

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA URANIČ (AHAČIČ)

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE POLISAHARIDOV OB  
PRISOTNOSTI MONOSAHARIDOV IN DISAHARIDOV V SIRUPIH**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA URANIČ (AHAČIČ)

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE POLISAHARIDOV OB  
PRISOTNOSTI MONOSAHARIDOV IN DISAHARIDOV V SIRUPIH**

**ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF  
POLYSACCHARIDES IN THE PRESENCE OF MONOSACCHARIDES AND  
DISACCHARIDES IN SYRUPS**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

*Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., za vse posredovano strokovno znanje ter pomoč pri izvedbi diplomske naloge.*

*Za koristne namige, pomoč pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem delovni mentorici Katji Stojilkovski, mag. farm.. Za vso pomoč se prav tako zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.*

*Zahvalila bi se tudi mojima staršema in sestri Mateji, ki so mi tekom študija ves čas pomagali in mi stali ob strani, teti Heleni za lektorsko delo, možu Primožu, ker je verjel vame in me podpiral, ter vsem prijateljem in sošolcem za nepozabna študijska leta.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Ljubljana, junij 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

## **KAZALO VSEBINE**

|   |    |
|---|----|
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>                                     | I  |
| <b>POVZETEK .....</b>   | IV |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | V  |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>                                    | VI |
| <b>1. UVOD .....</b>  | 1  |
| 1.1 OZKOLISTNI TRPOTEC IN GOZDNI SLEZENOVEC .....               | 1  |
| 1.1.1 SPLOŠNO O OZKOLISTNEM TRPOTCU IN GOZDNEM SLEZENOVCU ..... | 1  |
| 1.1.1.1 OZKOLISTNI TRPOTEC .....                                | 1  |
| 1.1.1.2 GOZDNI SLEZENOVEC .....                                 | 1  |
| 1.1.2 BOTANIČNA UVRSTITEV .....                                 | 1  |
| 1.1.2.1 OZKOLISTNI TRPOTEC .....                                | 1  |
| 1.1.2.2 GOZDNI SLEZENOVEC .....                                 | 2  |
| 1.1.3 UPORABA .....   | 2  |
| 1.1.3.1 OZKOLISTNI TRPOTEC .....                                | 2  |
| 1.1.3.2 GOZDNI SLEZENOVEC .....                                 | 2  |
| 1.2 OGLJIKOVI HIDRATI .....                                     | 3  |
| 1.3 POLISAHARIDI .....  | 3  |
| 1.3.1 DELITEV POLISAHARIDOV .....                               | 3  |
| 1.3.2 HETEROGENI POLISAHARIDI IZ VIŠJIH RASTLIN .....           | 4  |
| 1.3.3 POLISAHARIDI IN OSTALE AKTIVNE SPOJINE V DROGAH .....     | 4  |
| 1.3.3.1 OZKOLISTNI TRPOTEC .....                                | 4  |
| 1.3.3.2 GOZDNI SLEZENOVEC .....                                 | 5  |
| 1.3.4 IZOLACIJA POLISAHARIDOV .....                             | 6  |
| 1.3.4.1 FILTRACIJA .....  | 6  |
| 1.3.5 METODE DOLOČANJA POLISAHARIDOV .....                      | 7  |
| 1.3.6 KOLORIMETRIČNE METODE DOLOČANJA SAHARIDOV .....           | 8  |
| 1.3.7 DOLOČANJE SAHARIDOV S FENOLOM IN ŽVEPLOVO KISLINO .....   | 8  |
| 1.3.8 GRAVIMETRIČNO DOLOČANJE POLISAHARIDOV .....               | 9  |
| <b>2. NAMEN DELA .....</b>                                      | 10 |
| <b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>                             | 11 |
