HPLC) v vzorcih akacijevega medu, potrjena z različnimi deleži sirupa GF2	54
Slika 9: Vsebnost prolina določena s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in skupnih aminokislin (HPLC) v vzorcih cvetličnega medu potrjenega z različnimi deleži sirupa GF, IN, GL	55
Slika 10: Vsebnost prolina določena s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in skupnih aminokislin (HPLC) v vzorcih gozdnega medu potrjenega z različnimi deleži sirupa GF, IN, GL	55
Slika 11: Zveze med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina z metodo HPLC za posamezne vrste medu	56
Slika 12: Zveze med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina s spektrofotometrično metodo, za posamezne vrste medu	57
Slika 13: Zveze med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s spektrofotometrično metodo za posamezne vrste medu	58
Slika 14: Zveze med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s HPLC metodo za posamezne vrste medu	59
Slika 15: Zveze med vsebnostjo beljakovin in skupno vsebnostjo aminokislin za posamezne vrste medu	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

\bar{x} - povprečna vrednost
A – akacijev med
ANOVA - analiza variance (ang. Analysis of variance)
AK - aminokislina
C – cvetlični med
c - koncentracija raztopine, izražena v mol/l
G – gozdni med
GC - plinska kromatografija
GF – glukozno fruktozni sirup letnik 2009
GF2 – glukozno fruktozni sirup letnik 2010
GL – glukozni sirup 2009
HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC – ionska kromatografija
IN – inertni sirup 2009
K – kostanjev med
L – lipov med
LOD - meja detekcije
LOQ - meja kvantifikacije
MS – plinska kromatografija
N - število teoretičnih podov kolone
n – število obravnavanih vzorcev
Prolin SPF –prolin določen s spektrofotometrično metodo
R - ločljivost
r - Pearsonov koeficient korelacije
 r^2 - koeficient determinacije
 R^2 - koeficienti korelacije
RS1/RS2 – pokrivanje standardov aminokislin
RSD - relativni standardni odklon
 s^2 - varianca
SD - standardna deviacija
Sig.- Signifikanca, statistična značilnost
SST - ustreznost kromatografskega sistema
T - faktor popačenja kolone
 t_r - retencijski čas
 x_{max} - maksimalna vrednost
 x_{min} - minimalna vrednost
 α - stopnja tveganja

1 UVOD

Najstarejši dokumenti iz zgodovine človeštva pričajo, da je bil med že v pradavnini cenjeno živilo. Prazgodovinski človek je po duplih iskal čebelje satje in ga užival, podobno kot to delajo medvedi. Iz dobe faraonov, pred približno 5000 leti, kažejo reliefi, kako so v tistem času izrezovali satje iz panjev. Kasneje so pridobivali med ali strd s stiskanjem satja. Zapiski iz starega in srednjega veka pričajo, da je postalo pridobivanje medu, tako pri naših prednikih kot tudi pri drugih narodih, družbeno cenjeno delo.

Med je proizvod medonosnih čebel in je gosta, sladka, sirupasta ali kristalinična snov, svetlo rumene do temno rjave barve, specifičnega okusa in vonja. Za 1 kg medu morajo čebele obleteti 15 milijonov cvetov. Med je sestavljen v glavnem iz različnih sladkorjev, predvsem fruktoze in glukoze, in iz drugih snovi, kot so organske kisline, encimi, minerali, beljakovine in aminokisline. Prav snovi, ki so v medu v manjših količinah, so odgovorne tako za senzorične lastnosti, to je za barvo, vonj, okus in aromo posameznih vrst medu kot tudi za razlikovanje med vrstami medu. Z analizo fizikalnokemijskih parametrov, senzoričnih lastnosti in pelodne slike lahko preverimo pristnost medu glede na navedeni botanični izvor, morebitno geografsko poreklo in možnost potvorbe.

V diplomskem delu smo se osredotočili na vsebnost skupnih beljakovin in posameznih aminokislin, da bi ugotovili njihov vpliv na razlikovanje med posameznimi vrstami medu.

1.1 NAMEN DELA

Podatki o vsebnosti posameznih aminokislin v medu so v znanstveni literaturi redki. Zasledimo večinoma podatke o vsebnosti aminokislin, ki se nanašajo na med iz oddaljenih geografskih področij, nam tujega botaničnega porekla. Med aminokislinami v medu ima prolina pomembno vlogo. Z analizo njegove vsebnosti lahko določamo kakovost, zrelost in pristnost medu. Za določanje prolina v medu se uporablja standardna spektrofotometrična metoda, ki temelji na barvni reakciji z ninhidrinom.

Namen diplomskega dela je bil v prvi fazi validirati metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za določanje vsebnosti aminokislin v medu. V drugi fazi smo z metodo HPLC v vzorcih medu ločili 21 aminokislin in jih kvantitativno ovrednotili. Analizirali smo pet različnih vrst medu (akacijev, lipov, kostanjev, cvetlični in gozdni) in vzorce namerno potvorjenega medu, ki smo jim dodali različne deleže sladkornih sirupov. Uporabili smo glukozni, glukozno-fruktozni in invertni sirup. V tretji fazi dela smo v vzorcih medu določili vsebnost skupnih beljakovin s Kjeldahlovo metodo in vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo. S statistično analizo zbranih rezultatov smo preverili, če obstajajo povezave med vsebnostjo aminokislin in skupnih beljakovin ter primerjali rezultate analize prolina z dvema metodama. V zadnji fazi smo poiskali zveze med obravnavanimi parametri.

1.2 HIPOTEZE

- Predvidevali smo, da bomo z analizami v okviru diplomskega dela uspeli:
 - izbrati primerno metodo HPLC za določanje aminokislinske sestave medu,
 - validirati osnovne parametre validacije HPLC metode,
 - ločiti in kvantificirati 21 aminokislin v vzorcih različnih vrst slovenskega medu.
- Pričakovali smo, da se bo HPLC metoda izkazala kot primerna metoda za ugotavljanje pristnosti oziroma potvorjenosti medu.
- Predvidevali smo, da bomo z metodo HPLC določili manjše vsebnosti prolina kot s spektrofotometrično metodo.
- Pričakovali smo zvezo med vsebnostjo aminokislin in beljakovin ter predvidevali, da je njuna vsebnost odvisna od botaničnega porekla medu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MED

Med je eno najbolj kompleksnih naravnih živil, ki lahko nastane tudi brez posegov človeka in je edino sladilo, ki ga ljudje lahko uporabljamo brez predelave. Med pridelajo medonosne čebele iz cvetličnega nektarja ali iz različnih vrst mane, to so drugi izločki živih rastlinskih delov ali izločki žuželk, ki živijo na teh rastlinah. Čebele predelujejo medicino tako, da ji dodajajo izločke svojih žlez – encime, ki delujejo kot katalizatorji v biokemijskih reakcijah. Med nato shranijo v pokritih celicah satja, da zori. Nekatere komponente v medu izvirajo iz rastlin, nekatere dodajo čebele in nekatere nastanejo na podlagi biokemijskih reakcij med dozorevanjem (Iglesias in sod., 2004).

Med je visokovredno naravno živilo. Je kompleksna mešanica 300 različnih kemijskih spojin. Med njimi je največ različnih sladkorjev (75 - 80 %) in vode (14 - 20 %), poleg tega pa so v medu še številne druge snovi: organske kisline (0,1-1 %), različni elementi (0,1 - 1,5 %), beljakovine (0,2 -2 %), proste aminokisline, encimi (invertaza, katalaza, glukozidaza, fosfataza), vitamini (B1, B2, B6, C, pantotenska, nikotinska in folna kislina ter biotin), hormon acetilholin, barvila, flavonoidi in fenolne spojine ter v sledovih tudi številne organske snovi. Prav snovi, ki so v medu v manjših količinah, so odgovorne za senzorične lastnosti, to je za barvo, vonj, okus in aromo posameznih vrst medu (Golob in sod., 2008).

Kadar čebele nabirajo medicino pretežno na eni vrsti rastlin in ima tak med značilne fizikalnokemijske, mikroskopske in senzorične lastnosti, ga lahko poimenujemo z imenom, ki izvira iz imena rastline. Značilne rastlinske vrste v Sloveniji, ki čebelam služijo za pašo, so: akacija (robinija), lipa, smreka, hrast, kostanj, hoja, oljna ogrščica, včasih tudi ajda. Za slovenski cvetlični med je značilno, da ga čebele ne nabirajo samo na eni in isti vrsti cvetlic, temveč na cvetovih različnih vrst, tako, da je tudi njegova sestava različna (Božnar in Senegačnik, 1998).

Zgodaj spomladi začnejo čebele nabirati cvetlični prah in medicino, takoj ko začneta cveteti črni teloh in leska. Kmalu za njima začnejo cveteti tudi drugi znanilci pomladi. Med najštevilnejšimi in najbolj znanimi so zvončki in vrbe. Čebele to prvo spomladansko pašo porabijo zase, čebelarji tega medu še ne točijo. Nato začnejo cveteti zgodnje vrste sadja, kot sta marelica in breskev. Prvi medovi, ki so nektarnega izvora, so pogosto nabrani predvsem na sadnem drevju. V gozdu je tedaj najpomembnejša divja češnja, za njo pa še različne vrste javorja. Na njem se lahko razvijejo kolonije listnih ušic, ki izločajo mano in s tem prispevajo k večji beri medu ob cvetenju te drevesne vrste. Tako dobimo mešani med ali celo prvi pravi med iz mane. V tem obdobju na travnikih najprej zacvetijo trobentice, za njimi pa tudi spominčice in regrat. Tako na nekaterih območjih točijo tudi regratov med. Ob odpiranju prvih cvetov pasje trave na travniku zacvetijo še druge medovite rastline, kot so travniška kadulja, vrste grabljišča in nokota, pozneje pa tudi glavinci. V nižinah najdemo polja oljne ogrščice. Med oljne ogrščice se v Sloveniji vse bolj pogosto pojavlja. V toplejših krajih Slovenije, zlasti v vinorodnih, se nekoliko pozneje v maju začnejo odpirati robinije (akacije). To je prva obilnejša paša v Sloveniji. Po cvetenju robinije se

nadaljuje paša na travnikih, poleg tega pa se v gozdovih lahko pojavi večje izločanje mane, in to tako na listavcih kot tudi na smreki (Božič, 2008).

V začetku julija zacvetita lipa in lipovec, oba pa sta bogata z medicino. V nekaterih krajih, zlasti Kočevskem in Tolminskem, čebelarji točijo čisti lipov med. V vinorodnih krajih, Zasavju, Polhograjskih Dolomitih in v Škofjeloškem hribovju, v drugi polovici junija, začne cveteti kostanj, na katerem čebele naberejo medicino za kostanjev med. Že ob cvetenju kostanja se lahko na smreki in jelki (hoji) razvijejo kolonije listnih uši in kaparjev, ki poleti izločajo mano za nastanek smrekovega in hojevega medu. V nižinah se pozno poleti razcveti zlasti močvirsko rastlinje, vendar to le popestri prehrano čebel, čebelarju pa le izjemoma omogoči dodatno točenje medu. Jeseni čebele najdejo medicino še na bršljanu, to pa je zadnja večja paša v naših krajih. Razmerja med posameznimi vrstami so odvisna tako od kraja in časa nabiranja kot tudi od leta predelave (Božič, 2008).

Pri ugotavljanju vrste in kakovosti medu imajo pomembno vlogo fizikalnokemijske kot tudi senzorične lastnosti medu. Te lastnosti so odvisne od botaničnega in geografskega izvora, od količinskega razmerja posameznih sestavin v medu (barvil, sladkorjev, organskih kislin, mineralnih snovi, beljakovin, aminokislin), od vremenskih razmer, časa medenja, individualne čebelarke prakse ter od ravnanja z medom med skladiščenjem. Ravno senzorične lastnosti so za potrošnike prvo merilo kakovosti medu, zato odločilno vplivajo na njegovo sprejemljivost (Golob in sod., 2008).

Barva medu je zelo različna za posamezne vrste medu in je odvisna od količine beljakovin, aminokislin in vsebujočega dušika, mineralov in fenolnih spojin. Čim več jih je, toliko temnejša barva bo. Glukoza in fruktoza sta polihidroksialdehid oziroma polihidroksiketon, ki reagirata z aminokislinami in beljakovinami (natančneje z amino skupinami omenjenih snovi), pri čemer nastanejo temno obarvane spojine, melanoidini. Temna barva medu bi lahko nastala tudi umetno s segrevanjem. Vendar vsako močnejše segrevanje povzroči karamelizacijo, ki daje medu značilen okus (Javornik in sod., 1982).

2.2 BELJAKOVINE

Molekule beljakovin so ene od osnovnih molekul življenja ali biomolekul. Prisotne so v vsaki živi celici in v vsakem njenem delu. Beljakovine tvorijo približno polovico mase suhe snovi v celici. V živi celici opravljajo številne in raznovrstne funkcije, pri čemer je njihova kemijska struktura zelo podobna.

Leta 1838 je nizozemski kemik Mulder izraz protein prvič uporabil, ko je poimenoval skupine molekul, ki so široko zastopane v vseh rastlinah in živalih. V grščini pomeni *proteios* glavni oziroma prvi v vrsti, s čimer je pravilno napovedal pomen proteinov. V slovenščini, posebej v zvezi s prehrano, proteine pogosto imenujemo tudi beljakovine. Proteini, ki so biološki polimeri aminokislin, imajo veliko različnih struktur in funkcij. Strukturo vsakega od proteinov določa njegovo zaporedje aminokislin, ki je zapisano v molekuli DNA. Značilna sestava in zaporedje aminokislin omogočata vsakemu proteinu, da se zvije v natančno določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo potrebuje za svojo natančno določeno biokemijsko vlogo. Veliko število raznovrstnih bioloških funkcij je pri proteinih posledica številnih možnih kombinacij v aminokislinski sestavi. Sinteza

proteinov, ki poteka v celici v skladu z informacijo, ki je zapisana v DNA, pripelje do nastanka mnogih različnih molekul. Za sintezo beljakovin uporabljajo živi organizmi le 20 aminokislin, in sicer v najrazličnejših kombinacijah. Tako kot iz 25 črk abecede tvorimo nešteto besed in stavkov, tako narava iz 20 aminokislin sestavlja veliko različnih beljakovin (Boyer, 2002).

Naše telo svoje beljakovine stalno prenavlja, razgrajuje in ponovno gradi. Razgradnji beljakovin na aminokislino pravimo hidroliza, saj pri tem sodeluje tudi voda. Iz prostih aminokislin organizem nato gradi nove beljakovine za svoje potrebe. Del aminokislin se porabi za sintezo drugih spojin, če jih zaužijemo preveč, pa telo iz njih pridobiva tudi energijo. Zato mora telo pridobivati beljakovine s hrano. Ko beljakovine zaužijemo, jih prebavni sokovi v želodcu in dvanajsterniku hidrolizirajo v aminokislino. Ti sokovi vsebujejo encime proteaze, ki postopno razgradijo polipeptidne verige na krajše fragmente in naposled na posamezne aminokislino. Te se nato v tankem črevesju absorbirajo v krvni obtok. Tako iz hrane dobimo aminokislino, ki jih nato naše telo uporabi za sintezo lastnih beljakovin. Vendar pa ponavadi razmerja med aminokislinami v hrani niso povsem enaka tistemu, kot bi jih naše telo potrebovalo. Nekaterih je preveč, drugih premalo. Na srečo naše telo aminokislino pretvarja eno v drugo. Vendar to pa ne velja za vse aminokislino (Čeh in Dolenc, 2010). Deset naravnih aminokislin se v človeškem telesu ne more sintetizirati in jih moramo zato pridobiti s hrano. Imenujemo jih esencialne aminokislino. Esencialne aminokislino so arginin, fenilalanin, histidin, izolevcin, levcin, lizin, metionin, treonin, triptofan in valin. Neesencialne aminokislino so: alanin, asparaginska kislina, asparagin, cistein, glutaminska kislina, glutamin, glicin, prolin, serin in tirozin (Owusu-Apente, 2005).

2.2.1 Beljakovine v medu

Nektar in mana vsebujeta beljakovine le v sledovih, medtem ko je cvetni prah bogat z beljakovinami (10 % do 35 %). Ker je cvetličnega prahu v medu malo, se je izkazalo, da je glavni vir beljakovin v medu izloček čebelnih žlez med predelovanjem nektarja in mane v med. Delež beljakovin v medu se giblje v mejah od 0 % do 1,67 % (Javornik in sod., 1984).

Vsebnosti skupnih beljakovin je bila najmanjša v akacijevem medu 0,16 g/100 g (Golob, 2006). V naraščajočem zaporedju pa sledijo povprečja skupnih beljakovin v lipovem medu z 0,17 g/100 g, hojinem z 0,25 g/100 g, smrekovem z 0,27 g/100 g, gozdnem z 0,30 g/100 g, cvetličnem z 0,31 g/100 g ter kostanjevem z 0,35 g/100 g.

Beljakovine in aminokislino v medu so tako živalskega kot rastlinskega izvora, največji delež aminokislin ima prolin. Skupna vsebnost aminokislin v medu znaša okoli 1 %, v katerem ima največji delež prolin (50-85 %). Poleg prolina je v medu še 26 drugih aminokislin, njihova vsebnost pa je odvisna od porekla medu (Hermosin in sod., 2003).

Leta 1978 je White poročal, da je vsebnost dušika v medu le 0,04 % (40 mg/100 g medu), beljakovin pa 0,2 %. Anklam (1998) piše, da je delež beljakovin v medu običajno manjši od 0,5 %, Božnar (2003) navaja, da se vsebnost beljakovin v medu giblje med 0,2 in 0,3 %.

González-Paramas in sod. (2006) navajajo, da je povprečni delež beljakovin le 0,3 %. Zaradi prisotnosti beljakovin ima med manjšo površinsko napetost, kot bi jo imel sicer, saj spodbuja nastajanje drobnih mehurčkov zraka. Tak primer je ajdov med, kjer se zelo hitro oblikujejo površinske pene, to pa predvsem zato, ker vsebuje relativno veliko količino beljakovin (White in sod., 1980).

2.2.2 Metode za določanje beljakovin

V praksi se najpogosteje uporablja indirektna Kjeldahlova metoda, ki je uradno predpisana za določanje skupnih beljakovin v medu. Poimenovana je po danskem kemiku Johanu Kjeldahlu (1849-1900). Temelji na določanju dušika, ki ga je v ta namen potrebno sprostiti iz vzorca. To dosežemo z mokrim sežigom ob pomoči koncentrirane žveplove kisline pri visoki temperaturi. Kislina pretvori vse dušikove spojine v amonijev sulfat. Poskrbeti moramo, da se vzorec popolnoma razgradi in oksidira do ogljikovega dioksida, vode, amoniaka in žveplovega oksida. Največkrat dodajamo k žveplove kislini kot katalizatorje kovinske okside, da dvignejo temperaturo vrelišča na približno 390 °C in spodbudijo razgradnjo vzorca. Amonijev sulfat nato nevtraliziramo s presežkom močne baze in ostanek amonijevih hlapov destiliramo. Destilat lovimo v prebitku borne kisline in nato nastali amonijev borat titriramo s standardizirano klorovodikovo kislino. S tem ovrednotimo količino skupnega organskega dušika, pri končnem izračunu pa upoštevamo povprečno 16 % delež dušika v beljakovinah. Anorganski dušik, ki se nahaja v obliki amoniaka, nitratov in nitritov navadno izpari že med mokrim sežigom in ne vpliva na rezultat vsebnosti organskega dušika. Pomanjkljivost Kjeldahlove metode izhaja iz neselektivnosti za organsko vezan dušik, ki je tako beljakovinskega, kot tudi nebeljakovinskega izvora. Sem sodijo proste aminokisline, amini, amidi, peptidi, vitamini B-kompleksa, dušik iz aromatskih spojin in drugo. Vendar, ker je teh komponent v primerjavi z beljakovinami zelo malo, je napaka, pri določitvi vsebnosti beljakovin iz organskega dušika, minimalna (European Pharmacopoeia, 2008).

Poznamo še nekatere druge metode za določanje vsebnosti skupnih beljakovin v živilih:

- Dumas ali sežigna analiza je metoda, ki jo je razvil Dumas. Vzorec segrejemo pri 950-1000 °C v 99 % kisikovi atmosferi, da dobimo ogljikov dioksid, vodo ter dušikov in žveplov oksid. Plini, ki nastanejo se, razen dušikovega oksida, absorbirajo na posebnih absorbentih. Dušikov oksid nato pretvorimo v dušik in ga nato merimo z detektorjem toplotne prevodnosti. Tako kot pri Kjeldahlovi metodi se določena vrednost dušika pomnoži s faktorjem razmerja dušik-protein. Sežigna analiza ima določene prednosti pred Kjeldahlovo metodo, saj je hitrejša, varnejša in uporablja več okolju prijaznih reagentov (European Pharmacopoeia, 2008).
- Lowrijeva metoda za kvantitativno določanje beljakovin je direktna metoda. Dušikovi peptidi v alkalnem okolju reagirajo z bakrovimi ioni Cu^{2+} , ki se reducirajo v Cu^+ , pri tem pa se sproščajo oksidirane aminokisline, ki povzročijo nadaljnjo redukcijo reagenta Folin-Ciocalteau (fosfomolibden fosfovolframova kislina) v heteropolimolibden moder kompleks. Absorbanca nastalega oksidacijsko-redukcijskega kompleksa modre barve se določa pri maksimumu valovne dolžine, v območju od 745 do 750 nm. Metoda ima odlično občutljivost in je primerna zlasti za določanje majhnih koncentracij beljakovin (European Pharmacopoeia, 2008).

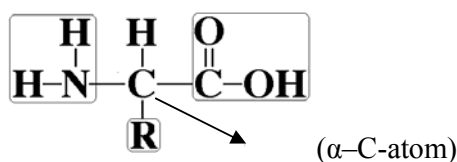
- Bradfordova metoda za določanje skupnih beljakovin je kolorimetrična metoda in prav tako direktna. Temelji na proporcionalni vezavi barvila na beljakovine, kar pomeni, da se v primeru več prisotnih beljakovin, veže več barvila in posledično nastaja intenzivnejša barva. Reagent, Comassie Brilliant Blue, nastopa v dveh barvnih odtenkih: v kislem okolju, v katerem je najbolj obstojen, v protonirani rdeči obliki, po vezavi z beljakovino pa preide v neprotonirano modro obliko. Reakcija je specifična in hitra. Proteinsko vezan kompleks, ki je obstojen približno eno uro, ima visok absorpcijski koeficient. Merjenje absorbance poteka pri 595 nm proti standardni raztopini govejega serumskega albumina (European Pharmacopoeia, 2008).

2.3 AMINOKISLINE

Aminokislina so enostavne spojine, ki jih dobimo, če beljakovine razgradimo po kemijski ali encimski poti (White in sod., 1980).

Aminokislina so derivati karboksilnih kislin, v katerih je eden ali več vodikovih atomov v alkilnem ali arilnem radikalni zamenjan z eno ali več amino skupinami. Zato lahko aminokislina reagirajo kot kisline, baze ali pufri. Aminokislina so gradbeni deli beljakovin. Medseboj se povezujejo s peptidno vezjo (-CO-NH-). Glede na lego amino skupine (-NH₂) in karboksilne skupine (-COOH) ločimo α -, β -, γ - aminokislina. Najvažnejše so α -aminokislina, kjer je amino skupina vezana na ogljikov atom ob karboksilni skupini (α -C-atom) (Klofutar in sod., 1998).