| 3.1 MATERIALI .....   | 11 |
| 3.1.1 VZORCI .....  | 11 |
| 3.1.2 REAGENTI .....  | 11 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.1.3   | PRIJAVA RAZTOPINE SAHAROZE V dH <sub>2</sub> O (PLACEBO) .....  | 11 |
| 3.1.4   | PRIJAVA 5 % RAZTOPINE FENOLA V dH <sub>2</sub> O .....  | 11 |
| 3.1.5   | PRIJAVA 80 % EtOH .....   | 11 |
| 3.1.6   | APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA .....  | 12 |
| 3.2     | METODE .....  | 12 |
| 3.2.1   | GRAVIMETRIJA .....  | 13 |
| 3.2.1.1 | <i>OSNOVNI POSTOPEK</i> .....   | 13 |
| 3.2.1.2 | <i>OPTIMIRANI (KONČNI) POSTOPEK</i> .....   | 13 |
| 3.2.2   | KOLORIMETRIČNA ANALIZA .....  | 14 |
| 3.2.2.1 | <i>PREDSTOPNJA</i> .....  | 14 |
| 3.2.2.2 | <i>KVANTITATIVNA DOLOČITEV POLISAHARIDOV V VZORCU</i> .....   | 16 |
| 4.      | REZULTATI IN RAZPRAVA .....   | 18 |
| 4.1     | GRAVIMETRIJA .....  | 18 |
| 4.1.1   | <i>I.</i> <i>OSNOVNI POSTOPEK</i> .....   | 18 |
| 4.1.1.1 | OPTIMIZACIJA METODE GRAVIMETRIJE .....  | 19 |
| 4.1.1.2 | <i>PRVA MODIFIKACIJA OSNOVNega POSTOPKA</i> .....   | 19 |
| 4.1.1.3 | <i>DRUGA MODIFIKACIJA OSNOVNega POSTOPKA</i> .....  | 20 |
| 4.1.1.4 | <i>TRETJA MODIFIKACIJA OSNOVNega POSTOPKA</i> .....   | 21 |
| 4.1.2   | <i>KONČNI POSTOPEK</i> .....  | 22 |
| 4.1.2.1 | VALIDACIJA KONČNEGA POSTOPKA .....  | 23 |
| 4.1.2.2 | <i>ZNOTRAJDNEVNA IN MEDDNEVNA PONOVLJIVOST</i> .....  | 23 |
| 4.1.2.3 | <i>LINEARNOST</i> .....   | 25 |
| 4.2     | OBORITEV POLISAHARIDOV IN SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV SAHARIDOV .....                                       | 26 |
| 4.2.1   | DOLOČANJE POLISAHARIDOV S KOLORIMETRIČNO REAKCIJO V STEKLENIH EPRUVETAH .....                                 | 26 |
| 4.2.1.1 | <i>IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ SIRUPA</i> .....  | 26 |
| 4.2.1.2 | <i>ANALIZA VSEBNOSTI IZOLIRANIH POLISAHARIDOV</i> .....   | 26 |
| 4.2.1.3 | <i>ANALIZA VZORCA (sirupa ali placebo)</i> .....  | 27 |
| 4.2.2   | DOLOČANJE POLISAHARIDOV S KOLORIMETRIČNO REAKCIJO V MIKROTITRSKIH PLOŠČICAH .....                             | 32 |
| 4.2.2.1 | <i>OPTIMIZACIJA</i> .....   | 32 |
| 4.2.2.2 | <i>VALIDACIJA</i> .....   | 34 |
| 4.2.2.3 | <i>UGOTAVLJANJE VZROKOV ZA SLABO RAZTAPLJANJE OBORINE PRI PRIPRAVI VZORCA ZA KOLORIMETRIČNO ANALIZO</i> ..... | 38 |
| 4.2.2.4 | <i>VPLIV DODANEGA 0,5M NaOH NA RAZTAPLJANJE OBORINE PRI PRIPRAVI VZORCA ZA KOLORIMETRIČNO REAKCIJO</i> .....  | 40 |
| 4.3     | ULTRAFILTRACIJA IN SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV SAHARIDOV ..   | 42 |
|         | <i>I.</i> <i>OSNOVNI POSTOPEK</i> .....   | 42 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 4.3.1     | OPTIMIZACIJA .....  | 43 |
| 4.3.1.1   | <i>Ultrafiltracija z velikostjo por v membrani 3,0 kD</i> .....                   | 43 |
| 4.3.1.2   | <i>Ultrafiltracija z velikostjo por v membrani 10,0 kD</i> .....                  | 44 |
| 4.3.2     | VALIDACIJA .....  | 54 |
| 4.3.3     | TESTIRANJE VZORCEV SIRUPA.....  | 55 |
| 4.4       | PRIMERJAVA GRAVIMETRIČEGA IN SPEKTOFOTOMETRIČNEGA DOLOČANJA<br>POLISAHARIDOV..... | 56 |
| <b>5.</b> | <b>ZAKLJUČEK</b> .....  | 58 |
| <b>6.</b> | <b>VIRI IN LITERATURA</b> .....   | 60 |
| <b>7.</b> | <b>PRILOGA</b> .....  | 62 |
| 7.1       | % SLUŽI V DROGAH .....  | 62 |
| 7.2       | NUMERIČNI PRIKAZ REZULTATOV RAZDELKA 4.3.1.2 .....                                | 62 |

## **POVZETEK**

Ozkolistni trpotec in gozdn slezenovec sta stari zdravilni rastlini, ki se uporabljata za najrazličnejše težave povezane z dihali in prebavo, pa tudi za celjenje ran. Najpogosteje se uporablja za pomiritev dražečega kašlja, za zdravljenje bronhitisa, prehlada ter pri vnetjih grla in žrela. Glavne zdravilne učinkovine v obeh rastlinah so sluzi.

Namen naloge je bil razvoj metode za kvantitativno analizo polisaharidov v sirupu, z izvlečkom rastlinskih drog, ki nam bi dala najbolj ponovljive in pravilne rezultate. Prva metoda, s katero smo analizirali sirup, je bila gravimetrična obarjalna metoda. Pri tej metodi smo polisaharide iz sirupa najprej izolirali z obarjanjem z etanolom. Tako smo preiskovani analiti dobili v obliki netopne oborine, ki smo jo po sušenju stehtali. Rezultate teh analiz smo primerjali z literurnimi podatki in ugotovili primerljivost med njimi. Druga metoda je bila kolorimetrična analiza izoliranih polisaharidov. Izolacijo polisaharidov od ostalih komponent sirupa smo naredili na dva načina. Prvič z obarjanjem z etanolom, drugič pa z metodo ultrafiltracije, s katero smo pripravili frakcije polisaharidov večjih od 10 kD. Izolirane polisaharide smo nato kvantitativno ovrednotili z reakcijo fenola ob prisotnosti žveplove kisline, ki smo jo najprej izvajali v steklenih epruvetah. Zaradi slabe ponovljivosti rezultatov, smo delo prenesli v mikrotitrskie ploščice. Za reakcijo fenola ob prisotnosti žveplove kisline v mikrotitrskih ploščicah smo potrdili linearnost ( $R^2=0,9939$ ) ter za raziskovalne namene ustrezno ponovljivost metode. Umeritveno krivuljo smo naredili z vodno raztopino saharoze. Vsebnost polisaharidov smo tako izrazili kot ekvivalente saharoze. Za končno analizo treh sirupov smo izbrali metodo ultrafiltracije s sledičo reakcijo s fenolom ob prisotnosti žveplove kisline, za katero smo prav tako potrdili ponovljivosti ter linearost metode.

Analizirali smo tri sirupe. Analiza sirupov je pokazala različne vsebnosti polisaharidov v posameznih sirupih. Najnižjo vsebnost polisaharidov smo določili za sirup 3. Nižjo viskoznost tega sirupa smo opazili že na oko. Sklepamo lahko, da je sirup 3 vseboval manj polisaharidov ali pa so bili ti krajsi. Najvišjo vsebnost polisaharidov smo določili za sirup 2. Slednji je bil glede na konsistenco tudi najbolj viskozen. Sklepamo lahko, da vsebuje veliko polisaharidov, ki so dolgi in kompleksni.

## **ABSTRACT**

Ribwort plantain and Mallow flower are old medicinal herbs, which are used to treat problems associated with respiratory system, digestion and wound healing. The most common use is for irritating cough, to treat bronchitis, cold and sore throat. Mucilages are the main active ingredients in both herbs.