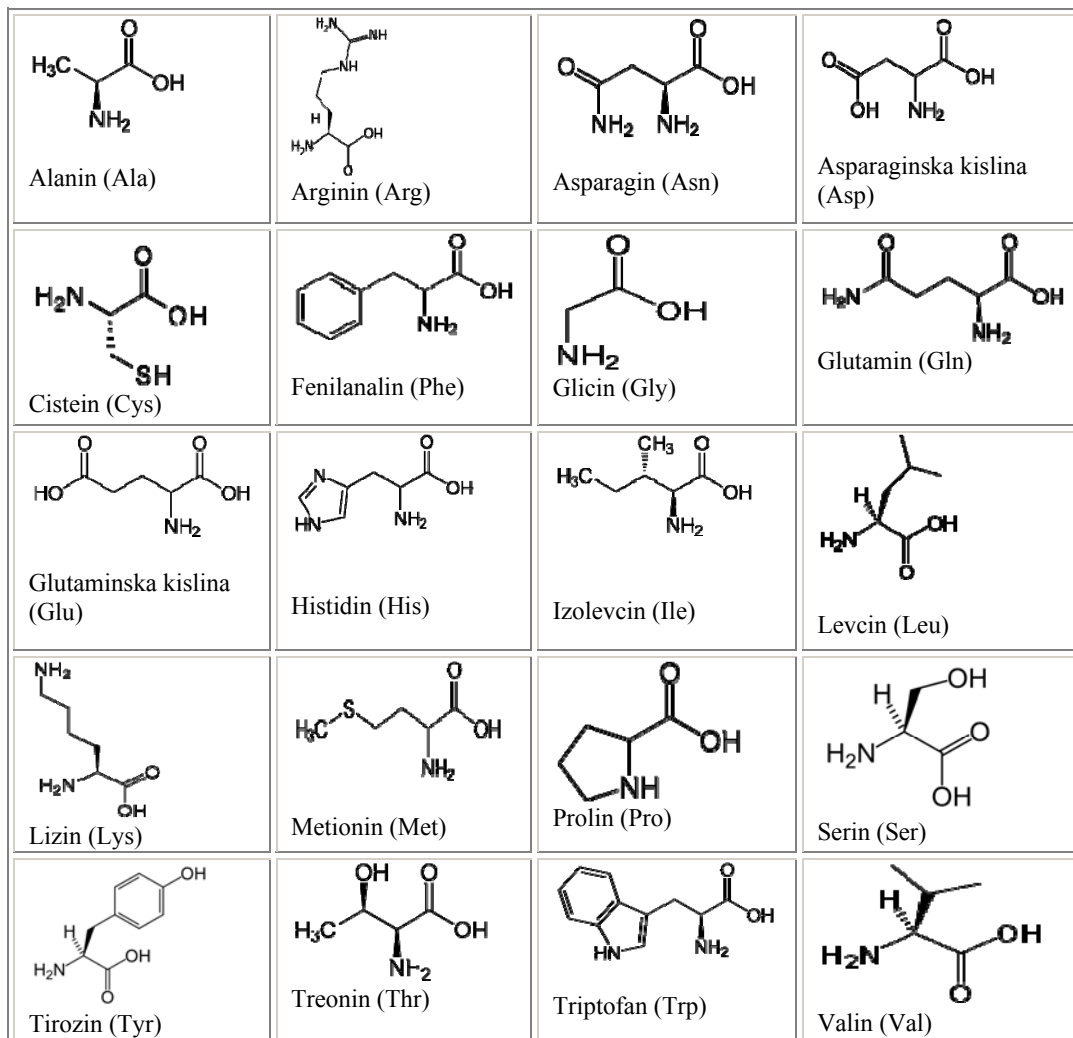
α -aminokislina imajo osnovno strukturo, kot kaže slika 1. α -C-atom je povezan s funkcionalno amino skupino NH₂, karboksilno skupino (COOH), vodikom (H) in stransko verigo (R). V naravi najdemo 20 naravno prisotnih stranskih verig (R) za 20 različnih aminokislin (Owusu-Apenten, 2005) (slika 2).



Slika 1: Splošna strukturna formula aminokislin (Vrtačnik in Zupančič Brouwer; 2003)

Glede na strukturo radikala R oziroma stranske verige, delimo aminokislina tudi v naslednje skupine:

- skupina, kjer je stranska veriga R nevtralna (npr. glicin, alanin, leucin in izoleucin),
- skupina, kjer stranska veriga R vsebuje -OH skupino (npr. serin, treonin, tirozin, hidroksiprolin),
- skupina, kjer stranska veriga R vsebuje žveplovi atom (npr. cistein, metionin),
- skupina, kjer stranska veriga R vsebuje karboksilno skupino (npr. asparaginska kislina, glutaminska kislina),
- skupina, kjer stranska veriga R vsebuje dodatno amino skupino (npr. lizin, arginin, histidin) (Klofutar in sod., 1998).



Slika 2: Strukturne formule 20 aminokislin (Vrtačnik in Zupančič Brouwer, 2003)

Človeški organizem potrebuje dnevno določeno količino esencialnih aminokislin. V različnih vrstah hrane so različne vsebnosti esencialnih aminokislin, v nekaterih živilih pa določenih aminokislin sploh ni.

Aminokislinska sestava tudi vpliva na okus in armo živila. Veliko aminokislin ima izrazito sladek okus (Gly, Ala, Thr, Ser in Glu) ali grenak okus (Phe, Tyr, Arg, Leu, Val, Met in His). Pri dveh aminokislinah okus spominja na umami in rahlo kisel okus (Glu in Asp).

Okus nekaterih fermentiranih proizvodov je povezan z njihovo aminokislinsko in beljakovinsko sestavo. Na primer pri siru in sojini omaki njuna aminokislinska sestava veliko doprinese k okusu in aromi (Owusu-Apentina, 2005).

2.3.1 Aminokislina v medu

Aminokislina so zelo zanimiva vrsta biološko aktivnih snovi, ne le zaradi svoje pomembnosti za življenje in rast, temveč tudi kot glavna komponenta beljakovin. So tudi predhodna sestavina hormonov, nevrottransmitorjev in drugih pomembnih biomolekul. Pomembne so zaradi njihovega doprinosa k hranilni in biološki vrednosti hrane in vplivajo na kakovost, okus, aromo in barvo (Bernal in sod., 2005).

Aminokislinska sestava se zelo razlikuje med vrstami medu, predvsem iz drugega geografskega izvora (Bernal in sod., 2005). Med vsebuje skoraj vse fiziološko pomembno aminokislina (Cotte in sod., 2004; Perez in sod., 2007).

Echigo in sod. so leta 1973 dokazali, da aminokislina v medu lahko izhajajo iz različnih virov: iz nektarja, cvetnega prahu in od čebel. Glede na to, da je cvetni prah skoraj edini vir esencialnih aminokislin v prehrani čebel in, da aminokislinska sestava cvetnega prahu omogoča razlikovanje različnih rastlinskih vrst, je mogoče sklepati, da je aminokislinska sestava medu lahko marker botaničnega ali geografskega porekla medu.

Cvetni prah rastlin je daleč najpomembnejši vir proteinov in prostih aminokislin. Nekatere aminokislina izhajajo od čebel in so skupne mnogim vrstam medu, druge pa, ki izvirajo iz delov rastlin, se razlikuje glede na cvetni prah, kot tudi na osnovno surovino, to je nektar in mano. Doslej se je zanimanje za poznavanje aminokislinskega profila osredotočilo na dve področji:

- kot potencialno orodje za botanično ali celo geografsko razlikovanje medu,
- iz prehranskega vidika, kot vir beljakovin in esencialnih aminokislin za kontrolo kakovosti, kot pokazatelj svežosti in ustreznosti procesa sušenja in shranjevanje peloda, ki temelji na vsebni nekaterih prostih aminokislin (González-Paramas in sod., 2006).

Prolin je aminokislina, ki pride v med predvsem od čebel med obdelavo iz nektarja. Leta 1991 so Von der Ohe in sod. predlagali, da je delež prolina v medu pokazatelj zrelosti medu skupaj z drugimi parametri, ki so povezani s čebelami, kot sta aktivnosti encimov diastaze in invertaze. Prolin v medu mora dosegati vsaj 200 mg/kg in vsaj 66 % od vseh skupnih prostih aminokislin (ponavadi 80-90 %).

Iglesias in sod. (2004) so na podlagi aminokislinske sestave uspeli ločiti nektarni med od maninega. Medovi iz mane so imeli večjo vsebnost skupnih aminokislin kot medovi iz nektarja, izjema sta bili aminokislina fenilalanin in tirozin, ki ju je bilo več v nektarnih medovih. Najbolj zastopana aminokislina v obeh tipih medu je bila prolina. Po padajoči vsebnosti aminokislin so v maninem medu določili glutaminsko kislino, asparaginsko kislino, asparagin, glutamin in fenilalanin. V cvetličnem medu najbolj zastopani aminokislina, prolina, po vsebnosti sledijo fenilalanin, tirozin, glutaminska kislina, asparagin in asparaginska kislina. Aminokislina arginin so našli le v kostanjevem medu, poleg tega je ta vrsta medu vsebovala tudi največ prolina.

Conte in sod. (1998) so v svoji raziskavi ugotovili, da lahko na podlagi vsebnosti glutaminske kisline in triptofana razlikujejo nektarne medove od maninih celo iz istega geografskega območja. Določili so, da se vsebnost glutaminske kisline v cvetličnih medovih giblje med 0,66 in 17,74 mg/100 g (povprečna vrednost 8,39 mg/100 g), v

maninih medovih pa od 23,62 do 67,18 mg/100 g (povprečno 38,97 mg/100 g). Količina triptofana se v cvetličnem medu giblje med 0 in 2,88 mg/100 g in v maninem medu od 0 do 3,52 mg/100 g. Določali so še: asparaginsko kislino, glutaminsko kislino, asparagin, serin, glutamin, histidin, glicin, treonin, arginin, α - in β -alanin, γ -aminomaslena kislina (GABA), tirozin, metionin, valin, triptofan, fenilalanin, izolevcin, levcin, ornitin, lizin, prolin. V nobenem od analiziranih vzorcev niso določili metionina ali ornitina. Ugotovili so, da sta prolin in fenilalanin pomembni aminokislini v cvetličnem medu. Nozal in sod. (2004) so v evkaliptusovemu medu določili največ levcina.

Bernal in sod. (2005) so vsebnost prolina določali s spektrofotometrično metodo in določili od 310 mg/kg do 1084 mg/kg, z metodo HPLC pa od 256 mg/kg do 893 mg/kg.

V različnih raziskavah je bila opravljena analiza vsebnosti aminokislin v različnih vrstah medu, največkrat odvisno od tega, iz katere države je izvirala raziskovalna skupina. Primerjava rezultatov je zato skorajda nemogoča, zato omenjamo le izstopajoče vrste medu oziroma vrednosti. González-Paramas in sod. (2006) so v kostanjevem medu določili najvišje vrednosti triptofana, povprečna vsebnost je znašala 615 mg/kg. Bouesta in sod. (2005) poročajo, da sivkin med vsebuje več prolina in fenilalanina kot evkaliptusov med.

Glede na objavljene rezultate, se skupna vsebnost aminokislin v analizi aminokislinske sestave giblje med 432 in 1766 mg/kg (Bernal in sod. 2005) oziroma med 341,9 in 1831,6 mg/kg (Cotte in sod., 2003). Najmanj aminokislin naj bi vseboval rožmarinov in evkaliptusov med (Hermosin in sod., 2003; Bernal in sod., 2005), največ pa v sivkin, timijanov in kostanjev med (Hermosin in sod., 2003; Cotte in sod., 2003).

V preglednici 1. so predstavljene najmanjše in največje vsebnosti aminokislin (v mg/kg) v vzorcih medu, kot so jih določili v štirih različnih raziskavah. Vsebnost aminokislin so določevali z metodo HPLC.

Preglednica 1: Najmanjše in največje vrednosti aminokislin v medu (mg/kg) (Cotte in sod., 2003; Hermosin in sod., 2003; Nozal in sod., 2004; Bernal in sod., 2005)

	Avtor			
	Hermosin in sod., (2003)	Bernal in sod., (2005)	Cotte in sod., (2004)	Nozal in sod. (2004)
nekatero vrsto medu, ki so jih določali	rožmarinov, evkaliptusov, sivkin, timijanov, in pomarančni med	sivkin, timijanov, manin, gozdni, rožmarinov, cvetlični med	akacijev, kostanjev, sivkin, lipov, cvetlični med	evkaliptusov, rožmarinov, pomarančni, kostanjev med
vsebnost	min –max vsebnost (mg/kg)	min –max vsebnost (mg/kg)	min –max vsebnost (mg/kg)	min –max vsebnost (mg/kg)
aminokislina				
asparaginska kislina	2,3 - 7,7	4 - 126	8,5 - 17,3	11,5 - 151,8
glutaminska kislina	10,4 - 37,6	10 - 138	7,0 - 24,1	8,2 - 244,4
asparagin	1,7 -	4 - 126	5,4 - 15,8	13,5 - 93,9
serin	4,4	7 - 46	5,4 - 9,1	1,4 - 45,6
glutamin	1,1 - 1,6	10 - 91	7,4 - 15,5	4,1 - 114,6
histidin	14,4 - 22,1	10 - 24	0,2 - 10,6	9,6 - 17,8
glicin	5,1 - 10,0	5 - 19	2,3 - 4,6	3,9 - 16,5
treonin	0,8 - 2,1	6 - 25	2,1 - 4,8	4,0 - 21,8
α -alanin	8,0 - 21,3	7 - 68	7,6 - 24,8	8,7 - 89,0
β -alanin	10,8 - 20,3	x	x	x
arginin	10,9 - 25,8	x	5,7 - 11,2	x
γ -aminobutrična kislina	5,3 - 17,0	x	x	x
prolin	280 - 556	265 - 893	208 - 592	212 - 515
tirozil	112 - 299	26 - 215	x	7,1 - 175,1
valin	8,5 - 19,0	5 - 27	3,0 - 8,8	4,3 - 35,1
metionin	0,2 - 0,8	x	0 - 1,3	0,25 - 2,96
cistein	0,05 - 0,12	x	3,2 - 9,7	x
izolevcin	8,5 - 15,6	7 - 16	1,5 - 5,3	x
levcin	5,3 - 8,6	3 - 9	0,7 - 3,5	9,1 - 35,1
triptofan	3,0 - 11	x	0,9 - 2,2	0,43 - 6,66
fenilalanin	122 - 616	115 - 611	5,5 - 1152,8	18 - 308
ornitin	1,7 - 5,2	x	x	0,93 - 13,66
lizin	31,6 - 39,9	23 - 13	7,2 - 16,9	9,7 - 34,3

2.3.2 Določanje aminokislin v medu

Glede na kompleksen matriks medu je določitev njegovega botaničnega porekla težka naloga, saj je sestava medu odvisna od številnih faktorjev, ki vključujejo podnebne in talne razmere (White, 1978).

Ugotovljeno je, da imajo različni medovi različno aminokislinsko sestavo, ki pa je odvisna tudi od geografskega porekla. Ta razlika se povečuje, ko se primerja medove iz iste pokrajine, vendar različnega botaničnega izvora (Davies, 1975; Davies, 1976). Ko so s plinsko kromatografijo analizirali aminokislinsko sestavo v vzorcih medu, se podatki niso ujemali med naslednjimi državami: Anglija, Argentina, Avstralija in Kanada (Gilbret in sod., 1981).

Vrsta medu je odvisna od vrste rastlin, na katerih čebele nabirajo surovino za med. Botanični izvor najpogosteje določimo s pomočjo kemijskih analiz in na podlagi s

senzoričnih lastnosti. Te analize pa ne zagotavljajo popolne točnosti opredelitve oziroma deklariranja medu, zato se za natančnejšo opredelitev vrste medu in določitev geografskega porekla uporablja metoda pelodne analize medu ali melisopalinologija. Metoda temelji na prepoznavanju in določevanju vrstne zastopanosti pelodnih zrn v medu s pomočjo mikroskopiranja (Lutier in Vaissie`re, 1993).

Poleg tega je pri melisopalinologiji težko ugotoviti prisotnost cvetnega prahu v filtriranem medu. Zaradi tega številni raziskovalci iščejo alternativne metode, ki bi zamenjale običajno melisopalinologijo za vrednotenje botaničnega izvora medu (Cometto in sod., 2003).

Z Direktivo o medu (Council directive, 2002) je Evropska ekonomska skupnost določila kakovostne parametre za med, kot so: vsebnost hidroksimetilfurfurala, vsebnost vode in encimska aktivnost. Vendar ti parametri nimajo nobene povezave z geografskim ali botaničnim poreklom medu. Določitev vsebnosti prolina je tradicionalna metoda za prepoznavanje botaničnega porekla medu, vendar ima ta metoda tudi določene pomanjkljivosti. Veliko raziskovalcev je skušalo določiti botanično poreklo medu na osnovi senzoričnih lastnosti medu, sestave sladkorjev, flavonoidov, organskih kislin, beljakovinske ter aminokislinske sestave. Ker pa je prolin glavni vir aminokislin v medu, bi lahko z ovrednotenjem prolina določili botanično poreklo. Z aminokislinsko sestavo lažje določimo botanično poreklo kot z beljakovinsko. V literaturi najdemo podatke, da dobimo boljše in uporabnejše rezultate, če povečamo število vzorcev medu in, da nato statistično obdelamo analitske podatke (Anklam, 1998).

Določanje aminokislinske sestave medu ni novo, vendar je še vedno tema številnih študij. Išče se bolj občutljiva, natančna, hitra in enostavna metoda. Za analizo aminokislin v medu so bile uporabljene tako plinska kot tekočina kromatografija. Aminokislinska analiza je sestavljena iz več korakov: priprave vzorcev, ekstrakcije, derivatizacije aminokislin, kromatografske analize. Vse uporabljene metode imajo svoje prednosti in slabosti. Hkratno kromatografsko ločevanje spojin, dokaj podobne sestave, je zelo velik analitski izziv. Zelo pogosto popolna ločba ni dosežena. V preglednici 2. navajamo nekaj avtorjev, metod in reagentov, s katerimi so uspeli kvalitativno oziroma kvantitativno določiti določeno število aminokislin v medu.

Preglednica 2: Raziskave aminokislinske sestave medu različnih avtorjev

Metoda	Avtor	Št. aminokislin	Reagent	Kvalitativna/ kvantitativna
papirna kromatografija	White (1978)	17 aminokislin		kvalitativna
GC in MS	Bouseta in sod., (1996)	7 hlapnih komponent	OPA	kvalitativna
HPLC	Bouseta in sod., (1996)	17 aminokislin	OPA	kvantitativna
HPLC	Cometto in sod., (2003)	14 aminokislin.	PITC	kvantitativna
HPLC.	Conte in sod., (1998)	15 aminokislin	FMOC	kvantitativna
HPLC	Hermosi in sod., (2003)	22 aminokislin	DEMM	kvantitativna
HPLC	Cotte in sod., (2004)	19 aminokislin	OPA in FMOC	kvantitativna
HPLC	Iglesias in sod., (2004) Perez in sod., (2007)	21 aminokislin	OPA	kvantitativna
GC-FID in GC-MS	Nozal in sod., (2004)	22 aminokislin	EZ:faast GC-MSkatee	kvantitativna
HPLC	Gonzalez Paramas in sod., (2006)	23 aminokislin	OPA in FMOC	kvantitativna
HPLC	Bernal in sod., (2005)	21 aminokislin	DEMM, FMOC in AQC	kvantitativna
HPLC	Perez in sod., (2007)	19 aminokislin	OPA	kvantitativna
HPLC	Pereira in sod., (2008)	19 aminokislin in 6 biogenih aminov	OPA/MCE	kvantitativna
HPLC in MS	Rebane in Herodes (2010)	23 aminokislin	DEMM	kvantitativna

V dostopni literaturi so različni podatki o aminokislinski sestavi medu. White (1978) navaja, da so z uporabo papirne kromatografije že leta 1960 uspeli identificirati 17 aminokislin v medu. Z razvojem separacijskih tehnik in analiznih metod, predvsem v smeri plinske in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, v zadnjem času poročajo o 27 različnih aminokislinah (Hermosin in sod., 2003; Iglesias in sod., 2004; González-Paramas in sod., 2006). Čeprav je prostih aminokislin v medu povprečno le 0,3 % (González-Paramas in sod., 2006), je delež prolina, glede na ostale, prevladujoč. Kljub precejšnjemu variranju je prav prolina tisti, s pomočjo katerega ocenjujemo delež skupnih aminokislin v medu (Meda in sod., 2005). Raziskovalci različnih časovnih obdobj, med njimi tudi White (1979) ter González-Paramas in sod. (2006) so si enotni, da predstavlja prolina od 50 do 85 % skupnih aminokislin v medu.

Bouseta in sod. so leta 1996 poskušali z metodo plinske kromatografije in masnim spektrometrom določiti nekatere aminokislino, ki so predhodniki hlapnih aminokislin. Predvidevali so, da bodo našli povezavo med aminokislinsko sestavo in značilno aromo evkaliptusovega in sivkinega medu. V evkaliptusovem medu so uspeli določiti 7 hlapnih komponent, v sivkinem medu pa samo 5. Vsebnost fenilalanina in tirozina je bila v omenjenih vzorcih medu veliko večja v primerjavi z drugimi aminokislinami. Vsebnost prolina je bila vedno največja v evkaliptusovem medu, ne pa tudi v sivkinem.

Cometto in sod. so leta 2003 analizirali različne vzorce medu iz treh različnih geografskih predelov v Argentini in z uporabo metode HPLC in fenilizotiocianata (PITC - phenylisothiocyanate), derivatizacijskega reagenta, uspeli določiti 14 aminokislin. Ugotovili so, da je aminokislinska sestava povezana predvsem z okolico, kjer rastejo

določene rastline in ne z geografskim poreklom. Kljub temu so našli določeno povezavo med geografskim poreklom in sestavo aminokislin, vendar tudi s to metodo niso dobili želenih rezultatov, zato so predlagali nadaljnje raziskave aminokislinske sestave.

Conte in sod. (1998) so aminokislino najprej izolirali, nato derivatizirali in jih izmerili s pomočjo metode HPLC. V večini vzorcev so določili največjo vsebnost prolina, nato fenilalanina, asparaginske kisline + asparagina, glutaminske kisline + glutamina. Po uporabi linearne diskriminante so ugotovili, da je bilo mogoče razlikovati samo med timijanovim in kostanjevim medom. V zaključku raziskave so predlagali najprimernejšo metodo za določevanje botaničnega porekla medu. Metoda naj bi vključevala kombinacijo določitev aminokislinske sestave, določitev vsebnosti vode, pH vrednosti, določitev vsebnosti sladkorjev, senzorične analize in uporabo statistične analize.

HPLC metoda je z uporabo fluorimetričnega detektorja pokazala možnost ločevanja 19 aminokislin z dvojno derivatizacijo aminokislin z OPA (o-phtalaldehid) in FMOC (9-9-fluorenil-metilkloroformat). S to metodo so uspeli zelo dobro opredeliti sivkin med proti šestim drugim vzorcem medu in potvorjenost medu, z mejo zaznavnosti med 10 in 15 % dodanega sirupa (Cotte in sod., 2004).

Ko so razvijali HPLC metode za določevanje aminokislin, so testirali veliko različnih derivatizacijskih reagentov, ki se merijo bodisi spektrofotometrično ali fluorometrično. Reagenti za ta namen so: OPA (o-phtalaldehid), DANS-Cl (dansil klorid), FMOC (9-9-fluorenil-metilkloroformat), PITC (phenylizotiocianat). Vsak od teh reagentov ima svoje prednosti in slabosti.

- DANS-Cl reagira tako s primarnimi kot tudi sekundarnimi aminokislinami, vendar je potrebna visoka temperatura kolone in dolg čas določanja. Derivati so zelo nestabilni, zato tudi dobimo slabo ločbo aminokislin.
- Prav tako PITC reagira s primarnimi kot tudi sekundarnimi aminokislinami, vendar je analiza zelo zamudna in zahtevna, kar povzroča slabo ponovljivost.
- OPA in FMOC dajeta fluorescentne derivate in sta preizkušena za potrebo velike občutljivosti metode. FMOC reagira s primarnimi in sekundarnimi aminokislinami, ki tvorijo stabilne spojine, vendar oblikovanje fluorenilmetilkloroformata, ki je alkoholni derivat, lahko pokvari kromatogram. Pred-kolonska derivatizacijska reakcija aminokislino z OPA, v prisotnosti MCE (2-merkaptetanola) pri sobni temperaturi daje α -fenilglicin derivate. Vendar sekundarne amino skupine, kot so prolin in hidroksiprolin v tej reakciji ne reagirajo.