In this work we tried to develop a method for quantitative determination of polysaccharides from herbal syrup, which would give us reproducible and accurate results. First, we analyzed the syrup with gravimetric method. Isolation of the polysaccharides was made by precipitation with ethanol. Investigated analyte was made insoluble and precipitate was weighed after drying. The results of these analyzes were similar to literature data. The second used method was the colorimetric analysis of isolated polysaccharides. Isolation of polysaccharides from the syrup was made by precipitation with ethanol and by ultrafiltration. With ultrafiltration we prepared a fraction of polysaccharides, which were larger than 10 kD. For the quantitative determination of isolated polysaccharides we used the phenol-sulfuric acid method. This method was first performed in glass tubes and, later in microplates. We replaced glass tubes with microplates, because the method in glass tubes was not repeatable. Later we confirmed the linearity ( $R^2 = 0,9939$ ) and appropriate repeatability of the phenol-sulfuric acid method in microplate for research purposes. A standard curve was made with an aqueous solution of sucrose. The content of polysaccharides was expressed as sucrose equivalents. For the final analysis of three different samples of syrup, we chose ultrafiltration method with the following phenol-sulfuric acid method. The repeatability and linearity of overall method was confirmed with validation of the method.

We analyzed three syrups. The results of the analysis showed different levels of polysaccharides in each syrup. The lowest content of polysaccharides was determined in syrup 3. We observed lower viscosity of the syrup 3. We can conclude that the syrup 3 contained less or shorter polysaccharides, compared with the other two samples. The highest content of polysaccharides was determined in the syrup 2. This sample was also the most viscous. We can conclude that this sample consisted of very long and complex polysaccharides.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

A – absorbanca

$A_{\text{izmerjena}}$  – absorbanca izmerjena z namiznim spektrofotometrom

$A_{\text{končna}}$  – razlika na namiznem spektrofotometru izmerjene  $A_{\text{raztopine vzorca}}$  in  $A_{\text{slepe raztopine}}$

c – koncentracija

dH<sub>2</sub>O – destilirana voda

EtOH – etanol

FŽ-reakcija – reakcija za dokaz saharidov s fenolom in žveplovo kislino

m – masa

MeOH – metanol

MM – molekulska masa

RSD – relativna standardna deviacija

$R^2$  – Pearsonov koeficient korelacije

sd – standardna deviacija

T – temperatURA

$V_{\text{končni}}$  – končni volumen

$\lambda$  – valovna dolžina

# 1. UVOD

## 1.1 OZKOLISTNI TRPOTEC IN GOZDNI SLEZENOVEC

### 1.1.1 SPLOŠNO O OZKOLISTNEM TRPOTCU IN GOZDNEM SLEZENOVČU

#### 1.1.1.1 OZKOLISTNI TRPOTEC

Trpôtec (*Plantago*) je rod, ki vsebuje okrog 200 vrst majhnih rastlin, ki zrastejo od 10-40 cm, nekatere pa tudi do 60 cm v višino. Večina izmed njih sodi med zdravilna zelišča, ki jih, zaradi razširjenosti teh rastlin, uporablja ljudski zdravilci po vsem svetu (1). Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*) je rastlina trajnica, ki raste na zapleveljenih rastiščih (njive, vrtovi, poti, vinogradi, ledine) in na travniščih (travniki, pašniki, trate). Čas cvetenja je od aprila do septembra (1, 2). Cvetovi ozkolistnega trpotca se nahajajo v jajčastem ali kratkovaljastem 1-4 cm dolgem in 5-8 mm debelem klasu. Prašniki so belkasti, komaj 5 mm dolgi. Steblo je nekajkrat daljše od socvetja. Listi pa so 10-20 cm dolgi in 0,7-2 cm široki (2). Ozkolistni trpotec prikazuje Slika 1.