V idealnih razmerah bi analitska metoda za določevanje aminokislinske sestave morala izpolnjevati naslednje zahteve: kratek čas analize, visoko občutljivost, linearni odziv in nenazadnje stabilne in hitro oblikovane derivate, brez motečih dejavnikov (González-Paramas in sod., 2006).

Hermosin in sod., so leta 2003 želeli določiti aminokislinsko sestavo španskega medu, kot tudi vpliv aminokislinske sestave na botanično poreklo medu. Ugotovili so, da metoda HPLC z derivatizacijskim reagentom DEMM (dietiletoksimetilenmalonat) omogoča separacijo in kvantifikacijo 22 aminokislin kot tudi amonijevega iona v analiziranih

medovih. Glavne aminokisljine, ki so jih določili, so bile prolin, fenilalanin, tirozin in lizin. Manjše vsebnosti aminokislin, vendar pomembne so bile arginin, glutaminska kislina, histidin in valin. Aminokisljine, ki v svoji sestavi vsebujejo žveplo, kot sta metionin in cistein so določili v zelo majhni vrednosti ali pa sploh nista bili prisotni v vzorcih medu. Posamezno botanično poreklo so dobro ocenili le v majhnem območju, ko so ga primerjali s sklopom vzorcev drugega botaničnega porekla. Ugotovili so, da na podlagi aminokisljinske sestave ne morejo določiti botaničnega porekla.

Hitra in učinkovita metoda za določanje prostih aminokislin je tudi GC-FID in GC-MS (plinska kromatografija s plamenskim ionizacijskim detektorjem in masnim spektrometrom). Uspeli so kvantitativno določiti 22 aminokislin, ter tudi validirati metodo. S tem so dokazali, da je uporabna za vzorce medu. Z uporabo linearne diskriminantne analize so 88 % vzorcem medu določili botanično poreklo (Nozal in sod., 2004).

Rebane in Herodes (2010) je za analizo aminokislin v medu uporabil metodo HPLC z derivatizacijski reagentom DEMM (dietiletoksimetilenmalonat). Uspel je ločiti 23 aminokislin. Čeprav UV detektor zagotavlja zadostno občutljivost za analizo medu, so bili vsi koraki metode narejeni tako, da so bili kompatibilni z MS (masnim spektrometrom), s katerim so še enkrat potrdili rezultate aminokisljinske sestave.

Bernal in sod. so leta 2005 primerjali tri derivatizacijske reagente za določitev aminokisljinske sestave z metodo HPLC: metodo z derivatizacijskim reagentom DEMM z uporabo UV detektorja in dve drugi metodi z reagentoma FMOC-Cl in AQC z uporabo fluorescentnega detektorja. Ugotovili so, da z uporabo metilkloroformatnih reagentov dobimo podatke v kratkem času z visoko občutljivostjo. DEMM reagent oblikuje derivate, ki jih lahko detektiramo na ultravijoličnem detektorju. Izbrali so začetne pogoje, ki jih v svojem delu priporočajo Herminosin in sod. (2003). Uporabili so enak reagent za analizo medu in ugotovili velike razlike med vzorci različnih botaničnih izvorov z visoko puferno kapaciteto. Zato so Bernal in sod. (2005) vzorcem dodali NaOH pred boratnim pufrim, na ta način dosegli alkalni medij in s tem tudi boljše ločbo aminokislin. Spreminjali so tudi: gradient, pH mobilne faze in kolono.

Preglednica 3 prikazuje povprečne vrednosti aminokislin v medu (v mg/kg), ki so jih dobili s tremi različnimi reagenti in standardna deviacija (SD) med meritvami glede na uporabljen reagent (Bernal in sod., 2005).

Preglednica 3: Povprečne vsebnosti (\bar{x}) v (mg/kg) in standardna deviacija (SD) v (mg/kg) s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in posameznih aminokislin s HPLC metodo, v vzorcih medu (Bernal in sod., 2005)

Vrsta medu parameter aminokislina	Sivkin $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Timijanov $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Gozdni $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Rožmarinov $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Cvetlični $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)
Asp	10 ± 3	12 ± 5	53 ± 11	6 ± 2	23 ± 7
Glu	13 ± 2	15 ± 3	53 ± 12	10 ± 4	31 ± 5
Asn	8 ± 2	9 ± 3	78 ± 16	4 ± 2	20 ± 7
Ser	13 ± 2	10 ± 4	25 ± 6	7 ± 2	21 ± 8
Gln	21 ± 11	30 ± 14	57 ± 22	10 ± 5	91 ± 35
His	18 ± 10	16 ± 7	14 ± 12	15 ± 6	14 ± 7
Gly	6 ± 3	7 ± 6	8 ± 4	5 ± 3	8 ± 4
Thr	10 ± 3	9 ± 7	13 ± 6	6 ± 4	11 ± 9
Ala	17 ± 3	12 ± 4	34 ± 7	7 ± 2	25 ± 5
Pro	527 ± 163	423 ± 131	699 ± 168	265 ± 66	484 ± 160
Tyr	119 ± 29	89 ± 21	127 ± 32	26 ± 7	150 ± 26
Val	12 ± 4	8 ± 1	15 ± 3	5 ± 2	12 ± 3
Leu	14 ± 4	9 ± 2	14 ± 4	7 ± 2	10 ± 3
Ile	4 ± 1	3 ± 2	5 ± 2	3	7 ± 2
Phe	590 ± 153	441 ± 93	306 ± 101	33 ± 7	341 ± 99
Lys	24 ± 6	21 ± 5	14 ± 6	23 ± 8	13 ± 4
∑AK	1406	1114	1515	432	1262
Prolin SPF	759 ± 243	741 ± 245	857 ± 249	310 ± 59	807 ± 234

Ugotovili so tudi, da pri uporabi spektrofotometrične metode, ki temelji na reakciji z ninhidrinom, ne reagira samo aminokislina prolin, ampak po vsej verjetnosti še fenilalanin, ki je v medu tudi visoko zastopana aminokislina. Rezultati, ki so jih dobili z uradno spektrofotometrično metodo so vsota absorbanc vseh snovi, ki reagirajo z ninhidrinom, kar je razvidno tudi iz preglednice 3. Zato je za točno določitev vsebnosti prolina primernejša metoda HPLC (Iglesias in sod., 2004; Nozal in sod., 2004; Bernal in sod., 2005; Perez in sod., 2007; Rebane in Herodes, 2010)

2.3.2.1 Metode za določanje potvorjenosti medu

Zaradi visokih cen in omejene ponudbe medu, so nekateri čebelarji in proizvajalci hrane v skušnjavi začeli prodajati nepristni med, ki vsebuje poceni sladila, kot so koruzni sirup, invertni sirup in visoko fruktozni koruzni sirup. Pri ponarejenem medu skoraj ne opazimo sprememb nekaterih fizikalnokemijskih parametrov v primerjavi s pristnim naravnim medom.

Pravilnik o medu (2004) določa pogoje za minimalno kakovost, ki jih mora v prometu izpolnjevati med kot predpakirano živilo. Tako je med po Pravilniku naravna sladka snov, ki jo izdelajo čebele *Apis mellifera*, iz nektarja cvetov ali izločkov iz živih delov rastlin ali izločkov na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, ga shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju. Med delimo glede na izvor na nektarni ali cvetlični med, ki je pridobljen iz nektarja cvetov in med iz mane ali gozdni med, ki je pridobljen predvsem iz izločkov insektov (Hemiptera) na živih delih rastlin ali izločkov živih delov rastlin. Pravilnik tudi navaja, da med, ki se daje v promet in je namenjen za uporabo v kateremkoli živilu in je namenjen za prehrano ljudi, ne sme vsebovati nobenih dodanih sestavin, vključno z aditivi za živila, niti nobenih drugih dodatkov. Med mora biti, kolikor je mogoče, brez organskih ali anorganskih tujih primesi, ne sme imeti tujega okusa ali vonja, ne sme začeti fermentirati, njegova stopnja kislosti ne sme biti umetno spremenjena in ne sme biti pregret tako, da so naravni encimi, bodisi uničeni, bodisi je znatno zmanjšana njihova aktivnost (Pravilnik o medu, 2004).

Na svetovnem in na našem tržišču se pojavlja vedno več potvorjenega medu. Ta je največkrat potvorjen tako, da so mu dodani razni sladkorni sirup. Slednji pa so naravnega izvora, izdelani največkrat iz trsnega ali pesinega sirupa in zato jih je težko odkriti. Povpraševanje po naravnih medovih se je povečevalo, zato je zagotovitev metode o pristnosti medu zelo pomembna.

H kakovosti medu prispeva več dejavnikov, kot so visok ozmotski tlak, nižja aktivnost vode, nizek pH in manjša vsebnost beljakovin (Anklam, 1998; Bogdanov, 1999). Za ugotavljanje pristnosti medu in potrjevanje njegovega botaničnega porekla se uporabljajo različne tehnike. V literaturi zasledimo naslednje metode za dokazovanje potvorb medu:

- merjenje izotopskega razmerja $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v medu (White in sod., 1978),
- določanje kislosti medu. Glede na kislost medu lahko s precejšno zanesljivostjo sklepamo tudi o pristnosti medu. Če je bil le-ta ponarejen z dodatkom ne invertiranega sladkorja, bo manj kisel. Če je bil dodan industrijsko invertiran sladkor, bo ta znatno bolj kisel (Javornik in sod., 1982),
- določanje vsebnosti HMF, s katero si lahko pomagamo pri ugotavljanju potvorbe z invertnim sirupom (Anklam, 1998). Hidroksimetilfurfural (HMF) je pokazatelj pregrevanja, staranja in potvorbe medu. Vrednost HMF naraste nad 150 mg/kg, če je živilu dodan trsni sladkor (Kmecl, 2006),
- analiza vsebnosti prolina, ki je dokaj enostavna, saj skupaj z ninhidrinom tvori spojino rumene barve, katere koncentracijo, intenzivnost obarvanja, merimo spektrofotometrično (Bogdanov in sod., 1997). V medu mora biti vsaj 180 mg/kg prolina, drugače je to znak potvorjenosti (Bogdanov, 1999). Davis je leta 1975 analiziral vzorce medu in sladke produkte, ki ne vsebujejo medu. Ugotovil je, da

lahko hitro prepoznamo produkte, ki ne vsebujejo medu po njihovi nižji vrednosti prolina,

- analiza razmerja izotopov $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v proteinih medu, s katero lahko dokažemo potvorbo s sladkorji, ne moremo dokazati pri medu, ki je bil potvorjen z visoko fruktoznim sirupom in s hidroliziranim sirupom (Anklam, 1998; Doner, 2003),
- analiza razmerja izotopov $^2\text{H}/^1\text{H}$ in razmerja $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (Doner, 2003),
- HPLC določitev aromatskih spojin in flavonoidov, aminokislin in sladkorjev,
- GC-MS (s plinsko kromatografijo-masno spektrometrijo), odkrivanje aromatičnih spojin z IC (z ionsko kromatografijo) določanje anionov in kationov in vsebnost mineralnih snovi (Anklam, 1998),
- določanje dušika v medu s Kjeldahlovo metodo, če je njegova vrednost nižja kot 10 mg/100 g smatramo, da je med potvorjen s sladkorji, določanje vsebnosti aminokislin z metodo HPLC v povezavi s statistično analizo (Mohammed in Babiker, 2010; Iglesias in sod., 2004; Cotte in sod., 2004; Nozal in sod., 2004; Bernal in sod., 2005; Perez in sod., 2007; Rebane in Herodes, 2010),
- HPAEC-PAD (anionska izmenjalna kromatografija z uporabo pulznega amperometričnega detektorja) s katero so določili vsebnosti 14 ogljikovih hidratov in izračunali razmerje med fruktozo/glukozo, maltozo/izomaltozo, saharozo/turanozo in maltozo/turanozo, ter primerjali z razmerji, ki so bila objavljena v literaturi za pristen med (Corbella in Cozzolino, 2008; Nozal in sod., 2005),
- HPAEC-PAD analiza sestave oligosaharidov po predhodnji odstranitvi mono in disaharidov (Morales in sod., 2008),
- HPAEC-PAD analiza polisaharidnih profilov (Megherbi in sod., 2009).

Učinkovito in enostavno metodo za odkrivanje potvorjenosti medu, ki temelji na analizi polisaharidnih profilov so leta 2009 predlagali Megherbi in sodelavci. Trem različnim vrstam naravnega medu istega proizvajalca so dodali 1 % koruznega sirupa. Vzorcem medu so nato odstranili monosaharide in krajše oligosaharide in se osredotočili na sledi polisaharidov. Polisaharide so ločili z uporabo anionske izmenjalne kromatografije in pulznega amperometričnega detektorja. Analizna metoda, ki omogoča odkrivanje dodanega koruznega sirupa na ravni 1 % v vseh treh vrstah cvetličnega medu, se je pokazala za učinkovito metodo. Dokazali so, da je analiza polisaharidov lahko preprosto in učinkovito orodje za nadzor kakovosti medu in določevanje primesi sladkornih sirupov.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZOREC

Analizirali smo vzorce slovenskega medu. Raziskava je bila opravljena na skupno 113 vzorcih medu, petih različnih vrst: akacijevega (16), lipovega (16), kostanjevega (18), cvetličnega (18) in gozdnega (20) medu ter 25 vzorcih namerno potvorjenega medu, ki smo jim dodali različne deleže sladkornih sirupov. Uporabili smo glukozni, glukozno-fruktozni in invertni sirup. Vzorci medu so bili letnikov 2007, 2008 in 2010 in so izvirali iz različnih naravnogeografskih regij Slovenije. Pridobljeni so bili neposredno od čebelarjev in nato hranjeni v stekleni embalaži, pri sobni temperaturi, zaščiteni pred svetlobo.

3.2 FIZIKALNO KEMIJSKE METODE

V treh vzporednih določitvah so bile na vzorcih medu opravljene naslednje analize:

- določitev aminokislina prolin s spektrofotometrično metodo modificirano po Bogdanovu in sod. (1997),
- določitev skupnih beljakovin z metodo po Kjeldahlu,
- kvantitativna določitev aminokislin z metodo HPLC.

3.2.1 Določanje vsebnosti aminokislina prolin

Vsebnost prolina smo določali s spektrofotometrično metodo, modificirano po Bogdanovu in sod. (1997).

Princip:

Metoda je osnovana na tvorbi barvnega kompleksa med preiskovano aminokislino (prolin) in reagentom ninhidrinom, ki tvorita rumen barvni kompleks. Po dodatku 2-propanola smo merili absorbanco v raztopini vzorca in referenčni (standardni) raztopini pri valovni dolžini 510 nm. Delež prolina v vzorcu medu smo določili računsko ob upoštevanju razmerij.

Reagenti:

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

Aparatura:

- spektrofotometer: UV/VIS Spectrometer: LAMBDA 35, PERKIN ELMER instruments (valovna dolžina 510 nm).

Izvedba:

Priprava raztopine vzorca medu: V čašo smo odtehtali 2,5 g ($\pm 0,1$ mg) vzorca medu, dodali ca 10 mL destilirane vode ter vzorec kvantitativno prenesli v 50 mL bučko. Bučko smo dopolnili do oznake z destilirano vodo in vsebino dobro premešali. V dve epruveti smo odpipetirali 0,5 mL raztopine vzorca medu, v drugi dve epruveti 0,5 mL destilirane vode (slepi vzorec) in v tri epruvete 0,5 mL standardne raztopine prolina. V vsako epruveto smo dodali še 1 mL mravljinčne kisline, 1 mL raztopine ninhidrina, dobro zaprli in 15 minut mešali na stresalniku. Sledilo je 15 minutno termostatiranje v vreli vodni kopeli in nato 10 minut pri temperaturi 70 °C. Po dodatku 5 mL raztopine izopropanola smo epruvete pustili na sobni temperaturi in po 45 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 510 nm.

Izračun:

Vsebnost prolina smo izrazili v miligramih prolina na kilogram medu (enačba 1).

$$\text{vsebnost prolina (mg/kg)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot \frac{E_1}{E_2} \cdot R \quad \dots (1)$$

Legenda oznak:

A_{vz}	izmerjena absorbanca raztopine vzorca,
A_{st}	izmerjena absorbanca standardne raztopine prolina,
E_1	miligrami prolina za pripravo standardne raztopine prolina (40 mg v 50 mL),
E_2	grami medu za pripravo raztopine vzorca (2,5 g v 50 mL),
R	faktor razredčenja
R_{vzorca}	100 (2,5 g medu v 50 mL H ₂ O → od tega v analizo 0,5 mL raztopine vzorca),
R_{stand}	$R_1 \cdot R_2 = 2500$,
R_1	50 (40 mg standarda v 50 mL H ₂ O → odvzamemo 1 mL),
R_2	50 (odvzeti 1 mL v 50 mL H ₂ O → v analizo 0,5 mL standardne raztopine),
R'	1000 (1 kg = 1000 g).

$$R = \frac{R_{vz}}{R_{st}} \cdot R' = \frac{100}{2500} \cdot 100 = 40 \quad \dots (2)$$

Končna enačba (3) z upoštevanjem razredčitev:

$$\text{prolin (mg/kg)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot \frac{40}{2,5} \cdot 40 = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot 640 \quad \dots (3)$$

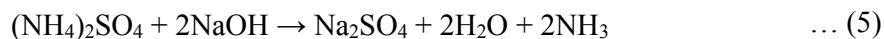
3.2.2 Določanje vsebnosti skupnih beljakovin

Skupne beljakovine smo določali s Kjeldahlovo metodo (Büchi Labortechnik AG, 2004).

Princip:

Metoda temelji na posrednem določanju beljakovin preko dušika, ob upoštevanju, da je ves, v živilu prisoten dušik, beljakovinski. Za preračunavanje dušika v beljakovine uporabljamo ustrezne empirične faktorje. Proteine v vzorcu pred analizo razklopimo z mokrim sežigom ob pomoči kisline, katalizatorja in visoke temperature. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo amoniak (NH_3), ki ga lovimo v prebitek borove kisline in nato nastali amonijev borat titriramo s standardno raztopino klorovodikove kisline.

Pri tem potekajo naslednje kemijske reakcije:



Če enačbi (6) in (7) združimo, dobimo:



Iz enačbe (8) sledi:

- 1 mol HCl = 1 mol N = 14 g N
- 1 mL 0,1 M HCl = 0,0014 g N

Reagenti:

- koncentrirana H_2SO_4 ,
- katalizator Kjeltabs Cu / 3,5 (305 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$),
- nasičena raztopina (ca 3 %) H_3BO_3 ,
- 30 % raztopina NaOH,
- 0,1 M HCl.

Aparatura in pribor:

- blok za razklop oz. mokri sežig vzorca (Digestion Unit K-426, Büchi, Švica),
- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber, Büchi, Švica),
- destilacijska enota (Distillation Unit B-324, Büchi, Švica),
- titracijska enota (Titrino 702 SM, Metrohm, Švica),
- sežigne epruvete.

Izvedba analize:

1) Priprava in razklop (mokri sežig) vzorca

V brezdušično tehtalno ladjico smo odtehtali 3 g ($\pm 0,1$ mg) vzorca medu in ga prenesli v sežigno epruveto. Sežigne epruvete smo postavili v stojalo in v vsako dodali 1,5 tablete bakrovega katalizatorja in 20 mL koncentrirane H_2SO_4 . Epruvete smo pokrili s steklenimi zvonci in postavili v hladno enoto za razklop (Digestion Unit). Temperaturo bloka za razklop vzorca smo postopno dvigovali do $370\text{ }^\circ\text{C}$ in na ta način kontrolirali penjenje vzorca med mokrim sežigom. Sežig je bil končan v približno 1 uri pri končni temperaturi oziroma takrat, ko se vsebina v epruveti preneha peniti in postane bistro zelena.

2) Destilacija

Vzorci smo v epruveti ohladili na sobno temperaturo. Epruveto smo nato vstavili v destilacijsko enoto, kjer poteče doziranje 50 mL destilirane vode in 70 mL baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko predložko se doda 60 mL borove kisline (H_3BO_3). Nato se začne dovajati para v vzorce. Destilacija traja 4 minute.

3) Titracija

Raztopino nastalega amonijevega borata, v predložki, smo titrirali z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija je potekala avtomatsko po vnosu podatka o količini vzorca (v mg) v titracijsko enoto. V končni točki titracije se je beležila poraba kisline, iz katere se izračuna vsebnost dušika ter beljakovin v vzorcu. V primeru medu se uporabi splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine, ki je enak 6,25.

Vsebnost beljakovin izračunamo iz enačb (9) in (10):

$$\text{vsebnost dušika (g/100 g)} = \frac{V_{0,1M\text{HCl}}(\text{ml}) \cdot 1,4}{m_{\text{odtehta}}(\text{mg})} \cdot 100 \quad \dots (9)$$

$$\text{vsebnost beljakovin} = \text{vsebnost dušika (g/100 g)} \cdot F \quad \dots (10)$$

Pri tem velja:

$V_{\text{HCl}}(\text{ml})$ = poraba 0,1 M HCl (mL)

1,4 = ekvivalent (1 mL 0,1 M HCl = 1,4 mg N)

6,25 = F = splošni empirični faktor za preračun N v beljakovine

3.2.3 Določanje vsebnosti aminokislin z metodo HPLC

Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznavamo z ustreznim detektorjem s ciljem kvalitativne ali kvantitativne določitve. V praksi želimo doseči čim boljše ločitev v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Optimalnost metode je velikokrat odvisna in pogojena tudi z zmogljivostjo opreme. Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze, zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi. Ločitev poteka

tako, da vzorec vbrizgamo (injeciramo) na začetku kromatografske kolone in topilo, ki stalno potuje skozi kolono, topi komponente vzorca. Komponente se porazdelijo med topilom (mobilno fazo) in nosilcem (stacionarno fazo). Stacionarna faza je lahko trdna, porozna ali površinsko aktivna substanca ali nemobilna tekočina. Mobilna faza je tekočina. Porazdelitev komponent se ponavlja vzdolž kolone in končno se komponente ločeno eluirajo iz kolone. Tam jih zaznamo z detektorji. Signali so podani kot kromatografski vrhovi in celotna krivulja kot kromatogram. Ploščina pod kromatografskim vrhom je proporcionalna koncentraciji in podaja kvantitativno informacijo (Mayer, 1988; Žorž, 1991).

Visokotlačna kromatografija ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kolonska kromatografija, pri kateri za stacionarno fazo uporabljamo zelo majhne delce, od 0,5 μm do 10 μm . Če želimo, da bo pretok skozi kolono od 0,5 mL/min do 5 mL/min, moramo mobilno fazo potiskati skozi kolono z visokotlačno črpalko. Sestavo mobilne faze lahko med separacijo spreminjamo, kar imenujemo gradientno izpiranje. Pri izokratskem izpiranju ostane polarnost mobilne faze nespremenjena. Z razvojem visokotlačnih črpalk, ki omogočajo konstantne pretoke brez pulziranja in z razvojem tehnologije izdelave kolon ter različnih detektorjev, je postala HPLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih in anorganskih spojin. Značilnost visokotlačne kromatografije je hitra in občutljiva metoda, z dobro ločljivostjo ob hkratni majhni množini vzorca ter večkratni uporabi iste kolone (Mayer, 1988; Žorž, 1991).

Za določanje aminokislinske sestave v medu smo izbrali metodo HPLC z derivatizacijskim reagentom DEMM, ker smo po pregledu literature ugotovili, da je najprimernejši reagent, saj omogoča ločbo z najmanj motečimi faktorji. Metodo smo prevzeli po raziskavi Bernala in sodelavcev, ki je bila objavljena leta 2005.