#### 1.1.1.2 GOZDNI SLEZENOVEC

Slezenovec (*Malva*) je rod, ki vsebuje okrog 25-30 vrst rastlin. Rod je razširjen po zmernih, subtropskih in tropskih območijih Afrike, Azije in Evrope (3). Gozdni slezenovec (*Malva sylvestris*), ki ga prikazuje Slika 2, je rastlina trajnica, ki jo najdemo na zapleveljenih rastiščih, gozdovih in ledinah. Cveti od maja do septembra in zraste od 0,4 do 1,2 metra v višino. Cvetovi se nahajajo v zalistjih in grozdasto glavičastih ovršenih socvetjih. Premer cvetov je 3-5 cm in so rožnato do svetlo škrlatnovijoličaste barve. Venčni listi so zmerno globoko izrobljeni, s temnimi žilami. Spodnji listi so srčasti, nekoliko krpati, zgornji so 3-7 delni (2).

### 1.1.2 BOTANIČNA UVRSTITEV

#### 1.1.2.1 OZKOLISTNI TRPOTEC

Preglednica I – Znanstvena klasifikacija ozkolistnega trpotca (1)

|            |   |
|------------|---|
| Kraljestvo | Plantae (rastline)                              |
| Deblo      | Magnoliophyta (kritosemenke)                    |
| Razred     | Magnoliopsida (dvokaličnice)                    |
| Red        | Lamiales (ustnatičevci)                         |
| Družina    | Plantaginaceae (trpotčevke)                     |
| Rod        | Plantago (trpotec)                              |
| Vrsta      | <i>Plantago lanceolata</i> (ozkolistni trpotec) |

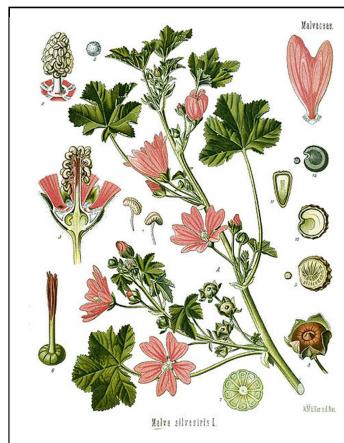


Slika 1: Ozkolistni trpotec (4)

### **1.1.2.2 GOZDNI SLEZENOVEC**

Preglednica II – Znanstvena klasifikacija gozdnega slezenovca (3)

|            |   |
|------------|---|
| Kraljestvo | Plantae (rastline)                          |
| Deblo      | Magnoliophyta (kritošemenke)                |
| Razred     | Magnoliopsida (dvokaličnice)                |
| Red        | Malvales (slezenovci)                       |
| Družina    | Malvaceae (slezenovke)                      |
| Rod        | Malva (slezenovec)                          |
| Vrsta      | <i>Malva sylvestris</i> (gozjni slezenovec) |



Slika 2: Gozjni slezenovec (5)

Preglednica I in Preglednica II prikazujeta biološko klasifikacijo ozkolistnega trpotca in gozdnega slezenovca.

### **1.1.3 UPORABA**

#### **1.1.3.1 OZKOLISTNI TRPOTEC**

Ozkolistni trpotec je zdravilna rastlina, katerega listi se predvsem uporablajo zoper vsa obolenja dihalnih poti. Uporabljajo se pri težavah z dihali, kot so pomirjanje dražečega kašlja, zdravljenje bronhitisa, prehlada ter pri vnetjih grla in žrela. Primerni so tudi za lajšanje suhega kašlja kadilcev. Učinkovine iz listov ustvarijo na sluznici zgornjih delov dihalnih poti tanko oblogo, ki jo ščiti pred draženjem ter tako sproščajo in lajšajo kašelj. Ker je blag adstringent, se uporablja za celjenje ran in pri pikih žuželk. Uporablja se tudi pri vnetem sečnem mehurju, saj ima zaradi kalija diuretičen učinek. Pospešuje presnovo ter pomaga tudi pri boleznih želodca, driski in hemeroidih.

Posebna previdnost pri uporabi pa se zahteva pri nekaterih zelo občutljivih ljudeh. Pri njih namreč droga lahko sproži težko dihanje, se pravi ravno to, kar odpravlja. Potrebno je paziti, da se ne prekoračijo dnevni odmerki. Odsvetuje se nosečnicam (6, 7).