Najprej smo preverjali najprimernejšo reverzno fazno kolono RP - C18 in dolžino kolone. V drugi fazi smo določili koncentracijsko območje standarda. Nato smo iskali optimalne kromatografske pogoje, kot so: temperatura, vrednost pH mobilne faze, gradient in volumen injiciranja. Kromatografsko ločbo vseh aminokislin smo dosegli z obsežnim preizkušanjem pri pripravi vzorca, kjer smo iskali najprimernejšo vrednost pH vzorca in čas, ki je potreben za potek reakcije med derivatizacijskim reagentom in aminokislinami. Na koncu smo preizkusili vse pogoje določanja na različnih HPLC sistemih in določili osnovne parametre validacije. S tem smo tudi potrdili primernost, občutljivost in natančnost metode za določanje aminokislin v medu.

Princip:

Določanje vsebnosti aminokislin v medu izvedemo z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, HPLC, na reverzno fazni koloni (RP-C18), z detekcijo v UV območju, pri $\lambda = 280 \text{ nm}$. Aminokislinsko ločbo smo dosegli s predkolonsko derivatizacijo z reagentom DEMM (dietiletoksimetilenmalonat). Metodo smo povzeli po Bernal in sod. (2005), jo modificirali in nato potrdili z osnovnimi parametri validacije.

Merilni instrumenti:

- Konfiguracija HPLC sistema (model: Agilent Series 1100, proizvajalec: Agilent Technologies): Binarna črpalka G1312A, ser. št. DE23913419, termostatiran avtomatski vzorčevalnik G13129A, ser. št. DE33211054, termostat za HPLC kolono G1365B, ser. št. De32133985, MWD detektor G1365B, ser. št. De305022, degazer G1379A, ser. št. JP13209483, ALST herm G1330B, ser. št. DE13205244, programska oprema: LC ChemStation in strojna računalniška oprema,
- pH meter: Mettler Toledo; elektroda: Lab Science,
- tehtnica: Mettler Toledo AX205.

Topila in reagenti:

- voda - prečiščena na sistemu milipore elix 10, ser. št.: fohnb2710c,
- reagent DEMM,
- boraks (natrijev tetraborat) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ Merck, kat. št: 1.06392.0500, ser. št: A931692811,
- amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$): Merck, kat. št: 1.01116.1000, ser. št: A964516824,
- acetonitril (CH_3CN) Sigma-Aldrich; kat. št: 34851; lot: SZBA175S,
- natrijev hidroksid (NaOH) Merck; kat. št.: 1.06498.1000; ser. št.: B0316298 922,
- koncentrirana klorovodikova raztopina (HCl) Merck; kat. št.: 1.00317.1000; ser. št.: K40641417 002,
- borna kislina H_3BO_3 Merck, kat. št.: 1.00765.0050.

Priprava topil:

- Boratni pufer pH = 9,2: pripravimo nasičeno raztopino $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 g/200 mL H_2O), segrejemo, da se popolnoma raztopi, ohladimo in postavimo v hladilnik za 24 ur. Po 24 urah prefiltriramo skozi naguban filtrirni papir in umerimo pH na 9,2 z 0,2 M borno kislino,
- 0,025 M amonijev acetat: 1,927 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ /1L H_2O ,
- 0,1 M HCl: 8,5 mL konc.HCl/1L H_2O ,
- 5 M NaOH: 50g/250 ml H_2O .

Referenčni standardi:

Preglednica 4: Referenčni standardi za določanje aminokislinske sestave in njihove karakteristike

Referenčni stand.	Serijska št.	Delež komponente (%)	Proizvajalec
alanin	1390600	100,00	Fluka
allo-izolevcin	1429724	100,00	Sigma
arginin	103897	98,70	USP
asparagin	2111580301	100,08	USP
asparaginska kislina	1021670209	100,00	USP
cistein	K39281238	98,30	USP
glicin	31443	100,00	USP
glutaminska kislina	079K01021	99,00	Sigma
glutamin	1410840	99,50	Sigma
histidin	72010	99,58	USP
izolevcin	1401839	99,50	Sigma
levcin	70838	100,00	USP
lizin	104615	99,70	USP
metionin	1101661104	100,00	USP
fenilalanin	70595	100,00	USP
prolin	72984	99,78	USP
serin	S4500-1G	99,00	Sigma
treonin	2114780146	100,00	USP
triptofan	1400132	99,50	Sigma
tirozin	362060110	100,00	USP
valin	371080010	100,00	USP

Kromatografski pogoji:

- kolona: ZORBAX ECLIPSE XDB-C18, 4,6 x150 mm, 5µm, Agilent part no: 993967-902,
- mobilna faza:
mobilna faza A: 0,025 M raztopina amonijevega acetata
mobilna faza B: CH₃CN,
- gradient: predstavljen v preglednici 5.

Preglednica 5: Gradient mobilne faze

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

- detekcija: UV, λ= 280 nm
- pretok 1 mL/min
- temperatura: 45 °C
- volumen injiciranja: 10 µL
- temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 4 °C

Priprava raztopine standarda:

a) Priprava raztopine standarda St1 in St2

V 20 mL bučko natančno natehtamo približno:

- 15,00 mg standarda (Asp, Glu, Asn, His, Gly, Thr, Arg, Ser, Tyr, Val, Met, Cys, Trp, Allo-Ile, Ile, Leu, Lys)
- 40,00 mg standarda (Gln in Ala)

V 10 mL bučko natančno natehtamo približno:

- 40,00 mg (Pro)
- 30,00 mg (Phe)

Natehtane standarde raztopimo v 0,1M HCl in dopolnimo z 0,1 M HCl do oznake. Obdelujemo na ultrazvočni kopeli 10 minut, da se popolnoma raztopijo. Za vsak standard posebej pripravimo dve paralelki St1 in St2.

b) Priprava raztopine standarda S1 in S2:

V 50 mL bučko odpipetiramo po:

- 2,00 mL standardnih raztopin St1_{Asp}, St1_{Glu}, St1_{Asn}, St1_{His}, St1_{Gly}, St1_{Thr}, St1_{Arg}, St1_{Thr}, St1_{Ser}, St1_{Val}, St1_{Met}, St1_{Cys}, St1_{Trp}, St1_{Allo-Ile}, St1_{Ile}, St1_{Leu}, St1_{Lys}, St1_{Gln} in St1_{Ala},
- 4,00 mL standardne raztopine St1_{Pro} in St1_{Tyr},
- 5,00 mL standardne raztopine St1_{Phe}.

Odpipetirane standardne raztopine, dopolnimo do oznake 50,00 mL z boratnim pufrom pH=9,2. Enak postopek ponovimo tudi za pripravo raztopine standarda S2.

c) Priprava raztopine delovnega standarda RS1 in RS2:

Nato v 10 ml bučko odpipetiramo 4,00 mL S1, dodamo 0,5 mL 5M raztopine NaOH, dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH = 9,2. Enako pripravimo tudi standardno raztopino RS2

d) Priprava standardnih raztopin za določanje linearne regresije:

Pripravljeni standardni raztopini S1 redčimo (5mL/10, 4mL/10, 3mL/10 in 0,5mL/10) dodamo 0,5 mL 5M raztopine NaOH, ter dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH=9,2. Tako pripravimo 125 %, 100 %, 75 %, 25 %, 12,5 % raztopine, glede na delovni standard. Nato sledi direktivizacija po postopku opisanem v točki 9.

Priprava raztopine vzorca:

V 10 ml bučko natančno natehtamo približno 3 g ($\pm 0,0001$ g) homogeniziranega vzorca medu, dodamo 0,5 mL 5M NaOH, dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH=9,2.

Stresamo na vortexu 1 minuto. Raztopino vzorca prefiltriramo skozi 0,45 μ m membranski filter. Raztopino vzorca pripravimo v dveh paralelkah.

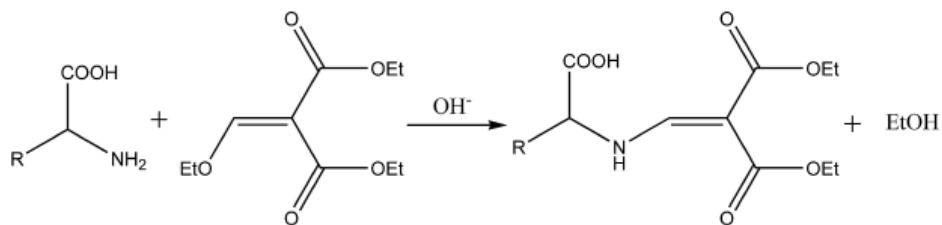
Priprava raztopine slepega vzorca:

V 10 mL bučko damo 0,5 mL 5M NaOH, dopolnimo do oznake z boratnim pufrom pH=9,2. Raztopino slepega vzorca prefiltriramo skozi 0,45 μ m membranski filter.

Derivatizacija raztopine vzorca, standarda in slepega vzorca:

V 10 ml centrifugirko z obrusom odpipetiramo 1,00 mL raztopine vzorca (oziroma raztopino slepega vzorca, delovni standardni raztopini RS1, RS2, dodamo 10 µL derivatizacijskega reagenta DEMM, ter 3,99 mL boratnega pufru pH=9,2. Centrifugirko pokrijemo s pokrovčkom in stresamo na vortexu 20 sekund. Pokrovček centrifugirke pokrijemo s petrifilmom in segrevamo na vodni kopeli 90 °C 50 minut. Ko se derivatizirana raztopina ohladi, jo filtriramo skozi 0,45 µm membranski filter in napolnimo v viale.

Potek reakcije med aminokislino in derivatizacijskim reagentom je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Reakcija aminokislino z derivacijskim reagentom DEMM (Alaiz in sod., 1992)

Vsebnost aminokislin v medu izračunamo iz enačbe (11):

$$\text{vsebnost aminokislin (mg/kg)} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot \frac{m_{st}}{m_{vz}} \cdot \frac{V_{vz}}{V_{st}} \cdot \frac{f_{st}}{1000} \quad \dots (11)$$

Pri tem velja:

A_{vz} = površina določene aminokislino v vzorcu,

A_{st} = površina določenega standarda,

m_{st} = natehta standarda (mg),

m_{vz} = natehta vzorca (g),

V_{vz} = redčitev vzorca (ml),

V_{st} = redčitev standarda (ml),

f_{st} = faktor standarda,

1000 = pretvorba iz mg/g v mg/kg.

Ustreznost kromatografskega sistema (SST-test):

Ustreznost sistema preverimo pred pričetkom dela tako, da raztopino delovnega standarda injiciramo 5-krat. Parametri ustreznosti in njihovi kriteriji:

- preciznost sistema (ponovljivost injiciranja) RS1: $RSD(n=5) \leq 2,0\%$,
- število teoretskih podov kolone za RS1: $N \geq 2000$,
- faktor popačenja kolone: $0,7\% \leq T \leq 2,0\%$,
- ločljivost: $R \geq 0,5$,
- pokrivanje standardov RS1/RS2 $\leq 2,0\%$.

Pri čemer je:

- RSD - relativni standardni odklon $RSD(\%) = s/X \cdot 100$ (enačba 12 in 13),
- N - razmerje med višino in površino Gaussove krivulje,

- T - simetričnost kromatografskih vrhov podajamo kot faktor popačenja (T),
- R - ločljivost sosedno ležečih vrhov je merilo za kvaliteto separacije.

3.2.4 Pregled parametrov validacije v danih pogojih

Validacija metode je zadnji korak v postopku razvoja analizne metode. Validacija analitske metode je postopek, s katerim ovrednotimo karakteristike analitske metode in potrdimo, ali je metoda primerna za določeno analitsko uporabo ali ne. Je eden najvažnejših delov analitskega postopka in obravnava kriterije, kot so pravilnost, ponovljivost, interval zaupanja, meja določanja, meja zaznave itd. (Snyder in sod., 1997).

Notranja (interna) metoda validacije sestoji iz korakov validacije opravljenih v enem laboratoriju. Takšen primer imamo, kadar validiramo novo metodo, ki smo jo razvili sami ali pa preverjamo, če je metoda drugih avtorjev zadovoljiva (EMEA, 1995).

Delna validacija je validacija z zmanjšanim obsegom (manj validacijskih parametrov in/ali manjše število preskusov znotraj posameznega validacijskega parametra). V prvi fazi pregledamo aparature in drugo opremo, ki jih zahteva metoda. Preverimo, če je bila oprema primerno vzdrževana in redno kvalificirana (EMEA, 1995).

Parametri validacije in kriteriji sprejemljivosti so v skladu z ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) in smernicami EMEA (1995). Priporočljivo je preverjanje naslednjih parametrov validacije v danih pogojih:

Ponovljivost (angl. Repeatability)

Ponovljivost analiznega postopka je obseg ujemanja 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. Natančnost je v ICH smernicah zapisana kot ponovljivost v čim krajšem času in ob čim bolj nespremenjenih pogojih merjenja. Ponovljivost lahko podamo kot standardni odmik (s) ali kot relativni standardni odmik (RSD).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - X_i)^2}{N - 1}} \quad \dots (12)$$

ali

$$\text{RSD} = \frac{s}{X} \cdot 100 \quad \dots (13)$$

Pri čemer je:

s = standardni odmik,

X = aritmetična sredina (povprečje),

X_i = i-ti rezultat,

N = število meritev,

RSD = relativni standardni odmik.

Meddnevna ponovljivost (angl. Intra-day repeatability)

Meddnevna ponovljivost je ponovljivost analiznega postopka znotraj laboratorija. Med seboj smo primerjali ponovljivost rezultatov, ki smo jih dobili na dveh različnih HPLC sistemih. Za primerjavo smo vzeli isti vzorec kot pri preverjanju dnevne ponovljivosti. Kriteriji sprejemljivosti: natančnost (ponovljivost RSD ≤ 10 %, meddnevna natančnost RSD ≤ 15 %).

Pravilnost ali točnost (angl. accuracy) analitske metode je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne (točne) rezultate. Točnost je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Eden od načinov je primerjanje rezultatov z referenčnim standardom, za katerega vemo, da nima sistemskih napak. Čim manjša je razlika med povprečjem meritev in pravo (referenčno) vrednostjo, tem bolj je metoda točna (referenčnega vzorca v našem primeru nimamo). Drugi način je metoda standardnih dodatkov - dodajanje znane koncentracije standarda v treh koncentracijskih nivojih (npr. tri ponovitve pri treh različnih koncentracijah) v raztopino vzorca. Točnost izrazimo kot % izkoristka analita. Kriteriji sprejemljivosti točnosti: izkoristek % = 100 ± 20 %

Izrazimo jo kot :

$$\text{izkoristek \%} = \frac{\text{dobljeno} \cdot 100}{\text{dodano}} \quad \dots (14)$$

Ali kot,

$$\% \text{ odstopanja} = \frac{(\text{dobljeno} - \text{dodano})}{\text{dodano}} \cdot 100 \quad \dots (15)$$

Linearnost (angl. Linearity)

Linearnost je zmožnost analiznega postopka (znotraj definiranega območja), da daje rezultate, ki so neposredno sorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Linearnost moramo oceniti prek celotnega območja analiznega postopka. Določimo jo z analizo serije raztopin standardov v najmanj petih različnih koncentracijah. Linearnost najprej ocenimo z vizualnim pregledom krivulje (odziv signala kot funkcijo koncentracije analita). Če je zveza linearna, moramo rezultate ovrednotiti z linearno regresijo najmanjših kvadratov. Kot rezultate predložimo enačbo linearne regresije, koeficient korelacije (R^2), odsek na y-osi in naklon regresijske krivulje. Metoda je linearna, če je koeficient korelacije vsaj 0,99. Kriteriji sprejemljivosti: $R^2 \geq 0,990$.

Pojma specifičnost (angl. specificity) in selektivnost (angl. selectivity) se pogosto zamenjujeta. Izraz specifičen se nanaša na metodo, ki daje odziv samo za en analit,

selektiven pa na metodo, ki daje odziv za več analitov, ki jih lahko med seboj razlikujemo ali pa ne. Če odzive lahko med seboj razlikujemo, lahko rečemo, da je metoda selektivna. Smernice ICH definirajo specifičnost metode kot zmožnost, da metoda lahko nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent v vzorcu, kot so npr. drugi analiti, nečistote, razpadni produkti in spojine iz vzorca.

Kriteriji sprejemljivosti: $t_{rst}(\text{standarda}) = t_{rvz}(\text{vzorca})$

t_r = retencijski čas (to je čas, ki poteče od injiciranja vzorca do trenutka, ko detektor zazna vrh oz. maksimum vrha).

Meja zaznave, meja detekcije (LOD - angl. limit of detection) je najnižja koncentracija analizirane komponente, ki jo lahko določimo v vzorcu, vendar je ne moremo kvantitativno ovrednotiti. V kromatografiji je meja zaznave injicirana količina, katere višina pika, oziroma ploščina, je trikrat višja od šuma bazne linije. Kriteriji sprejemljivosti • meja detekcije, odziv : šum = 3 : 1.

Meja kvantifikacije (LOQ - angl. Limit of quantification)

Meja kvantifikacije analznega postopka je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo je mogoče kvantitativno določiti z ustrezno natančnostjo in točnostjo. Ponavadi je meja določanja najnižja točka umeritvene krivulje oziroma najnižja koncentracija standardne raztopine, ki smo jo merili in kvantificirali. Kriteriji sprejemljivosti • meja kvantifikacije, odziv : šum = 10 : 1.

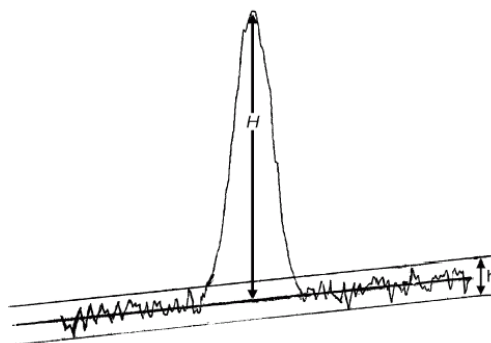
Opisuje jo enačba 16:

$$S/N = \frac{\text{Signal}}{\text{Šum}} = \frac{2H}{h} \quad \dots (16)$$

Pri čemer je:

H = višina pika,

h = višina šuma (bazne linije).



Slika 4: Shematski prikaz ovrednotenja LOQ in LOD (Snyder in sod., 1997)

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Med eksperimentalnim delom pridobljene vrednosti vsebnosti prolina, skupnih beljakovin in vsebnosti posameznih aminokislin smo ovrednotili s statističnimi opisnimi parametri:

a) Osnovni statistični parametri:

- aritmetično sredino,
- standardnim odklonom (s) in
- koeficientom variabilnosti (KV).

b) Analiza statističnih vzorcev za posamezno statistično spremenljivko z:

- Levenovim testom homogenosti varianc,
- analizo varianc (ANOVA),
- Duncanovim testom.

c) Analiza povezanosti dveh spremenljivk s:

- Pearsonovim koeficientom korelacije (r),
- regresijskim koeficientom determinacije (r^2).

d) Neparametrični testi

3.3.1 Enovzorčna analiza

3.3.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje

Aritmetična sredina vzorca je najpogosteje izbrano merilo srednje vrednosti. Predstavlja nekako težišče podatkov, saj je vsota odklonov posameznih vrednosti spremenljivke od povprečja navzgor enaka vsoti odklonov navzdol. Aritmetično sredino vzorca izračunamo iz enačbe 17 tako, da seštejemo vrednosti spremenljivk vseh statističnih enot, X_i in vsoto delimo s številom podatkov (n) (Adamič, 1989).

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i \quad \dots (17)$$

3.3.1.2 Varianca in standardni odklon

Varianca vzorca (s^2) je merilo variiranja oziroma razpršenosti podatkov okoli aritmetične sredine. Izračunamo jo iz enačbe 18, kot povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Kadar je število statističnih enot vzorca manjše od 30, je imenovalac v enačbi zmanjšan za ena (Adamič, 1989).

Varianca je za statistično analizo podatkov zelo pomembna, kot opisni parameter pa manj, saj kvadrat merske enote ene spremenljivke pogosto nima pravega smisla. V ta namen se pogosto uporablja kvadratni koren variance, ki ga imenujemo tudi standardna deviacija ali standardni odklon in ga izračunamo po enačbi 19 (Adamič, 1989).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2 \quad \dots (18)$$

$$SD = s = \sqrt{s^2} \quad \dots (19)$$

3.3.1.3 Koeficient variabilnosti

Absolutne mere variacij, kot sta npr. varianca in standardni odklon, za primerjavo variiranja več statističnih spremenljivk z različnimi povprečnimi vrednostmi, običajno niso primerne. Objektivno primerjavo takšnih statističnih spremenljivk nam omogoča koeficient variabilnosti, ki ga izračunamo tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino opazovanega vzorca in dobljeno vrednost izrazimo v odstotkih, enačba 20 (Adamič, 1989).

$$KV(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad \dots (20)$$

3.3.1.4 Mediana

Mediana (*Me*) ali centralna vrednost je tista vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjše, polovica pa večje vrednosti spremenljivke. Pri statističnem sklepanju je v splošnem mediana manjšega pomena kot aritmetična sredina, saj ni povezana z nobeno teoretično porazdelitvijo. Prav slednje pa se izkaže kot prednost v primeru asimetrične porazdelitve statistične mase (Adamič, 1989)

Kljub temu, da mediano lahko izračunamo, jo je preprosteje določiti, kadar so podatki rangirani, t.j. urejeni po velikosti od najmanjše do največje vrednosti. Če je število enot liho, je mediana enaka srednji vrednosti enote v ranžirni vrsti, če pa je število sodo, je mediana povprečje srednjega para podatkov (Adamič, 1989).

3.3.2 Analiza povezanosti dveh spremenljivk

Medsebojno zvezo dveh spremenljivk (*x,y*) preučujemo s statistično metodo korelacije in regresije. Tako ugotavljamo ali obstaja povezanost med spremenljivkama in kakšne vrste je, ali pa poizkušamo na osnovi ene spremenljivke napovedati vrednost druge (Adamič, 1989).

Korelacija je prav tako metoda za statistično analizo dveh spremenljivk, vendar obe spremenljivki obravnava kot neodvisni. To pomeni, da vrednosti spremenljivk ne moremo izbrati vnaprej, sta naključni, odvisni od napak pri merjenju, na obe delujejo biološki in drugi dejavniki variabilnosti. Korelacija je lahko pozitivna ali negativna, velika ali majhna, ali pa sploh ne obstaja. (Adamič, 1989).

3.3.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu

Korelacijo opisujejo različni koeficienti korelacije, med katerimi je tudi Pearsonov (*r*), ki je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ne nujno odvisni ena od druge. Koeficient je enak razmerju med kovarianco (C_{xy}) (enačba 22) in zmnožkom standardnih deviacij za obe spremenljivki *x* in *y* (s_x in s_y) (enačba 21).

$$r = \frac{C_{xy}}{s_x \cdot s_y} \quad \dots (21)$$

$$C_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{(x)}^n [(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})] \quad \dots (22)$$

Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vse vrednosti od maksimalne negativne korelacije (-1) do maksimalno pozitivne korelacije (+1). Pozitivne vrednosti pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, druge pa pada. Vrednost 0 pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti. Na osnovi velikosti koeficienta korelacije lahko sklepamo, kako močna je povezava med statističnimi enotami. Kadar je vrednost koeficienta korelacije nad 0,7, govorimo o močni povezanosti. Velikost koeficienta korelacije pa nam ne pove ničesar o tem, če je povezava značilna (Adamič, 1989). Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti so navedene v preglednici 6.

Preglednica 6: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti med spremenljivkama (Seljak, 1996)

Korelacijski koeficient (r)	Povezanost
od 0,00 do ± 0,20	povezanosti ni
nad ± 0,20 do ± 0,40	šibka
nad ± 0,40 do ± 0,70	zmerna
nad ± 0,70 do ± 1,00	močna

3.3.2.2 Koeficient determinacije

Koeficient determinacije (r^2) vrednoti kakovost regresijskega modela in je kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (r). Izraža delež variance odvisne številske spremenljivke (y), ki je pojasnjen z regresijskim modelom ene ali več neodvisnih spremenljivk (x) (Košmelj, 2001).

Povezava med dvema obravnavanima spremenljivkama je močna, ko je koeficient determinacije večji od 0,5.

3.3.3 Večvzorčna analiza ene spremenljivke

Metode statistične analize temeljijo na postavljanju, preverjanju, sprejemanju ali zavračanju domnev. Vselej natančno definiramo osnovno domnevo (H), ki v splošnem pravi, da se preiskovane vrednosti med seboj statistično razlikujejo. Tej določimo nasprotno, ničelno domnevo (H_0), ki trdi, da razlik ni, ali pa so zgolj naključne. Ker si osnovna in ničelna domneva nasprotujeta, ima zavrnitev ničelne domneve za posledico sprejetje osnovne domneve. Pred preverjanjem domnev je potrebno določiti kritično oz. zgornjo mejo tveganja (α), pri kateri sprejmemo ali zavrnemo ničelno hipotezo. V biostatistiki so najpogosteje izbrane vrednosti 0,05, 0,01 ali 0,001, glede na to govorimo o 5 %, 1 % ali 0,1 % stopnji značilnosti rezultatov oziroma stopnji tveganja. Nato za podatke, ki jih želimo analizirati, izberemo ustrezen statistični test. Če je izračunana

vrednost izraza manjša od kritične vrednosti, ki jo pri izbrani stopnji tveganja in številu prostostnih stopenj odčitamo iz ustrezne statistične preglednice, zavrremo ničelno domnevo in sprejmemo osnovno. V nasprotnem primeru, ničelne domneve ne moremo zavrniti in osnovna ostane nepotrjena (Adamič, 1989).

3.3.3.1 Parametrični in neparametrični testi

Večina statističnih metod temelji na predpostavkah v zvezi s porazdelitvijo populacije. Imenujemo jih parametrične metode, ker preverjamo domneve o parametrih populacije. Pomanjkljivost parametričnih testov je predvsem v tem, da je ponavadi predpostavka o normalni porazdelitvi populacije le slabo utemeljena, kar lahko privede do negotovosti in možnih napak. Po drugi strani pa imajo parametrične metode večjo moč odkrivanja statističnih značilnosti in so primernejše za analizo podatkov, ki zahtevajo več vzorcev ali skupin (Adamič, 1989).

Neparametrični testi nam omogočajo hitrejše in preprostejše računanje, saj ne temeljijo na predpostavki o normalni ali drugačni porazdelitvi populacije. Ti testi so tudi manj občutljivi, kar pomeni večjo verjetnost, da bo statistična značilnost nekega rezultata ostala neodkrita (Adamič, 1989).

3.3.3.2 Levenov test homogenosti variance

Pri Levenovem testu iz vsakega vzorca zgradimo nov vzorec, v katerem so združene absolutne vrednosti odmikov od povprečne vrednosti opazovanega vzorca. Na novih vzorcih, ki opisujejo disperzije statističnih enot znotraj posameznih vzorcev, izvedemo analizo variance, s katero preverimo homogenost varianc neodvisnih vzorcev. Osnovna domneva pri Levenovem testu pravi (23), da med vsaj enim parom varianc obstaja statistično značilna razlika, ničelna (24) pa, da razlik med variancama ni:

$$H_0 : s_1 = s_2 = \dots = s_n \quad \dots (23)$$

$$H_1 : s_1 \neq s_2 \quad \dots (24)$$

Vrednost signifikance, ki nam jo vrne test, pove, katera izmed domnev je prava. Vrednost signifikance, ki je manjša od stopnje tveganja 0,05 vodi k sprejetju osnovne domneve, vrednost večja od 0,05 pa k potrditvi ničelne. Ničelna domneva je tista, ki si jo v danem primeru želimo, saj pomeni, da smemo vzorce medsebojno primerjati z dejansko analizo variance, ki sledi. Prednost Levenovega testa je manjša občutljivost za morebitna odstopanja podatkov od normalne porazdelitve, zato je primeren tudi takrat, ko za obravnavano spremenljivko ne moremo privzeti normalne porazdelitve (Košmelj in Kastelec, 2003).

3.3.3.3 ANOVA – Analiza variance

Pri uporabi analize variance domnevamo, da so porazdelitve posameznih vzorcev ene statistične spremenljivke normalne in, da se variance statističnih vzorcev med seboj statistično ne razlikujejo. Enakost varianc med vzorci imenujemo tudi homogenost varianc in smo jo predhodno preverili tudi z Levenovim testom. Analiza variance proučuje variabilnost vseh statističnih vzorcev hkrati. Z merjenjem vsote kvadratov odklonov opazovanih vrednosti od aritmetične sredine določa skupno variabilnost, ki jo nato razčleni na dele, opredeljene z različnimi viri variiranja. Celotno varianco enot iz vseh vzorcev tako razstavi na varianco enot v posameznem vzorcu in na varianco med temi vzorci (Košmelj in sod., 2002).

Ho: $x_1 = x_2 = \dots = X_n$

H: $x_1 \neq x_2$

Ničelna domneva (23) pravi, da vsi statistični vzorci izhajajo iz populacije z enakim povprečjem, osnovna (24) pa, da med opazovanimi statističnimi vzorci obstajata vsaj dva, katerih povprečji sta statistično različni. Kadar je vrednost signifikance dovolj majhna, manjša od 0,05, sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam oziroma, da med statističnimi vzorci obstaja vsaj en par, ki ima različni povprečji. S tem je zavrnjena ničelna hipoteza, ki pravi, da razlike ne obstajajo in posledično je sprejeta osnovna. Kadar med seboj primerjamo le dva statistična vzorca, analizo variance nadomestimo s testom t, ki daje enak rezultat (Adamič, 1989).

3.3.3.4 Duncanov test

Duncanov test je zaključni test, namenjen analizi večjega števila vzorcev, za katere je znano, da so homogeni (Levenov test), a ne pripadajo isti populaciji (ANOVA). Razlikovanje vzorcev je osnovano na večkratnem preizkušanju variacijskih razmikov. Stopnja značilnosti (signifikance) temelji na številu neodvisnih primerjav med aritmetičnimi sredinami. S pomočjo tega testa razdelimo posamezne vzorce v več podskupin, v katerih se vzorci glede na opazovano statistično spremenljivko ne razlikujejo (Adamič, 1989).

3.3.3.5 Studentov t-test

Če primerjamo dva majhna vzorca, nam standardni odklon vzorcev postane nezanesljiv cenilec za standardni odklon populacije. Tako preizkus domneve o razlikah med njunima povprečjema ne more temeljiti na normalni porazdelitvi, temveč na t porazdelitvi. V tem primeru t-test sloni še na dodatni predpostavki. Računati moramo skupen standardni odklon za oba vzorca, to pa smemo storiti le, če se varianci obeh vzorcev med seboj ne razlikujeta (Adamič, 1989).

Pri preizkušanju ničelne domneve o razliki med povprečjema dveh majhnih, neodvisnih vzorcev uporabljamo enačbo (25), kjer je s_s skupen standardni odklon za oba vzorca. n_1 je

število enot v prvem vzorcu, n_2 je število enot v drugem vzorcu, \bar{x}_1 je povprečna vrednost prvega vzorca, \bar{x}_2 pa povprečna vrednost drugega vzorca (Adamič, 1989).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \dots (25)$$

4 REZULTATI

Izbrano metodo HPLC za določanje vsebnosti aminokislin v medu smo modificirali in v prvem sklopu analitskega dela preverili ustreznost kromatografskega sistema.

4.1 USTREZNOST KROMATOGRAFSKEGA SISTEMA (SST)

Ustreznost kromatografskega sistema smo določili z SST testom, pri katerem smo preverjali:

- ponovljivost injiciranja (RSD = relativni standardni odklon),
- število teoretskih podov (N),
- ločljivost (R= resolucija),
- obliko kromatografskega vrha (T).

Vse dobljene vrednosti so bile v mejah zahtevanih kriterijev, s čimer smo potrdili ustreznost sistema HPLC za delo. Povzetki preiskovanih parametrov so podani v preglednici 7, kriteriji sprejemljivosti, ki se zanje zahtevajo, pa v preglednici 8.

Preglednica 7: Rezultati preiskovanih referenčnih standardov za ustreznost kromatografskega sistema

SST ref.st.	okrajšava	Konc. območje (mg/μL)	Linear-nost R ²	LOD (%)	LOQ (%)	R	N	T	RS1/RS2	Ponov-ljivost RSD (%)
asparaginska kislina	Asp	0,2584-2,584	0,99325	1,4	2,7	0	4630	0,84	1,0	0,06
glutaminska kislina	Glu	0,3722-3,722	0,99694	1,2	2,5	4,83	6735	0,90	0,4	0,32
asparagin	Asn	0,4128-4,128	0,99679	1,2	2,1	20,09	10410	0,91	1,6	0,10
serin	Ser	0,3704-3,704	0,99511	1,2	2,3	1,77	10265	0,82	1,9	0,23
glutamin	Gln	0,7190-7,190	0,99694	1,2	2,6	2,81	9792	0,82	1,8	1,34
histidin	His	0,2766-2,766	0,99145	1,6	3,2	1,96	9713	0,78	1,1	1,78
glicin	Gly	0,2646-2,646	0,99679	1,1	2,1	5,30	18048	0,80	1,9	0,12
alanin	Ala	0,8036-8,036	0,99610	0,8	1,6	4,22	31792	0,88	1,4	0,12
treonin	Thr	0,2962-2,962	0,99727	1,3	2,4	2,27	37293	0,83	2,0	1,89
arginin	Arg	0,2860-2,860	0,99705	1,2	2,6	2,49	53741	0,83	0,3	0,59
prolin	Pro	3,3000-33,00	0,99930	0,6	1,2	15,29	10991 4	0,86	1,3	0,43
tirozin	Tyr	0,5708-5,708	0,99716	1,0	1,9	8,53	10373 9	0,81	0,9	0,20
valin	Val	0,3600-3,600	0,99756	1,3	2,3	21,01	72393	0,80	1,9	0,44
metionin	Met	0,3626-3,626	0,99827	1,4	2,7	2,79	63320	0,80	1,9	1,28
cistein	Cys	0,2484-2,484	0,99857	3,8	8,8	14,16	50813	0,82	1,4	1,59
triptofan	Trp	0,2438-2,438	0,99626	0,7	1,4	2,78	36292	0,84	0,8	1,65
alo-izolevcin	Allo- lle	0,2196-2,196	0,99702	2,1	4,5	4,50	10914	0,80	2,0	1,25
izolevcin	Ile	0,3064-3,064	0,99077	2,9	5,2	0,46	42061	0,76	1,5	1,33
fenilalanin	Phe	3,0210-30,21	0,99876	1,2	2,4	2,45	42061	0,81	1,0	0,20
levcin	Leu	0,2954-2,954	0,99106	1,1	2,1	12,03	87277 4	0,81	1,0	1,14
lizin	Lys	0,3088-3,088	0,99754	1,5	2,9	2,79	20606 90	0,83	0,2	0,32

Z rezultati ustreznosti kromatografskega sistema smo bili zelo zadovoljni, saj smo dobili rezultate, ki ustrezajo kriterijem za zelo natančen HPLC sistem. Pomembne vrednosti za dober, stabilen HPLC sistem so ponovljivost injiciranja, s tem zagotovimo majhen RSD med vzorci, oziroma majhne napake s strani HPLC sistema. Vse referenčne standarde smo tehtali v dveh paralelkah, s pokrivanjem $RS1/RS2 \leq 2,0\%$ smo dokazali, da sta obe standardni raztopini natančno pripravljene in derivatizirane. Kriterij, ki nam pove, če je kolona, ki smo jo uporabili primerna, za aminokislinsko ločbo, je število teoretičnih podov (N), ki je merilo učinkovitosti kolone. Ločljivost (resolucija) sosedno ležečih vrhov je merilo za kvaliteto separacije. Faktor popačenja pa nam pove, če je oblika kromatografskega pika simetrična. Po uspešni zagotovitvi sistema smo tako lahko nadaljevali z osnovnimi validacijskimi parametri in samo analizo vzorcev medu.

Preglednica 8.: Kriteriji sprejemljivosti validacijskih parametrov

Validacijski parametri	Kriterij sprejemljivosti
konc. območje analiziranih standardov	125 %, 100 %, 75 %, 25 %, 12,5 %
R^2	$R^2 \geq 0,99$
LOD (%) meja detekcije	
LOQ (%) meja kvantifikacije	
resolucija med standardi (R)	$R \geq 0,5$
ponovljivost injiciranja (RS1)	$n = 5, RSD \leq 2,0 \%$
št. teoretičnih podov (N)	$N \geq 2000$
faktor popačenja (T)	$0,7 \% \leq T \leq 2,0 \%$
pokrivanje standardov (S1/S2)	$RS1/RS2 \leq 2,0 \%$

- Dnevna ponovljivost: izvedli smo jo tako, da smo pripravili 4 paralelke vzorca medu. Vse štiri paralelke vzorca smo injicirali dvakrat ob nespremenjenih kromatografskih pogojih merjenja. Izračunali smo RSD med posameznimi injiciranjmi in paralelkami. S kriterijem za sprejemljivost določenih vrednosti standardov posameznih aminokislin ($n=4$) $\leq 10,0 \%$ smo potrdili natančnost metode znotraj dneva (preglednica 9).

- Meddnevna ponovljivost: določanje smo izvedli tako, da smo izbrali isti vzorec medu. Po petih dneh smo pripravili ponovno 4 paralelke in jih izmerili na drugem sistemu HPLC. Rezultate iz obeh sistemov smo primerjali in izračunali RSD med 8 paralelkami. Glede na kriterij natančnosti metode ($RSD \leq 15,0 \%$) smo ugotovili, da je metoda dovolj natančna za določanje aminokislin v medu, saj smo dobili RSD za dnevno in meddnevno natančnost metode, ki so podani v preglednici 9.

Preglednica 9: Natančnost (dnevna in meddnevna ponovljivost) metode HPLC za določanje aminokislin

Natančnost:	Dnevna ponovljivost (n=4)	Meddnevna ponovljivost (n=8)
aminokislina	RSD (%)	RSD (%)
Asp	6,2	10,8
Glu	0,5	1,1
Asn	3,5	4,3
Gln	2,0	2,1
His	8,9	10,8
Ser	1,4	3,5
Ala	0,6	2,8
Arg	1,8	2,9
Gly	5,2	8,0
Thr	2,8	4,4
Pro	0,2	0,7
Tyr	1,5	2,7
Val	2,4	4,4
Cys	10,0	13,6
Allo-Ile	7,6	14,2
Phe	3,1	4,7
Lys	1,1	3,8
Σ AK	0,2	0,8

- Meja detekcije (LOD) in meja kvantifikacije (LOQ) za aminokislino:

Določili smo ju z redčenjem standardne raztopine do doseženega kriterija za LOD razmerje signal/šum $\geq 3:1$ in za LOQ $\geq 10:1$. Ugotovljene meje detekcije in meje kvantifikacije so podane (preglednici 6) glede na delovno koncentracijo standarda.

-Točnost metode: smo določali tako, da smo pripravili po 3 paralelke vzorca medu (vzorec št. 1813 - gozdni med, letnik 2008) s tremi različnimi koncentracijami standardne raztopine prolina pri točki 25 %, 100 %, 125 % glede na delovno koncentracijo standarda. Izkoristki aminokislino prolina s standardnimi dodatki v vzorcu medu so navedeni v preglednici 10.

Preglednica 10: Izkoristki aminokislino prolina (%) in RSD med izkoristki (%), glede na standardni dodatek aminokislino prolina

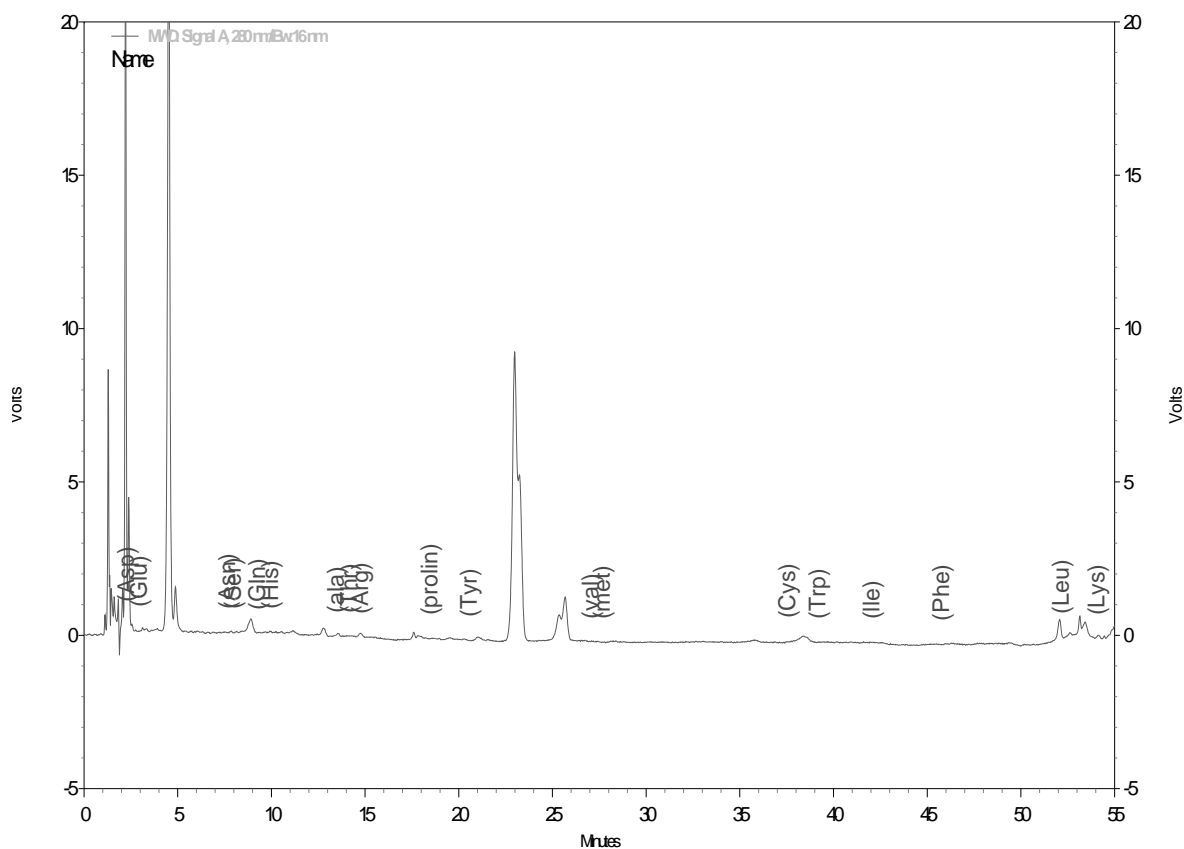
Raztopina standarda prolina (%)	Izkoristek (%)	RSD med izkoristki (%)
25	82,3	5,8
100	95,5	4,6
125	98,7	3,7

Glede na kriterij sprejemljivosti za točnost ($100,0 \pm 20,0$ %) in koncentracijo prolina v standardni raztopini, smo ugotovili, da je uporabljena HPLC metoda dovolj natančna za določanje vsebnosti prolina.

Ostalih aminokislin nismo vključili v preverjanje točnosti, saj pri preverjanu linearnosti niso kazale nobenih težav (reagiranje z DEMM reagentom). Pri prolinu smo ugotovili, da je čas, ki je potreben, da poteče reakcija med aminokislino in derivatizacijskim reagentom DEMM 24 ur po derivatizaciji raztopine vzorca oziroma raztopine standarda. Zato smo hoteli to potrditi še z validacijskim parametrom točnosti.

- Selektivnost metode: ugotavljali smo jo z injiciranjem slepega vzorca, standardne raztopine in vzorca. Slepi vzorec ne sme imeti odziva na mestih odziva aminokislin (slika 5). Poleg tega se morajo retencijski časi posameznih aminokislin v standardu ujemati z retencijskimi časi v vzorcu (t_r = retencijski čas). Retencijski časi za posamezno aminokislino so navedeni v preglednici 11.

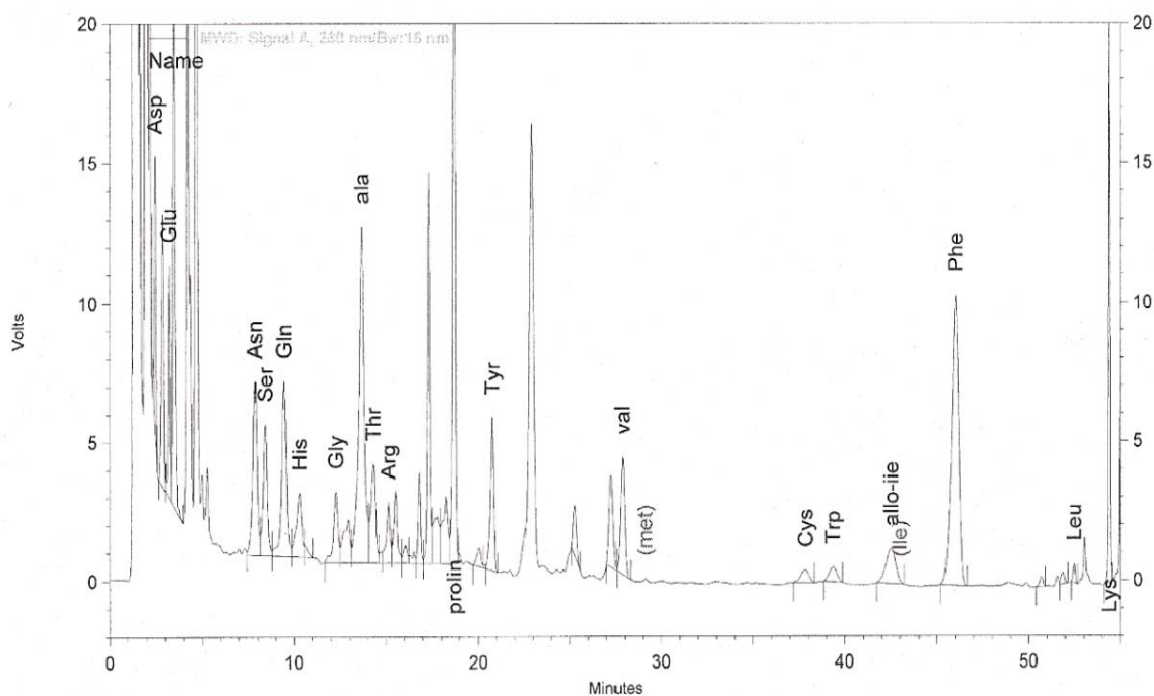
$$t_{rst} \text{ (retencijski čas standarda aminokislina)} = t_{rvz} \text{ (retencijski čas vzorca aminokislina)}$$



Slika 5: Kromatogram slepega vzorca

Preglednica 11: Retencijski časi aminokislin (min ± 0,2 min)

Aminokislina	Retencijski časi (min ± 0,2 min)	Aminokislina	Retencijski časi (min ± 0,2 min)
Asp	2,5	Tyr	20,8
Glu	3,2	Val	27,9
Asn	7,8	Met	29,1
Ser	8,4	Cys	37,3
Gln	9,4	Trp	39,3
His	10,2	Allo-Ile	42,5
Gly	12,2	Ile	43,1
Ala	13,6	Phe	46,0
Thr	14,3	Leu	52,5
Arg	15,0	Lys	54,4
Pro	18,7		

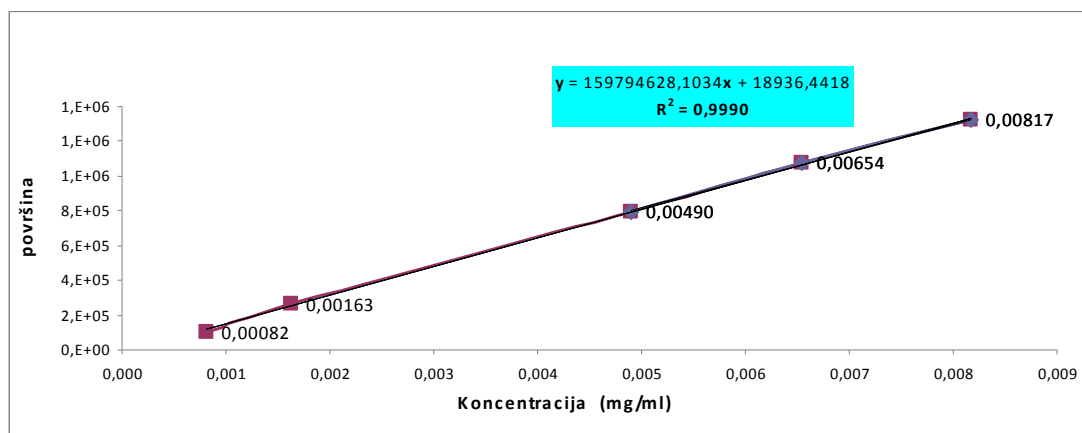


Slika 6: Primer kromatograma raztopine vzorca medu

Iz kromatogramov slepega vzorca (slika 5) je razvidno, da na mestu kromatografskih vrhov posameznih aminokislin ni vrhov, ki bi motili določanje vsebnosti aminokislin. Retencijski časi aminokislin v analiziranem vzorcu medu se ujemajo z retencijskimi časi aminokislin v raztopini standarda. Glede na kriterije selektivnosti (kromatogram slepega vzorca ne vsebuje spojin, ki bi motile elucijo aktivnih komponent aminokislin v medu) smo

ugotovili, da je metoda selektivna za določanje in identifikacijo aminokislin v vzorcih medu.