#### **1.1.3.2 GOZDNI SLEZENOVEC**

Droga (cvet gozdnega slezenovca) se uporablja pri vnetjih sluznice ust in žrela, pri dražečem suhem kašlju ter blagih vnetjih črevesne sluznice. Sluzi v obliki pastil blažijo skeleča usta in žrelo, v obliki mazil pa srbečo kožo ter celijo kožne praske in razpoke (5, 8). Nima neželenih učinkov in je primerna droga za široko uporabo (8).

## 1.2 OGLJIKOVI HIDRATI

Ogljikovi hidrati so zelo razširjeni v rastlinskem svetu. K ogljikovim hidratom spadajo spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo kisikove, vodikove in ogljikove atome (9).

Osnovna delitev ogljikovih hidratov je (9, 10, 11):

- monosaharidi: splošna formula  $C_n(H_2O)_n$ , so enostavni sladkorji, ki v svoji strukturi vsebujejo 3 do 9 ogljikovih atomov, najpogosteje 5 ali 6 (glukoza, fruktoza,...);
- disaharidi: dva monosaharida povezana preko glikozidne vezi (saharoza);
- oligosaharidi: ogljikovi hidrati, sestavljeni iz od treh do deset monosaharidov, povezanih med seboj z glikozidno vezjo;
- polisaharidi: sestavljeni sladkorji iz več kot 10 monosaharidov (škrob, celuloza..), torej gre za polimere monosaharidov, ki so povezani z glikozidnimi vezmi.

Kemične lastnosti saharidov se razlikujejo glede na število hidroksilnih skupin in prisotnost ali odsotnost -CHO / = CO skupin. Te razlike so podlaga za dokazovanje saharidov z barvnimi reakcijami (9).

## 1.3 POLISAHARIDI

Polisaharidi, imenovani tudi glikani, so visokomolekularni polimeri, ki nastanejo s kondenzacijo velikega števila monosaharidov. Posamezne monosaharidne enote so med seboj povezane z glikozidno vezjo. S tem ko se monosaharidne enote združujejo v večjo molekulo, prihaja do izgubljanja prvotnih lastnosti polisaharida (topnost, sposobnost redukcije, sladek okus...). Polisaharidi so naravne molekule, ki v živih organizmih skrbijo za številne vitalne funkcije. So vir oz. rezerva energije (škrob, glikogen), ogrodn material (celuloza, hitin), ščitijo tkiva pred dehidracijo zaradi njihovih hidrofilnih lastnosti ali pa substance, ki jih izdelajo organizmi z namenom obrambe pred drugimi organizmi (npr. celične stene mikroorganizmov) (9).

### 1.3.1 DELITEV POLISAHARIDOV

#### 1. GLEDE NA MONOSAHARIDNE ENOTE, KI SESTAVLJAJO POLISAHARIDE:

- HOMOGENI POLISAHARIDI - Ti so sestavljeni iz velikega števila enakih monosaharidnih enot.
- HETEROGENI POLISAHARIDI - Polisaharidi, kjer so z glikozidno vezjo povezane različne monosaharidne enote.

## 2. GLEDE NA OBLIKO:

- a. LINEARNI POLISAHARIDI
- b. RAZVEJANI POLISAHARIDI (9)

### 1.3.2 HETEROGENI POLISAHARIDI IZ VIŠJIH RASTLIN

Heterogene polisaharide sestavlja več različnih monosaharidov. Običajno gre za kompleksne zmesi več različnih heterogenih polisaharidov. Mednje se uvrščajo sluzi, gumiji in pektini. Heteropolisaharidi so polisahardne makromolekule, ki z vodo dajejo koloidne raztopine (sole ali gele). Včasih jih je težko ločiti od ostalih polisaharidov.

**Sluzi** so normalno prisotne v rastlini kot sestavina celičnih sten, rezervna hrana ali kot pomoč za vezanje vode. Kemijsko so bolj enotne sestave in čistejše kot gumiji. Z vodo dajejo nelepljive sluzave raztopine. Ločimo nevtralne sluzi, kamor spadajo polisaharidi, ki so sestavljeni iz manoznih enot in kisle sluzi. Slednje sluzi vsebujeta tudi ozkolistni trpotec in gozdni slezenovec (9).