- Linearnost: po standardnem postopku smo analizirali pripravljenih pet raztopin (125 %, 100 %, 75 %, 25 %, 12,5 % glede na delovni standard). Analiziranim standardnim raztopinam smo izmerili ploščine pod kromatografskimi vrhovi in iz dobljenih točk izračunali parametre linearne regresije. Koeficienti koleracije za posamezno aminokislino so podani v preglednici 6. Metoda je linearna, saj so vsi koeficienti koleracije večji od kriterija sprejemljivosti $R^2 \geq 0,990$. Primer grafa linearnosti (slika 7).



Slika 7: Določanje linearnosti metode HPLC s standardno raztopino prolina

4.2 REZULTATI DOLOČANJA VSEBNOSTI BELJAKOVIN IN AMINOKISLIN

Praktični del diplomske naloge je obsegal določanje vsebnosti prolina s spektrofotometrično metodo prilagojeno po Bogdanovu in sod. (1997), določitev skupnih beljakovin z metodo po Kjeldahlu in kvantitativno določitev aminokislin z metodo HPLC. Raziskava je bila opravljena na skupno 88 vzorcih medu slovenskega porekla petih različnih vrst: akacijevega (16), lipovega (16), kostanjevega (18), cvetličnega (18) in gozdnega (20) medu. Vzorci so bili vzorčeni leta 2007, 2008 in 2010. Poleg tega je bilo v analize vključenih še 21 vzorcev treh vrst medu, ki smo jih namerno potvorili z dodatki različnih deležev sirupov.

4.2.1 Vsebnost beljakovin in aminokislin v vzorcih pristnega medu

Analize vsebnosti skupnih beljakovin, aminokislin z metodo HPLC in prolina s spektrofotometrično metodo so bile opravljene na 88 vzorcih medu v dveh oziroma treh (beljakovine) ponovitvah. V preglednici 12 so predstavljene povprečne vrednosti rezultatov analiz z omenjenimi metodami in njihovi standardni odkloni.

Preglednica 12: Povprečne vrednosti (\bar{x}) v (mg/kg) in standardna deviacija (SD) v (mg/kg), vsebnost prolina spektrofotometrično (prolin SPF), skupnih beljakovin s Kjeldalovo metodo (beljakovine) in posameznih aminokislin s HPLC metodo, v petih vrstah medu

Vrsta medu parameter	Akacijev $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Cvetlični $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Lipov $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Kostanjev $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	Gozdni $\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)
beljakovine	1364 ± 317	3145 ± 834	2095 ± 723	3995 ± 702	3983 ± 1193
prolin SPF	346 ± 137	550 ± 196	432 ± 200	797 ± 203	607 ± 157
HPLC					
Asp	30,1 ± 10,1	21,1 ± 7,98	15,4 ± 9,72	22,4 ± 6,85	26,2 ± 10,2
Glu	24,5 ± 12,0	44,1 ± 64,7	24,0 ± 11,61	47,7 ± 37,5	39,4 ± 18,8
Asn	46,3 ± 19,0	37,5 ± 16,0	51,8 ± 30,9	19,7 ± 14,8	38,7 ± 19,8
Gln	43,7 ± 21,9	65,3 ± 28,2	82,3 ± 56,9	32,6 ± 33,4	107 ± 122
His	18,3 ± 18,6	13,7 ± 6,74	26,6 ± 25,1	7,02 ± 7,19	20,3 ± 24,0
Ser	16,8 ± 8,9	20,3 ± 7,42	33,6 ± 14,3	20,5 ± 10,6	26,8 ± 15,3
Ala	67,0 ± 29,7	88,8 ± 44,5	90,9 ± 23,6	57,8 ± 24,4	70,0 ± 47,7
Arg	15,0 ± 16,3	19,0 ± 7,73	27,4 ± 17,6	29,3 ± 20,3	25,8 ± 15,7
Gly	6,73 ± 5,69	9,12 ± 3,46	7,31 ± 7,34	8,83 ± 2,95	11,0 ± 3,4
Thr	19,1 ± 7,74	23,3 ± 11,8	31,1 ± 13,8	22,6 ± 18,8	22,0 ± 8,60
Pro	232 ± 108	329 ± 135	239 ± 116	396 ± 162	359 ± 146
Tyr	24,1 ± 22,6	31,2 ± 14,1	30,3 ± 27,0	42,5 ± 25,9	35,6 ± 20,5
Val	10,7 ± 4,11	17,8 ± 5,42	14,3 ± 8,24	16,6 ± 6,35	16,9 ± 7,94
Met	4,06 ± 7,93	1,95 ± 8,07	4,60 ± 14,6	1,88 ± 3,67	0
Cys	4,83 ± 7,25	9,74 ± 13,3	5,36 ± 6,63	18,0 ± 19,1	6,01 ± 11,3
Trp	0,38 ± 1,50	0	0	0	0
Leu	15,5 ± 19,0	6,23 ± 14,6	9,65 ± 15,0	6,33 ± 12,3	2,75 ± 8,46
Ile	1,81 ± 7,25	0	1,95 ± 7,79	0	0
AlloIle	2,81 ± 1,61	7,69 ± 5,67	3,93 ± 3,62	4,39 ± 2,97	6,25 ± 4,17
Phe	94,0 ± 155	205 ± 169	112 ± 141	116 ± 119	190 ± 255
Lys	40,3 ± 11,2	28,5 ± 12,3	22,9 ± 14,5	19,2 ± 12,9	16,6 ± 12,7
ΣAK	713 ± 327	921 ± 226	792 ± 315	856 ± 312	995 ± 454

Največjo vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo smo določili v vzorcih kostanjevega medu (797 mg/kg), najmanjšo pa v akacijevem medu (346 mg/kg). Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi z analizo aminokislinske sestave z metodo HPLC, pri čemer smo določili manjše vrednosti prolina v vseh petih vrstah medu. Največ prolina je v povprečju še vedno vseboval kostanjev med (396 mg/kg). Najmanjšo povprečno vsebnost prolina smo tudi s HPLC metodo določili v akacijevem medu (232 mg/kg). Pregled rezultatov v preglednici 12 potrjuje navedbe iz literature, da je prolin aminokislina, ki je v medovih zastopana v največjem deležu. Poleg tega smo ugotovili, da je fenilalanin po zastopanosti naslednja aminokislina v medu. Največjo povprečno vsebnost smo določili v cvetličnem medu (205 mg/kg). Analizirane vrste slovenskega medu so vsebovale najmanj triptofana, ki smo ga določili le v akacijevem medu (0,38 mg/kg).

Kljub temu, da smo v kostanjevem medu z dvema metodama določili največ prolina, smo s seštevkom vsebnosti določenih aminokislin ugotovili, da je v povprečju največ aminokislin vseboval gozdni med (995 mg/kg), nato cvetlični (921 mg/kg) in šele na tretjem mestu kostanjev med (856 mg/kg). Najmanj skupnih aminokislin je pričakovano vseboval akacijev med (713 mg/kg).

Povprečna vsebnost skupnih beljakovin ni povsem sledila seštevku aminokislin. Največ skupnih beljakovin smo določili v kostanjevem medu (3995 mg/kg) in le nekoliko manj v gozdnem medu (3983 mg/kg), približno 2/3 manj pa v akacijevem medu (1364 mg/kg).

4.2.2 Zveze med analiziranimi parametri v vzorcih medu

Zvezo med analiziranimi parametri smo ugotavljali z izračunom korelacijskih koeficientov med njimi (neodvisna zveza) ter s proučevanjem odvisne zveze med vsebnostjo prolina in skupnimi aminokislinami ter vsebnostjo prolina in skupnimi beljakovinami.

Zveze med analiziranimi parametri v vzorcih medu predstavljamo v preglednici 13. Močna povezanost je med vsebnostjo prolina analiziranega spektrofotometrično in vsebnostjo skupnih beljakovin, med vsebnostjo glutamina in vsoto vseh aminokislin določenih s HPLC metodo, med vsebnostjo serina in glutamina, med vsebnostjo serina in histidina, alo-izolevcina in valina, ter vsoto aminokislin in vsebnostjo fenilalanina.

4.2.3 Rezultati določanja beljakovin in aminokislin v vzorcih potvorjenega medu

Analizirali smo vzorce treh različnih vrst slovenskega medu, ki smo jih namerno potvorili z dodatki treh različnih deležev sladkornih sirupov treh vrst. Pripravili smo 21 vzorcev namerno potvorjenega medu tako, da smo dodali različne deleže (2 %, 8 %, 20 %) sladkornih sirupov.

Uporabili smo 3 različne vrste sladkornih sirupov:

- glukožno - fruktozni sirup letnik 2009 (GF) in letnik 2010 (GF2),
- invertni sirup letnik 2009 (IN),
- glukozni sirup letnik 2009 (GL).

Rezultati povprečnih vrednosti analiziranih parametrov v vzorcih potvorjenega medu so podani v preglednicah 14, 15 in 16.

Vzorce smo označili po naslednjem sistemu:

Najprej je navedena oznaka vrste medu (A – akacijev, C – cvetlični, G – gozdni), nato odstotek dodanega sirupa (2 %, 8 %, 20 %) in na koncu vrsta uporabljenega sirupa (GF2, GF, GL, IN).

V vzorcih smo določali vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo prilagojeno po Bogdanovu in sod. (1997) in vsebnost aminokislin z metodo HPLC.

Preglednica 14: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih akacijevega medu, potvorjenega z različnimi deleži sirupov

Vzorec	A-2-GF2 \bar{x} (mg/kg)	A-8-GF2 \bar{x} (mg/kg)	A-20-GF2 \bar{x} (mg/kg)
Parameter			
prolin SPF	156,2	112,0	112,0
HPLC			
Asp	41,0	38,4	16,4
Glu	47,6	44,8	26,4
Asn	80,4	75,0	43,3
Gln	53,4	49,7	40,6
His	25,2	23,1	13,5
Ser	17,3	17,1	10,1
Ala	37,9	45,1	66,1
Arg	12,7	12,3	5,17
Gly	5,63	5,2	2,94
Thr	19,6	19,6	10,9
Pro	340	323	268
Tyr	69,2	68,4	41,1
Val	14,2	14,0	7,61
Met	0	0	0
Cys	0	0	0
Trp	0	0	0
Leu	0	0	0
Ile	0	0	0
AlloIle	4,30	3,66	1,80
Phe	502	474	273
Lys	62,8	60,0	33,9
Σ AK	1320	1273	860

Preglednica 15: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih cvetličnega medu, potrjenega z različnimi deleži sirupov

Vzorec	C-2-GF	C-8-GF	C-20-GF	C-2-GL	C-8-GL	C-20-GL	C-2-IN	C-8-IN	C-20-IN
parameter	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
prolin SPF	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
prolin SPF	601	346	355	988	708	603	163	362	215
HPLC									
Asp	12,5	11,7	8,81	15,1	11,8	10,0	8,18	7,49	8,46
Glu	20,0	20,0	19,3	21,9	20,2	17,7	20,3	21,0	18,2
Asn	20,6	19,0	11,8	22,1	20,4	17,9	20,5	20,6	10,8
Gln	25,4	22,7	14,2	25,0	21,0	19,5	23,4	22,8	13,0
His	11,0	10,6	10,4	14,3	8,01	7,56	8,85	9,79	7,03
Ser	12,9	11,7	10,1	17,9	15,9	15,0	14,1	14,1	11,0
Ala	45,0	41,3	40,1	43,0	63,8	100	47,1	42,8	34,9
Arg	15,0	12,0	17,9	14,8	14,6	13,4	14,3	10,6	8,56
Gly	7,78	6,26	5,62	8,85	9,16	8,87	4,75	4,72	3,27
Thr	30,6	18,0	15,6	17,8	16,4	14,1	13,9	12,1	8,43
Pro	272	239	231	242	209	206	222	197	119
Tyr	42,8	30,3	28,9	35,7	32,2	29,5	35,1	34,1	17,0
Val	15,6	15,2	14,5	21,7	19,2	15,0	16,6	15,9	9,15
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	24,1	16,2	15,2	0	0	0	9,62	0	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AlloIle	3,26	2,6	2,02	9,06	7,35	6,01	6,80	6,56	4,75
Phe	257	246	239	316	264	247	265	256	232
Lys	17,5	15,0	14,8	21,3	18,5	13,9	20,4	19,5	13,5
Σ AK	832	758	681	846	751	741	752	695	519

Preglednica 16: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih gozdnega medu medu, potvorjenega z različnimi deleži sirupov

Vzorec parameter	G-2-GF \bar{x} (mg/kg)	G-8-GF \bar{x} (mg/kg)	G-20-GF \bar{x}	G-2-GL \bar{x} (mg/kg)	G-8-GL \bar{x} (mg/kg)	G-20-GL \bar{x} (mg/kg)	G-2-IN \bar{x} (mg/kg)	G-8-IN \bar{x} (mg/kg)	G-20-IN \bar{x} (mg/kg)
prolin SPF	465	328	218	877	797	582	316	610	705
HPLC									
Asp	9,26	9,0	6,8	10,0	9,15	8,46	16,7	10,5	9,3
Glu	22,0	18,3	17,1	17,9	18,3	14,9	25,9	21,2	19,2
Asn	21,6	11,6	8,09	19,2	13,6	7,76	13,6	12,7	11,2
Gln	26,2	13,8	8,47	18,4	14,1	8,8	15,8	13,4	9,29
His	11,1	8,05	4,93	9,48	7,12	5,14	7,44	6,25	4,54
Ser	15,5	11,4	11,15	15,0	13,8	9,42	14,9	12,1	6,68
Ala	65,7	65,2	103	63,5	79,0	85,7	55,7	61,7	91,6
Arg	17,3	13,1	9,80	8,84	7,61	3,64	10,4	8,28	5,83
Gly	9,50	5,34	2,58	5,98	4,49	4,39	8,46	6,75	7,02
Thr	14,3	8,83	5,57	6,90	7,43	6,71	11,7	10,0	6,67
Pro	283	256	172	277	229	158	202,	194	151
Tyr	34,6	17,5	12,6	25,7	22,2	13,6	22,4	18,9	17,9
Val	16,9	10,1	7,30	14,4	14,0	6,70	16,3	13,1	11,9
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	11,7	7,52	0	0	0	0	0	0	0
Trp	0		0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AlloIle	0	0	0	0	0	0	4,58	3,46	3,32
Phe	272	57,7	40,7	80,6	72,0	36,4	79,0	64,7	57,4
Lys	18,4	8,13	4,76	16,7	12,9	4,08	11,6	9,8	10,5
Σ AK	784	508	414	590	525	374	517	466	424

Analizirali smo tudi vsebnost prolina spektrofotometrično in vsebnost posameznih aminokislin s HPLC metodo v uporabljenih sladkornih sirupih. Povprečni rezultati so predstavljeni v preglednici 17.

Preglednica 17: Vsebnost prolina določenega s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in vsebnost posameznih aminokislin (HPLC), v vzorcih sladkornih sirupov

Vrsta sirupa parameter	GL (mg/kg)	IN (mg/kg)	GF (mg/kg)	GF2 (mg/kg)
prolin SPF	19,5	20,7	23,4	467
HPLC				
Ala	15,7	12,8	80,0	119
Σ AK	15,7	12,8	80,0	119

Z metodo HPLC prolina nismo kvantificirali, smo pa določili vsebnost alanina kot edine aminokislino v sladkornih sirupih. S spektrofotometričnim določanjem prolina smo za vzorce sirupa dobili povsem drugačne rezultate, ki deloma sledijo trendu vsote aminokislin (HPLC), oziroma vsebnosti alanina, kot edini prisotni aminokislini, ki je bila določena.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Primerjava povprečnih vrednosti preiskovanih parametrov

Eksperimentalni del raziskave je obsegal določanje vsebnosti skupnih beljakovin, vsebnosti prolina spektrofotometrično in vsebnosti aminokislin z metodo HPLC v medu. Vzorci petih vrst medu (akacijev, cvetlični, lipov, kostanjev in gozdni) so bili letnikov 2007, 2008 in 2010. Vzorci namerno potrjenega medu so bili pripravljene tako, da smo dodali različne deleže sladkornih sirupov. Rezultate analiz smo obdelali z različnimi statističnimi metodami in prišli do določenih ugotovitev, ki smo jih med seboj primerjali in ugotavljali ali obstajajo zveze med analiziranimi parametri.

Zanimala nas je povezava med omenjenimi metodami, zato smo v preglednici 18 podali, glede na vrsto medu, povprečne vsebnosti prolina, določenega s spektrofotometrično in HPLC metodo, ter povprečne vsebnosti beljakovin.

Preglednica 18: Povprečne vrednosti (\bar{x}) v (mg/kg) in standardna deviacija (SD) v (mg/kg) v vzorcih medu. Vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo (prolin SPF), beljakovin (beljakovine) in vsebnost aminokislin (\sum AK HPLC)

Vrsta medu	n	Prolin SPF $\bar{x} + SD$ (mg/kg)	Prolin HPLC $\bar{x} + SD$ (mg/kg)	\sum AK HPLC $\bar{x} + SD$ (mg/kg)	Beljakovine $\bar{x} + SD$ (mg/kg)
akacijev	16	345 ± 138	232 ± 108	713 ± 327	1364 ± 320
cvetlični	18	550 ± 196	329 ± 135	921 ± 226	3145 ± 830
gozdni	20	607 ± 157	359 ± 146	995 ± 454	3983 ± 119
kostanjev	18	797 ± 203	396 ± 162	856 ± 312	3995 ± 702
lipov	16	432 ± 200	239 ± 116	792 ± 314,2	2095 ± 723

Največjo povprečno vsebnost prolina, določeno s spektrofotometrično metodo, je imel kostanjev med, 797 mg/kg. Tudi s HPLC metodo smo največ prolina določili v kostanjevem medu, 396 mg/kg, čeprav je to skoraj pol manj kot s spektrometrično metodo. Če naredimo primerjavo še s skupnimi beljakovinami, analiziranimi s Kjeldahlovo metodo, je prav tako največji delež beljakovin v kostanjevem medu, 3995 mg/kg. Vsota vseh aminokislin, ki smo jih določili s HPLC metodo, znaša v kostanjevem medu 856 mg/kg, kar pa ni največja vsebnost, saj smo opazno več aminokislin dobili v vzorcih gozdnega medu in sicer 995 mg/kg. Najmanjše vrednosti smo z vsemi tremi metodami dobili pri akacijevem medu.

Glede odstopanj rezultatov za vsebnost prolina med obema uporabljenima metodama pa menimo, da je spektrofotometrična metoda manj primerna. Ugotovili smo nekatere njene pomanjkljivosti, kot npr. izredna časovna in temperaturna odvisnost ter nespecifičnost ninhidrinske reakcije, saj z reagentom ne reagira samo aminokislina prolin, temveč tudi

druge aminokisliline. Zato pri vseh vzorcih dobimo višje vrednosti prolina v primerjavi s HPLC metodo.

Na podlagi statistične analize smo ugotovili, da je splošna zveza med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolinom, analiziranim s HPLC postopkom, statistično značilna pri 0,01 stopnji tveganja, ta zveza je zmerna ($r = 0,466$). Za prolin, merjen s spektrofotometrično metodo, je zveza z vsebnostjo skupnih beljakovin pokazala statistično značilnost pri 0,01 stopnji tveganja, ta zveza je močna (0,707). Pri primerjavi skupnih aminokislin z vsebnostjo beljakovin je bila splošna zveza statistično značilna pri 0,01 stopnji tveganja, ta zveza je zmerna ($r = 0,404$).

Z analizo variance (ANOVA) in nadaljnjim Duncanovim testom smo preverili, kako se vsebnost aminokislin razlikuje med petimi vrstami analiziranih vzorcev medu. Ugotovili smo, da je ob izpolnjenih predpogojih (homogena porazdelitev varianc), takih parametrov 9. Rezultati Duncanovega testa ($p < 0,05$) so predstavljeni v preglednici 19. Vrste medu, ki se v določenem parametru oziroma povprečni vsebnosti aminokisliline statistično značilno razlikujejo, so označene z drugo črko.

Glede na rezultate vsebnosti prolina, dobljene s spektrofotometrično metodo, se vrste medu delijo v štiri skupine. Statistično značilno najmanj prolina vsebuje akacijev med, ki se v tem parametru tudi razlikuje od cvetličnega, gozdnega in kostanjevega medu. Slednji vsebuje največ omenjene aminokisliline, določene spektrofotometrično, in se statistično značilno razlikuje od ostalih štirih vrst medu (preglednica 19).

Glede na rezultate statistične obdelave vsebnosti prolina, določenega z metodo HPLC, se vrste medu delijo le v tri skupine. V prvi je še vedno akacijev med, ki se v tem parametru ne razlikuje od lipovega, v tretji (s povprečno največjo vsebnostjo prolina) pa so cvetlični, gozdni in kostanjev med. Statistično značilne razlike v povprečni vsebnosti prolina, določenega z metodo HPLC, obstajajo tako le med akacijevim ter kostanjevim, gozdnim in cvetličnim medom, ter med lipovim in kostanjevim, oziroma gozdnim medom (preglednica 19).

Preglednica 19: Rezultati Duncanovega testa

Vrsta medu parameter	Akacijev	Cvetlični	Lipov	Kostanjev	Gozdni
prolin SPF	a*	b, c	a, b	d	c
prolin	a	b, c	a, b	c	c
asparaginska k.	c	a, b	a	b	b, c
asparagin	b	b	b	a	b
histidin	a, b	a, b	b	a	a, b
alanin	a, b	b	b	a	a, b
valin	a	b	a, b	b	b
alo-izolevcin	a	c	a, b	a, b	b, c
lizin	c	b	a, b	a	a

* Vrste medu, ki se v določenem parametru oziroma povprečni vsebnosti aminokisliline statistično značilno razlikujejo, so označene z drugo črko

Podobno ugotavljamo za asparaginsko kislino. Statistična obdelava podatkov je pokazala, da se glede na njeno vsebnost vrste medu delijo v tri skupine. V prvi vrsti je z najmanjšo vsebnostjo lipov med, ki se statistično razlikuje od kostanjevega, gozdnega in akacijevega medu, ne pa tudi od cvetličnega medu. Pri aminokislini asparagin sta le dva razreda, vendar ima velik pomen saj ima kostanjev med statistično značilno najnižjo vsebnost asparaginske kisline, ki ga loči od ostalih treh vrst medu. Tudi glede na vsebnost histidina se medovi delijo le v dva razreda. Tu se statistično razlikujeta kostanjev med, z manjšo vsebnostjo histidina, od lipovega medu. Glede na vsebnost aminokisline alanina lahko na podlagi statistične obdelave razlikujemo med kostanjevim z najmanjšo vsebnostjo in cvetličnim ali lipovim medom. Vsebnosti valina se v akacijevem medu razlikuje od ostalih vrst, razen od lipovega. Medtem ko ima akacijev med najmanjšo vsebnost alo-izolevcina in se statistično razlikuje od cvetličnega z največjo vsebnostjo, pa je v akacijevem medu največ lizina in se glede na vsebnost te aminokisline statistično razlikuje od ostalih vrst medu.

5.1.2 Primerjava naših rezultatov z domačo in tujo literaturo

Rezultate vsebnosti prolina, merjene s spektrofotometrično metodo, smo primerjali z rezultati diplomske naloge Golob (2006), (preglednica 120).

Preglednica 20: Primerjava vsebnosti prolina (mg/kg) v petih vrstah medu, s spektrofotometrično metodo (prolin SPF), med našimi meritvami in meritvami Golob, 2006

Metoda		Prolin SPF \bar{x} (mg/kg)		Prolin SPF \bar{x} (mg/kg)
meritev	naše meritve n	naše meritve	Golob (2006) n	Golob (2006)
vrsta medu				
akacijev	16	345	15	307
cvetlični	18	550	15	432
gozdni	20	606	14	401
kostanjev	18	797	12	617
lipov	16	432	15	300

Vsebnost prolina je bila v raziskavi Golobove iz leta 2006 v razponu od 197 mg/kg do 776 mg/kg. Povprečno je največ prolina vseboval kostanjev med (617 mg/kg), najmanj pa lipov med (300 mg/kg). V naši raziskavi smo najmanjšo povprečno vsebnost prolina določili v akacijevem medu (345 mg/kg), Golobova (2006) pa je na kg akacijevega medu določila povprečno 307 mg prolina. Ugotavljamo, da smo v naši raziskavi za vse vrste medu določili večje vsebnosti prolina, kot jih navaja Golobova (2006). Če izhajamo iz stališča, da je poznavanje vsebnosti prolina dober parameter kakovosti, lahko sklepamo, da so bili naši vzorci, letnikov 2007, 2008 in 2010, boljše kakovosti od navedenih medov letnika 2006.

Prav tako smo rezultate vsebnosti skupnih beljakovin primerjali z rezultati diplomske naloge Golob (2006) (Preglednica 21).

Preglednica 21: Primerjava vsebnosti skupnih beljakovin (g/100 g), v petih vrstah medu, s Kjeldalovo metodo, med našimi meritvami in meritvami Golob, 2006

meritev vrsta medu	Vsebnost skupnih beljakovin (g/100 g)			
	naše meritve n	naše meritve	Golob (2006) n	Golob (2006)
akacijev	12	0,14	15	0,16
cvetlični	16	0,31	15	0,31
gozdni	16	0,39	14	0,30
kostanjev	16	0,40	12	0,35
lipov	15	0,21	15	0,17

Ugotavljamo, da so bile povprečne vsebnosti skupnih beljakovin v obeh raziskavah najmanjše v akacijevem medu in nato v lipovem. Golobova je nato v naraščajočem zaporedju določila vsebnosti skupnih beljakovin v gozdnem, cvetličnem in največjo vsebnost v kostanjevem medu. V naši raziskavi smo prav tako določili največjo vsebnost v kostanjevem medu, nekoliko manjšo v gozdnem in cvetličnem. Vsebnosti beljakovin obeh raziskav, 2006 in 2010, sta si zelo podobni tako, da lahko sklepamo, da vsebujejo gozdni, kostanjev in cvetlični med več skupnih beljakovin kot npr. akacijev in lipov med.

Naših rezultatov za aminokislinsko sestavo medu ne moremo primerjati s predhodnimi podatki, saj podobna analiza slovenskih vrst medu doslej še ni bila narejena. V literaturi pa zasledimo večinoma podatke o vsebnosti aminokislin, ki se nanašajo na med iz oddaljenih geografskih področij, nam tujega botaničnega porekla. Zato smo naše rezultate za aminokislinsko sestavo primerjali z rezultati Bernal in sod., 2005, saj smo pri našem delu uporabili isto, le nekoliko modificirano metodo (Bernal in sod., 2005).

Preglednica 22: Primerjava vsebnosti aminokislinske sestave (HPLC) in prolina s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) v različnih vrstah medu, med našimi meritvami in meritvami Bernal in sod., 2005

	Naše meritve	Bernal in sod., 2005
vrsta medu	akacijev, lipov, kostanjev, cvetlični in gozdni med	sivkin, timijanov, manin, gozdni, rožmarinov in cvetlični med
aminokislina	min –max interval (mg/kg)	min –max interval (mg/kg)
asparaginska kislina	3 - 48	4 - 126
glutaminska kislina	9 - 288	10 - 138
asparagin	5 - 138	4 - 126
serin	9 - 75	7 - 46
arginin	4 - 80	x
glutamin	5 - 425	10 - 91
histidin	0 - 88	10 - 24
glicin	1 - 31	5 - 19
treonin	4 - 92	6 - 25
alanin	21 - 236	7 - 68
prolin	102 - 857	265 - 893
tirozin	6 - 138	26 - 215
valin	5 - 40	5 - 27
metionin	0 - 57	x
cistein	0 - 63	x
Alo -izolevcin	0 - 25	x
izolevcin	0 - 31	7 - 16
levcin	0 - 54	3 - 9
triptofan	0 - 6	x
fenilalanin	20 - 1051	115 - 611
lizin	4 - 64	23 - 13
Σak	341 - 2182	1114 - 1766
prolin SPF	193 - 1095	310 - 1084

Po primerjavi našega dela z Bernal in sod., opazimo v naših rezultatih vsebnosti aminokislinske sestave in Proin SPF (min – max vsebnost (mg/kg)):

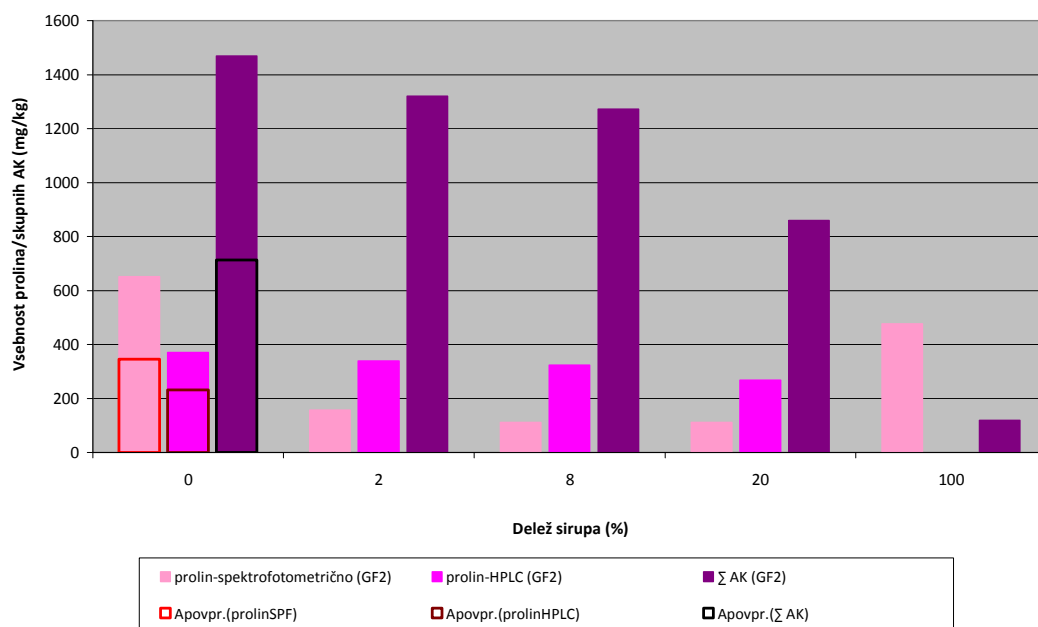
- večjo vsebnost glutaminske kisline, glutamina, serina, asparagina, alanina, levcina, valina, treonina, izolevcina, in lizina,
- manjšo vsebnost asparaginske kisline in tirozina,
- aminokislina, ki jih Bernal in sodelavci niso uspeli kvantificirati so arginin, glicin, metionin, alo-izolevcin, cistein in triptogfan (smo mi uspeli kvantificirati le v akacijevem medu letnika 2010),
- večjo maksimalno vsebnost skupnih aminokislin, vendar manjšo minimalno vsebnost.,
- vsebnosti prolina, dobljene tako s spektrofotometrično kot s HPLC metodo in vsebnosti, ki jih navaja Bernal in sod., so primerljive vendar tudi tu so naše minimalne vsebnosti manjše.

Odstopanja aminokislinske sestave lahko pripisujemo, kot smo že omenili, predvsem botaničnemu in geografskemu poreklu medu. Iz dobljene primerjave pa tudi

predvidevamo, da so ta odstopanja lahko posledica letnikov medu (v našem primeru 2007, 2008 in 2010), Bernal in sod., pa letnika ne navajajo. Razlike so lahko tudi zaradi pogojev hranjenja vzorcev, saj so jih do analize hranili v hladilniku, mi pa pri sobni temperaturi.

5.1.3 Vpliv dodatka sirupa na merjene parametre v vzorcih medu

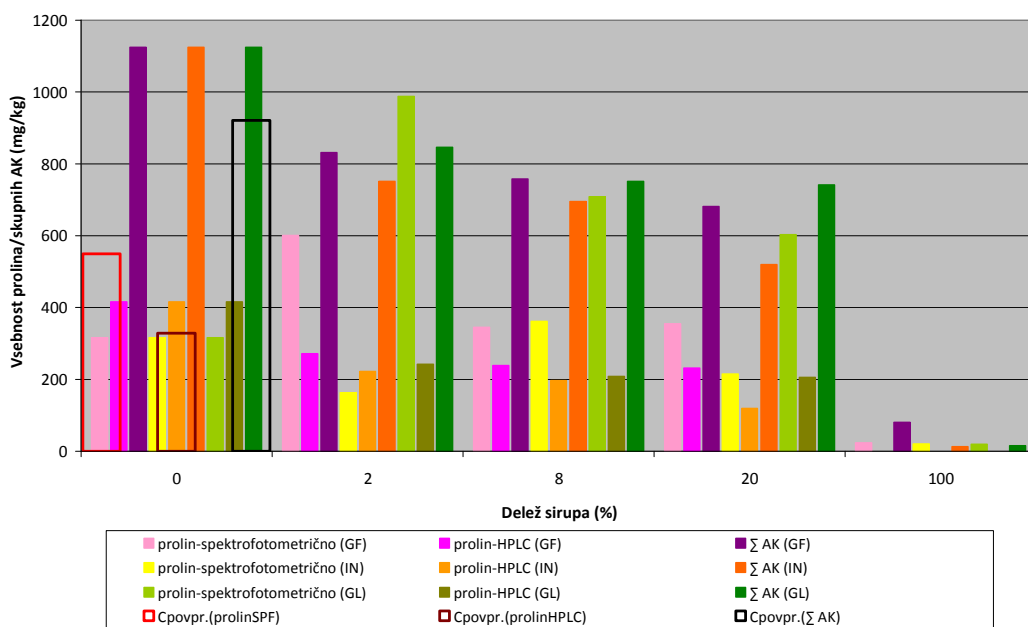
Vpliv vrste in količine dodanega sirupa trem vrstam medu smo proučevali na treh merjenih parametrih in sicer na vsebnosti prolina, določenega spektrofotometrično in z metodo HPLC ter na vsoti vsebnosti aminokislin. Na slikah 8, 9, 10 predstavljamo rezultate v obliki stolpičnih diagramov. Na osi x je naveden delež dodanega sirupa. 0 pomeni, da so na stolpcih predstavljeni povprečni rezultati vzorca pristnega akacijevega, cvetličnega oziroma gozdnega medu. S polnimi stolpci so označeni povprečni rezultati analiz originalnega in potvorjenih serij medu. Okvirji predstavljajo povprečne vrednosti izbranih treh parametrov v pristnih vzorcih letnika 2010 akacijevega, cvetličnega oziroma gozdnega medu.



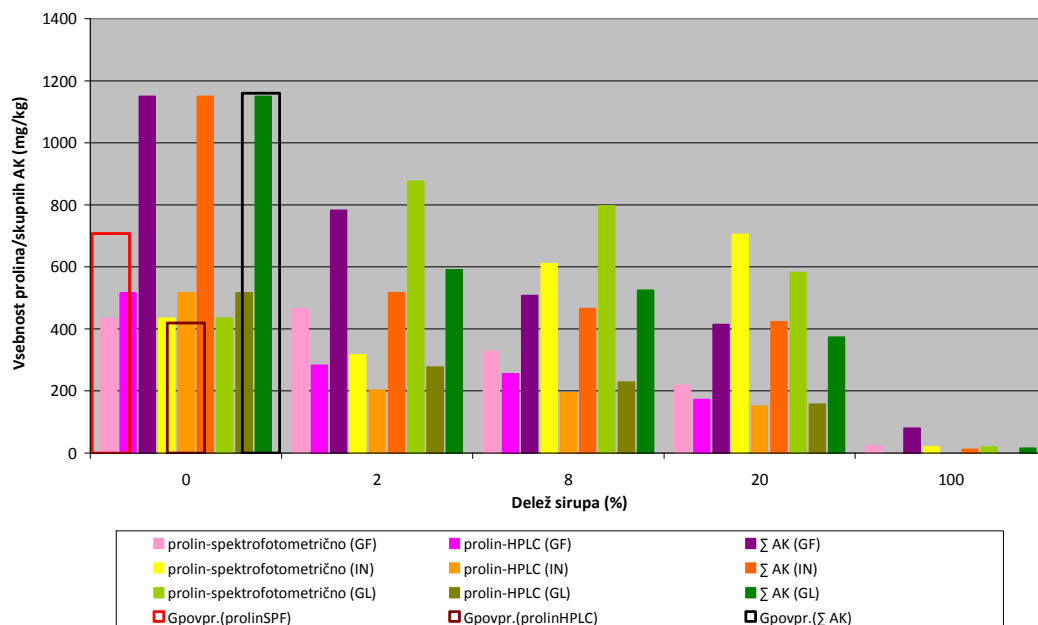
Slika 8: Vsebnost prolina določena s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in skupnih aminokislin (HPLC) v vzorcih akacijevega medu letnika 2010, potvorjena z različnimi deleži sirupa GF2

Na podlagi dobljenih rezultatov za vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo ne moremo ovrednotiti deležev dodanega sirupa pristnemu medu, saj je sam sirup pokazal skoraj enako vrednost kot pristen med. Medtem ko pri določevanju aminokislina prolina z metodo HPLC ugotovimo, da se je njegova vsebnost z dodatkom sirupa zmanjševala in v čistem sirupu prolina sploh nismo zaznali. Tudi na podlagi določevanja vsebnosti skupnih aminokislin je, iz slike 8, razvidno, da se njihova vsebnost glede na večji delež sirupa linearno zmanjšuje.

V cvetlični in gozdni med smo vmešali tri različne vrste sirupov, saj nas je zanimal tudi vpliv vrste sirupa na obravnavane parametre v medu (sliki 9 in 10).



Slika 9: Vsebnost prolina določena s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in skupnih aminokislin (HPLC) v vzorcih letnika 2010 cvetličnega medu potvorjena z različnimi deleži sirupa GF, IN, GL



Slika 10: Vsebnost prolina določena s spektrofotometrično metodo (prolin SPF) in skupnih aminokislin (HPLC) v vzorcih letnika 2010 gozdnega medu potvorjena z različnimi deleži sirupa GF, IN, GL

Na podlagi rezultatov analiz gozdnega in cvetličnega medu z dodatki sirupov (GF, IN in GL) (sliki 9 in 10), smo ugotovili, da je metoda HPLC primernejša od spektrofotometrične

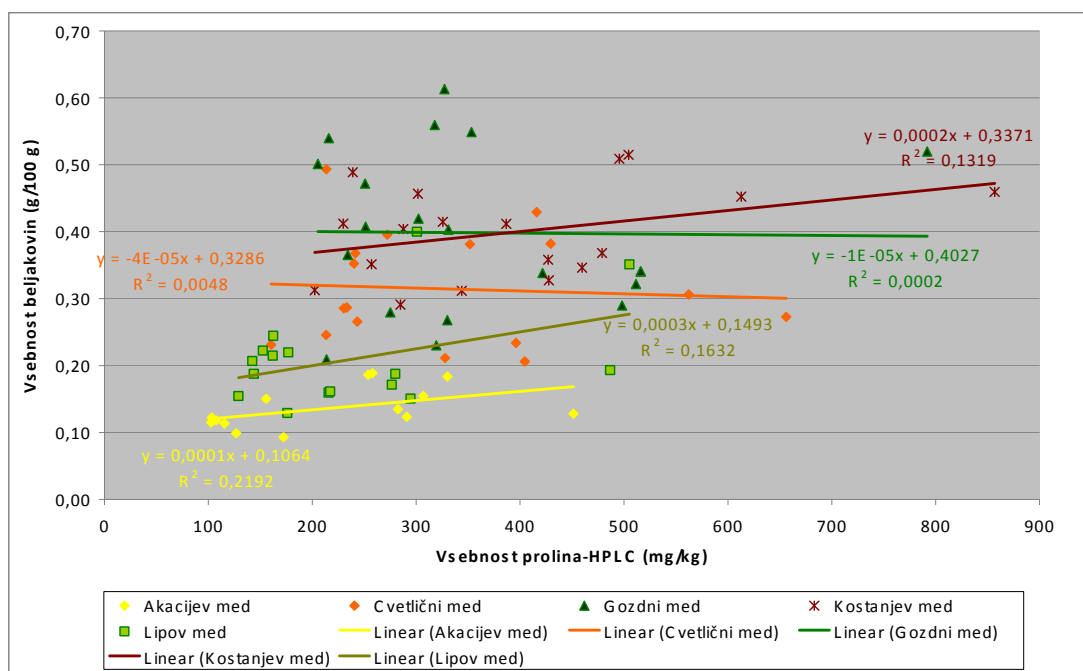
metode, saj opazimo, da se je pri vseh treh dodanih sirupih vsebnost prolina oziroma skupna vsebnost aminokislin z večanjem dodatka različnih sirupov zmanjševala.

5.1.4 Regresijska analiza preiskovanih parametrov

Ena izmed hipotez je bila, da obstaja značilna zveza med vsebnostjo aminokislin, skupnih beljakovin in botaničnim poreklom medu. Zato smo zveze med njimi proučevali z regresijsko analizo.

Slika 11 prikazuje z regresijsko analizo izračunane zveze med vsebnostjo prolina, dobljeno s HPLC metodo in vsebnostjo skupnih beljakovin po posameznih vrstah medu. Za določitev petih vrstno značilnih zvez smo uporabili povprečne vrednosti paralelnih določitev prolina in skupnih beljakovin. V nadaljevanju so za posamezne vrste medu prikazane zveze med vsebnostjo prolina s spektrofotometrično metodo in vsebnostjo beljakovin (slika 12), zveze med vsebnostjo prolina s spektrofotometrično metodo in skupno vsebnostjo aminokislin (slika 13), zveze med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s HPLC metodo (slika 14) in zveze med vsebnostjo beljakovin in skupno vsebnostjo aminokislin (slika 15).

5.1.4.1 Zveza med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina analiziranega s HPLC metodo

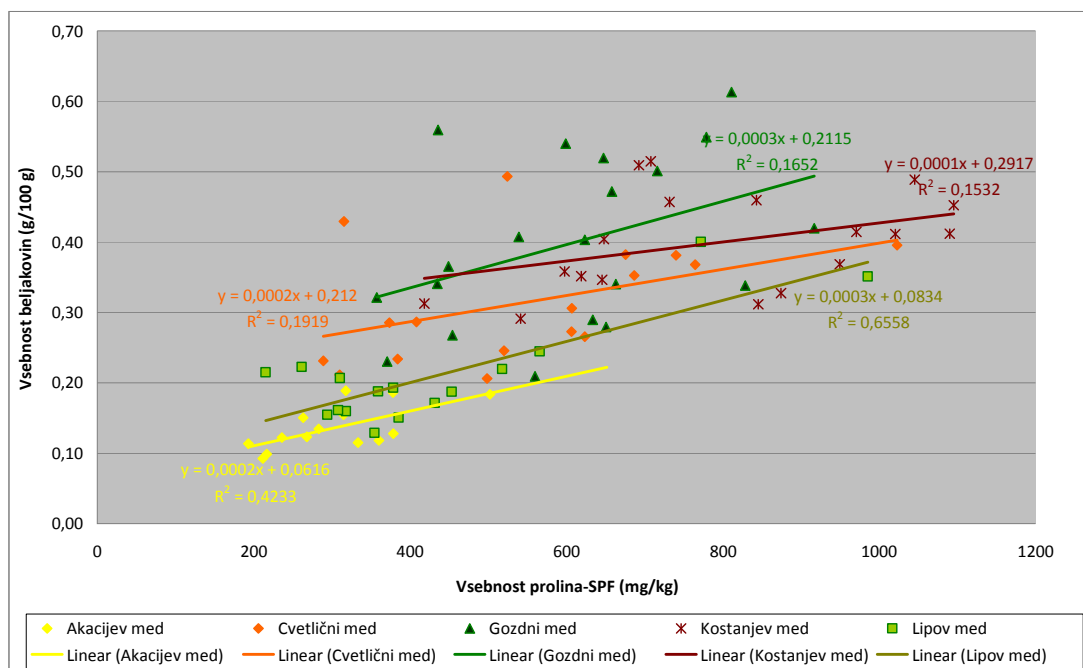


Slika 11: Zveze med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina z metodo HPLC za posamezne vrste medu

Pri proučevanju odvisnosti vsebnosti beljakovin od vsebnosti prolina smo ugotovili, da je odvisnost med tema dvema parametroma statistično neznačilna. V primeru spektrofotometrično določenega prolina odvisnost obstaja pri lipovem in akacijevem medu

(slika 12) medtem ko v primeru prolina določenega z metodo HPLC odvisnosti ni v nobeni vrsti medu (slika 11).

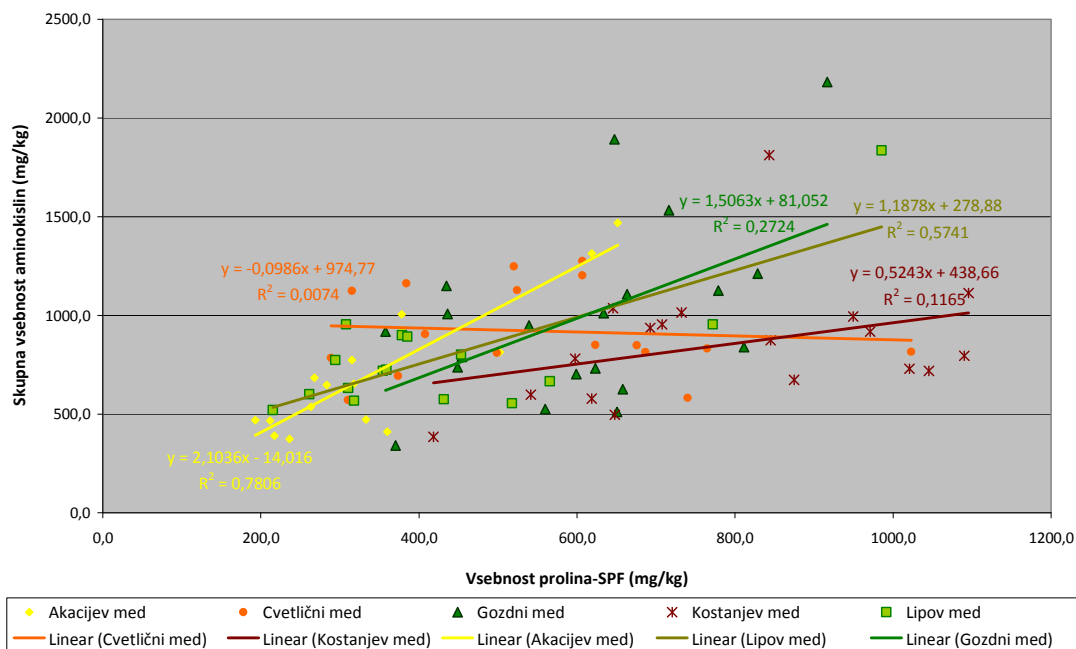
5.1.4.2 Zveza med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina analiziranega s SPF metodo



Slika 12: Zveze med vsebnostjo beljakovin in vsebnostjo prolina s spektrofotometrično metodo, za posamezne vrste medu

V naši raziskavi smo ugotovili, da pri določitvi vsebnosti prolina s spektrofotometrično metodo, dobimo previsok rezultat, ker reagirajo z ninhidrinom tudi druge spojine, težko govorimo o zvezi med vsebnostjo prolina in vsebnostjo skupnih beljakovin.

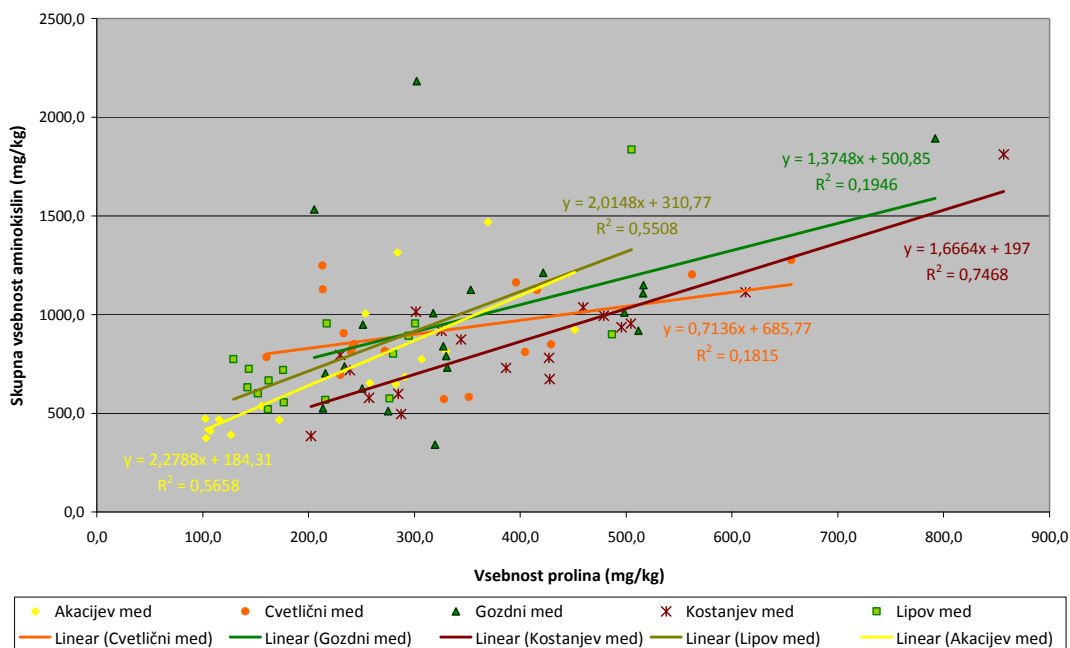
5.1.4.3 Zveza med vsebnostjo skupnih aminokislin in vsebnostjo prolina analiziranega s SPF metodo



Slika 13: Zveze med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s spektrofotometrično metodo za posamezne vrste medu

Slika 13 prikazuje regresijsko analizo za vsebnost prolina, ki smo ga določili spektrofotometrično in skupne vsebnosti aminokislin, ki smo jih določili s HPLC metodo. Vidimo, da obstaja linearna zveza pri akacijevem in lipovem medu - enako, kot smo dobili zvezo med vsebnostjo prolina SPF in vsebnostjo beljakovin (slika 12). S tem samo še potrdimo našo ugotovitev o neustreznosti spektrofotometrične metode.

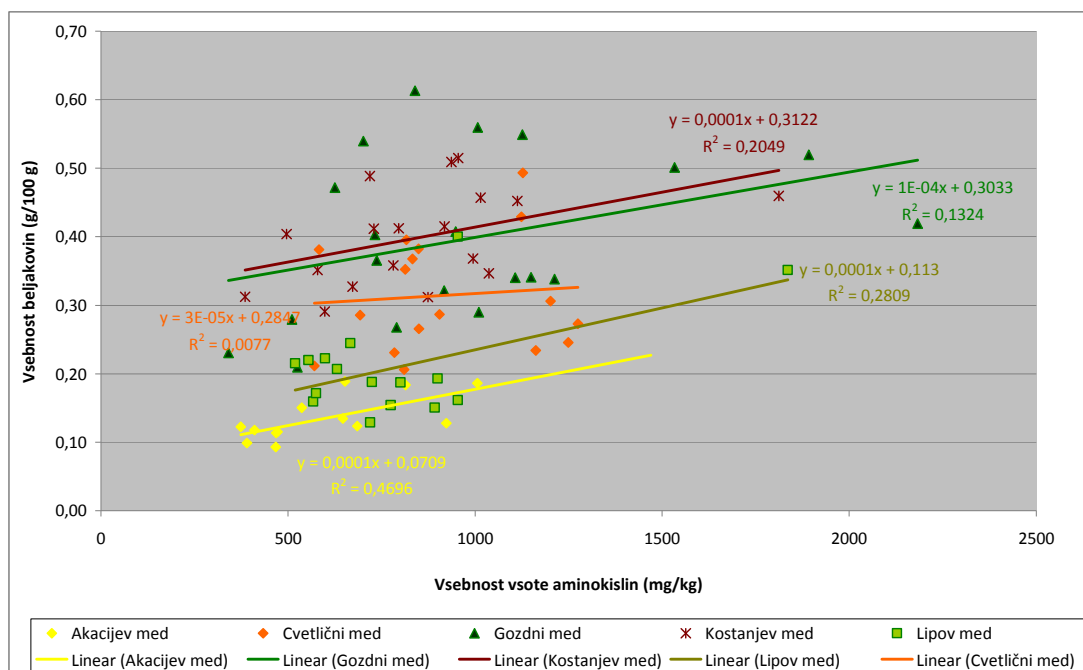
5.1.4.4 Zveza med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s HPLC metodo



Slika 14: Zveze med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s HPLC metodo za posamezne vrste medu

Za tri vrste medu: gozdni, kostanjev in akacijev smo ugotovili, da obstaja statistično značilna odvisnost med vsoto vseh analiziranih aminokislin in vsebnostjo prolina določenega s HPLC metodo (slika 14). S tem potrdimo, da je za določanje aminokislinskega profila primernejša HPLC metoda, ker pripomore k boljši karakterizaciji medu.

5.1.4.5 Zveza med skupno vsebnostjo beljakovin in vsoto aminokislin s HPLC metodo



Slika 15: Zveze med vsebnostjo beljakovin in skupno vsebnostjo aminokislin za posamezne vrste medu

Pri zvezi med vsebnostjo beljakovin in skupno vsebnostjo aminokislin za posamezne vrste medu vidimo, da obstaja linearna zveza samo za akacijev med (slika 15). Vsebnost skupnih beljakovin je zelo variabilen parameter in ga težko povezujemo z vrsto medu. V vsebnosti skupnih beljakovin so poleg aminokislin zajete tudi druge komponente: encimi, peptidi, vitamini ter druge organske snovi, ki imajo v svoji strukturi vključen dušik. Menimo, da je metoda za določanje skupnih beljakovin pre malo občutljiva za določanje vsebnosti beljakovin v vzorcih medu, saj je vsota aminokislin v medu majhna in zato je primernejša občutljivejša HPLC metoda. Rezultati o vsebnosti skupnih aminokislin pripomorejo k boljši karakterizaciji medu, prav tako so uporabni regresijski modeli, ki opisujejo zvezo med skupno vsebnostjo aminokislin in vsebnostjo prolina s HPLC metodo za posamezne vrste medu (slika 14).

5.2 SKLEPI

Na podlagi opravljenih fizikalnokemijskih analiz medu in statistične obdelave rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepe:

Glavni validacijski parametri HPLC metode:

- linearnost $R^2 > 0,991$,
- ponovljivost injiciranja RSD: 0,06 % – 1,89 %,
- dnevna ponovljivost RSD: 0,2 % – 10,0 %,
- meddnevna ponovljivost RSD: 0,7 % – 14,2 %,
- izkoristek za aminokislino prolin je med 82,3 % – 98,7 %.

Z metodo HPLC in uporabo dimetil klorformatnega reagenta (DEMM) zagotovimo pogoje za aminokislinsko ločbo z visoko stopnjo občutljivosti.

Analizirani parametri v vzorcih različnih vrst medu:

- vsebnost beljakovin je od 1364 mg/kg v akacijevem do 3995 mg/kg v kostanjevem medu,
- skupna vsebnost aminokislin je od 713 mg/kg v akacijevem do 995 mg/kg v gozdnem medu,
- med aminokislinami je v medu najbolj zastopan prolin, ki smo ga določili:
 - o s HPLC metodo od 232 mg/kg v akacijevem do 396 mg/kg v kostanjevem medu,
 - o s spektrofotometrično metodo od 346 mg/kg (akacijev) do 797 mg/kg (kostanjev med),
- vsebnost prolina v analiziranih vzorcih je večja kot v vzorcih slovenskega medu v raziskavi iz leta 2006 (Golob).
- vsebnost prolina in skupnih aminokislin v potvorjenem medu se zmanjšuje z naraščanjem deleža dodanega sirupa.

Statistične ugotovitve:

- Analizirane vrste medu so se statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovale v vsebnosti osmih aminokislin: prolina, asparaginske kisline, asparagina, histidina, alanina, valina, alo-izolevcina in lizina.
- Regresijski model, ki opisuje zvezo med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolina, določenega spektrofotometrično je statistično značilen in močen v primeru lipovega medu ($r = 0,81$) ter zmerno močen v primeru akacijevega medu ($r = 0,65$).
- Regresijski model, ki opisuje zvezo med vsebnostjo skupnih beljakovin in prolinom, določenim z metodo HPLC, je statistično značilen pri akacijevem ($r = 0,47$), lipovem ($r = 0,404$) in kostanjevem medu ($r = 0,36$), zveze so zmerne oziroma šibke.
- Med vrednostmi prolina določenega spektrofotometrično in prolinom določenim z metodo HPLC je zmerna korelacija ($r = 0,433$, $p < 0,01$).

6 POVZETEK

Med je ena redkih snovi, ki ga ni mogoče umetno proizvesti, ampak ga čebele nabirajo in odlagajo v satje, kjer se odvijajo čudežni fizikalno kemijski procesi. Med je naravna sladka snov, ki ga izdelajo čebele *Apis mellifera*, iz nektarja cvetov ali izločkov iz živih delov rastlin ali izločkov na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, ga shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju. Med je živilo živalskega izvora.

Osnovni namen diplomske naloge je bil kvantificirati 21 aminokislin v medu, z metodo HPLC in metodo validirati z osnovnimi parametri validacije. Pred validacijo smo določili optimalne pogoje za kromatografsko ločbo aminokislin. Metodo HPLC smo optimizirali in zagotovili optimalne pogoje ločbe ter validirali postopek. Tako smo dosegli, da na mestu elucije, 21 aminokislin, ni bilo spojin, ki bi motile določanje vsebnosti posameznih (21) aminokislin. Dosegli smo rezultate za 21 aminokislin, ki ustrezajo kriterijem za natančen in stabilen HPLC sistem: ponovljivost injiciranja (RSD = 0,06 – 1,89 %), pokrivanje standardov (0,2 – 2,0 %), število teoretičnih podov ($N \geq 4630$), ločljivost (0,46 – 21,0), faktor popačenja (0,76 - 0,91), dnevno (RSD = 0,2 – 10,0 %) in meddnevno ponovljivost (RSD = 0,7 – 14,2 %), mejo detekcije (0,6 – 3,8 %), mejo kvantifikacije (1,2 – 8,8 %), točnost metode glede na prolin (izkoristek 92,2 %) in linearnost za posamezne aminokislone ($R^2 > 0,991$).

Primerjalno smo določali vsebnost aminokislone prolina tudi z uradno priznano spektrofotometrično Oughovo metodo, modificirano po Bogdanovu in vsebnost skupnih beljakovin v medu z uporabo delno avtomatizirane Kjeldahlove metode.

Analizirali smo skupno 113 vzorcev medu, petih različnih vrst: akacijevega, lipovega, kostanjevega, cvetličnega in gozdnega medu. Vzorci so bili letnikov 2007, 2008 in 2010 in so izvirali iz različnih regij Slovenije. Da bi dokazali, da se z večanjem deleža sirupa zmanjšuje delež aminokislin smo namerno potvorili 25 vzorcev tako, da smo medu dodali različne deleže sladkornih sirupov.

Z metodo HPLC je v povprečju največ aminokislin vseboval gozdni med (995 mg/kg), nato cvetlični (921 mg/kg) in šele na tretjem mestu kostanjev med (856 mg/kg). Najmanj skupnih aminokislin je pričakovano vseboval akacijev med (713 mg/kg).

Največjo vsebnost prolina s spektrofotometrično metodo smo določili v vzorcih kostanjevega medu (797 mg/kg), najmanjšo pa v akacijevem medu (346 mg/kg).

Povprečne vrednosti prolina analizirane s spektrofotometrično metodo ter skupne beljakovine so primerljive s slovenskimi podatki drugih raziskav.

Povprečna vsebnost skupnih beljakovin ni povsem sledila seštevku aminokislin. Največ skupnih beljakovin smo določili v kostanjevem medu (3995 mg/kg) in le nekoliko manj v gozdnem medu (3983 mg/kg), približno 2/3 manj pa v akacijevem medu (1364 mg/kg).

Na podlagi določevanja vsebnosti skupnih aminokislin vidimo, da se njihova vsebnost glede na večji delež sirupa linearno zmanjšuje.

Z meritvami in s statistično obdelavo rezultatov opravljenih analiz, smo prišli do zanimivih in uporabnih rezultatov. Smiselno bi bilo opraviti še več meritev na večjem številu vzorcev (za začetek morda samo ene vrste medu), na vzorcih različnih letnikov, na vzorcih hranjenih pri različnih temperaturah.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Alaiz M., Navarro J.L., Gir J., Vioque E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography A*, 591:181-186
- Anklam E. 1998. A review of analytical methods to determinate the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 3:549-562
- Bernal J.L., Nozal M. J., Toribio L., Diego J. C., Ruiz A. 2005. A comparative study of several HPLC methods for determining amino acids profiles in honey. *Journal of Separation Science*, 28: 1039-1047
- Bogdanov S., Martin P., Lulleman C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, 28, Suppl. 1: S3-559
- Bogdanov S. 1999. Honey quality and international regulatory standards review by the International Honey Commission. *Bee World*, 80: 61-69
- Bogdanov S., Martin P. 2002. Honey authenticity. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93: 232-254
- Bogdanov S., Ruoff K., Persano Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, Suppl.1: S4-S17
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. 1. izd. Ljubljana, Študentska založba: 70-90
- Bouseta A., Scheirman V., Collin S. 1996. Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *Journal of Agricultural and Food Science*, 61, 4: 683-687
- Božič J. 2008. Čebelje paše. V: *Med: Značilnosti slovenskega medu*. Kandolf A. (ur.). Lukovica, Čebelarstva zveza Slovenije: 19-22
- Božnar A., Senegačnik J. 1998. *Med. V: Od čebele do medu*. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 376-413
- Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 5-17
- Božnar A. 2003. Mikrobiologija medu. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 582-586
- Büchi Labortechnik AG. 2004. Total nitrogen determination according to Kjeldahl with the Büchi Kjeldahl line. Application no.: 3XX001EN version B. Flowil,

Büchi Labortechnik: 7 str.

- Cometto P.M., Faye P.F., Naranjo R.D.D.P., Rubio M.R., Aldao M.A.J.J. 2003. Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5079-5087
- Conte L. S., Miorini M., Giomo A., Bertacco G., Zironi R. 1998. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1844-1849
- Corbella E., Cozzolino D. 2008. Combining multivariate analysis and pollen count to classify honey samples accordingly to different botanical origins. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68: 102-107
- Cordella C. B. Y, Militao J. S. L. T, Clement M-C., Cabrol-Bass D. 2003. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. Honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3234-3242
- Cotte J. F., Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Grenier-Loustalot M. F. 2004. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 1342-1350
- Concil Directive 2001/110/ EC of 20 december 2001 relating to honey. 2002. Official Journal of European Union, L10, 12: 47-52
- Čeh B., Dolenc D. 2010. Snovi, okolje, prehrana. Učbenik za kemijo v srednjih in strokovnih šolah. 1.izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 155-156
- Davies A. M. C. 1975. Amino acids analysis of honeys from eleven countries. *Journal of Apicultural Research*, 14: 29-39
- Davies A. M. C. 1976. The application of amino acid analysis to the determination of the geographical origin of honey. *Journal of Food Technology*, 11: 515-523.
- Doner L.W. 2003. Honey. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 5. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C, Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3125-3130
- Echigo T., Takenaka T., Ichimura M. 1973. Effects of chemical constituents in pollen on the process of honey formation. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University*, 13: 1-9
- Echigo T., Takenaka T., Yastsunami K. 1986. Comparative studies on chemical composition on honey, royal jelly and pollen loads. *Bulletin of Faculty of Agriculture*, 26: 1-12

- EMA. 1995. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology step 5 note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95). London, EMA - European Medicines Agency: 1-15
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf (oktober 2010)
- European Pharmacopoeia 6.0. 2008. vol 1. 6th ed. Strasbourg, EDQM Council of Europe: 148-141
- Gilbert J., Shephard M. J., Wallwork M. A., Harris R. G. 1981. Determination of the geographical origin of honeys by multivariate analysis of gas chromatographic data on their free amino acid content. *Journal of Apicultural Research*, 20: 125–135
- Golob U. 2006. Vsebnost prolina in beljakovin v različnih vrstah slovenskega medu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 94 str.
- Golob T., Jamnik M., Kropf U., Bertonec J., Kandolf A. 2008. Lastnosti medu. V: *Med: Značilnosti slovenskega medu*. Kandolf A. (ur.). Lukovica, Čebelarstva zveza Slovenije: 25-32
- Golob T., Plestenjak A. 2000. *Analiza kakovosti živil*. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 96-98
- González-Paramas A.M.J., Gómez-Barral A., Cordero C.M., García-Villanova R. J., Sánchez S. J. 2006. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, 95: 148–156
- Hermosin I., Chicon R.M., Cabezas D.M. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83: 263-268
- Iglesias M. T., Lorenzo C., Polo M.C., Alvarez P. J. M., Pueyo E. 2004. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 84-89
- Javornik F., Kastelic L., Kranjc A., Mihelčič J., Senegačnik E., Senegačnik J., Vidmar U. 1982. *Čebelarstvo*. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 212-223
- Javornik F., Kastelic L., Mihelčič J., Senegačnik J., Vidmar U. 1984. *Čebelarstvo*. Ponatis. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 310-315
- Košmelj K. 2001. *Uporabna statistika*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 239 str.
- Košmelj K., Kastelec D. 2003. *Uporabna biostatistika. Načrtovanje in analiza poskusov: Delovno gradivo za podiplomski študij*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška

fakulteta, : 108 str

- Košmelj B., Arh F., Urbanc D., Ferligoj A., Omladič M. 2002. Statistični terminološki slovar. Razširjena izdaja z dodanim slovarjem ustreznikov v angleščini. 1. izd. Ljubljana, Študentska založba: 15-54
- Krauze A., Zalewski R. I. 1991. Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 192: 19-23
- Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D. 1998. Laboratorijske vaje iz kemije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 250-251
- Kmecl V. 2006. Kakovost slovenskega medu. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 27str.
- Lutier P. M., Vaissie`re B. E. 1993. An improved method for pollen analysis of honey. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 78: 129-144
- Mayer V.R. 1988. *Practical high – performance liquid chromatography* . 2^{ed}. Chichester, John Wiley & Sons: 17-45
- Megherbi M., Herbeteau B., Fauer R., Salvador. 2009. Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2105–2111
- Meda A., Euloge L. C., Romito M., Millogo J., Nacoulma G. O., 2005. Determination of total phenolic, flavonoid and proline content in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571-577
- Mohammed S.E.A.R.M, Babiker E.E. 2010. Identification of the floral origin of honey by amino acids composition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 552-556
- Morales V., Corzo N., Sanz M.L. 2008. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chemistry*, 107: 922-928
- Nozal M. J., Bernal J.L., Toribio M.L., Diego J.C., Ruiz A. 2004. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1047 : 137–146
- Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio L., Alamo M., Diego J. C. 2005. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3095-3100

- Owusu-Apenten R. 2005. Introduction to food chemistry. 1st ed. Boca Raton, CRC PRESS: 81-102
- Perez R. A., Iglesias M.T., Pueyo E., Gonzalez M., Lorenzo C. 2007. Amino acid composition and antioxidant capacity of spanish honeys. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 360- 365
- Plestenjak A. 1999. Fizikalno – kemijske lastnosti medu, zakonodaja, vzorčenje. V: Pridelava in kontrola medu. Golob T. (ur.). Ljubljana, Čebelarska zveza Slovenije in Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14-17
- Pravilnik o medu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 31: 3611-3614
- Pravilnik o spremembi Pravilnika o medu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 89: 10890-10890
- Rebane R., Herodes K. 2010. A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenmalonate. Application to the honey analysis, Analytica Chimica Acta, 672: 79-84
- Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L. 1997. Practical HPLC method development. 2nd ed. New York, Wiley Interscience: str 686-765
- Vrtačnik M., Zupančič Brouwer N. 2003. Organska kemija. 2 izd. Ljubljana, Tehniška založba slovenije: 232-235
- Von der Ohe W., Dustman J. H., Von der Ohe K. 1991. Prolin als kriterium der riefte des honigs. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 87, 12: 383-385
- White J. W., Doner L. W. 1980. Beekeeping. US Agriculture Handbook, 335: 82 – 91 <http://www.beesource.com/resources/usda/honey-composition-and-properties/> (oktober 2010)
- White J. W. 1978. Honey. Advances in Food Research, 24: 287-374
- White J. 1979. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 62: 509-514
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, Samozaložba: 5-38

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem:

- mentorici prof. dr. Tereziji Golob za njeno vsestransko pomoč, ki sem jo bila deležna pri nastajanju diplomske naloge,
- recezentu doc. dr. Rajku Vidrihu za strokoven in hiter pregled diplomske naloge,
- asistentki Mojci Korošec za vodstvo, strokovno pomoč pri pisanju, čas ki si je ga vzela za podroben pregled moje diplomske naloge in mi pomagala tudi takrat, ko je bila sama prezaposlena s svojim delom. S svojim širokim znanjem je obilno prispevala h končni obliki naloge,
- Javni agenciji RS za zdravila in medicinske pripomočke, ker so mi omogočili izvajanje praktičnega dela diplomske naloge, predvsem, bi se zahvalila vodji sektorja za kontrolo kakovosti zdravil mag. Danieli Planinšek, mag. farm.,spec. in vodji laboratorija mag. Metki Stojčičević, mag.farm, spec., za prijateljski in razumevajoč odnos, Zvonki Žumer, mag. farm.,spec.za znanje, ki mi ga je dala na področju HPLC, hvala tudi vama, Zarika in Miri za moralno podporo pri izvajanju praktičnega dela diplome,
- Lini Burkan dipl.ing. in Ivici Hočevar dipl. ing. za pomoč pri zbiranju in urejanju literature,
- hvala tudi tebi mami, ki me sprejemaš tako kot sem. V vseh mojih vzponih in padcih si verjela vame, me optimistično spodbujala ter mi nesebično pomagala, kot babica si...,
- hvala Tanja, za ljubeč sestrski odnos, za vso spodbudo, podporo in pomoč v času študija,
- ♥ zadnja, a najpomembnejša zahvala gre moji družini , Naji in Tari ter Igorju. Mnogokrat ste v času nastajanja te naloge znali potrpeti in mi stali ob strani. Moji hčerki sta me s svojim smehom in otroško razigranostjo držali pokonci in mi vlivali pozitivno energijo.

Hvala še enkrat vsem, brez vas mi ne bi uspelo!

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maša TOMINEC

**KVANTITATIVNA DOLOČITEV AMINOKISLIN V
MEDU Z METODO HPLC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010