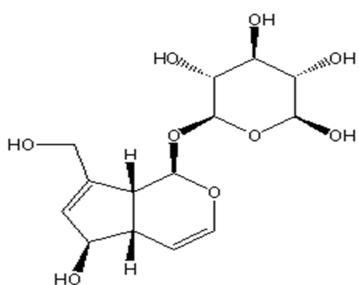
**Pektini** so galakturonani in so sestavni del osnovne lamele celic in medceličnine pri rastlinah (9). Osnovna veriga pektina je prikazana na Sliki 6.

**Gumiji** so rastlinski polisaharidni eksudati, na zraku se strdijo. Večinoma nastajajo patološko ob poškodbi in vsebujejo veliko nečistot (škrob, beljakovine, tanine, dele rastlin). So zelo kompleksne molekule. Primeri so arabski gumi, tragakant, ksantanski gumi, guar gumi,... (9)

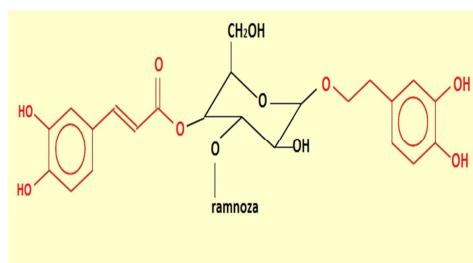
### 1.3.3 POLISAHARIDI IN OSTALE AKTIVNE SPOJINE V OZKOLISTNEM TRPOTCU IN GOZDNEM SLEZENOVCU

#### 1.3.3.1 OZKOLISTNI TRPOTEC

- **iridoidi** (aukubin [0,3-2,5 %] (Slika 3), katapol [0,3-2,1 %], asperulozid, verbaskozid [do 9 %] (Slika 4))
- **flavonoidi**
- **fenolne kisline**
- **sluzi** (polisaharidnega hidrokoloida je v listih do približno 0,8 %). Sluzi so pretežno iz D-galaktoze (28 %), L-arabinoze (20 %), D-glukoze (6 %), L-ramnoze (4 %), D-manoze (2 %), manjših količin L-fukoze in D-ksiloze ter vsebujejo približno 40 % uronskih kislin (9, 12, 13).



Slika 3: Aukubin

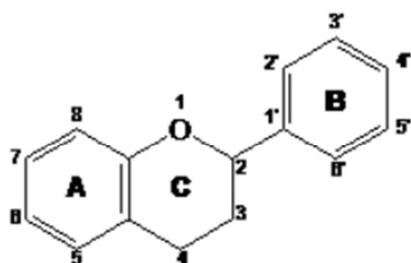


Slika 4: Verbaskozid

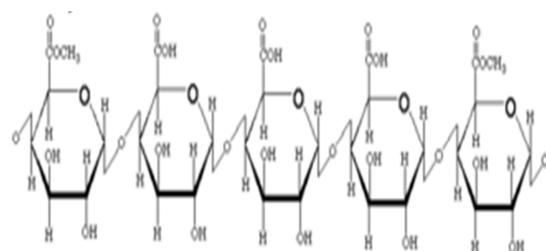
### 1.3.3.2 GOZDNI SLEZENOVEC

Aktivne komponente rastlinske vrste najdemo v listih, cvetovih in koreninah (9, 14, 15). Te so:

- **flavonoidi** – Osnovna struktura flavonoidov je prikazana na Sliki 5.
- **fenolne kisline**
- **tanini**
- **eterična olja**
- **antocianini**
- **sluzi** (v cvetovih 3,8-7,3 % sluzi). Sluzi so strukturno podobne polisaharidom v pektinu in sicer ramnogalakturonska veriga, na katero so pripete uronske kisline (Slika 6). Te sluzi so v listih gozdnega slezenovca dobro poznane. Slabo poznana pa je sestava sluzi v cvetovih gozdnega slezenovca. Sluzi sestavlja D-galaktoza, D-galakturonska kislina, D-glukuronska kislina, L-ramnoza, fruktoza, glukoza, trehaloza, ksiloza, manoza, fukoza, sukroza, arabinoza,... (15)



Slika 5: Osnovna struktura flavonoidov



Slika 6: Osnovna veriga pektina

### 1.3.4 IZOLACIJA POLISAHARIDOV

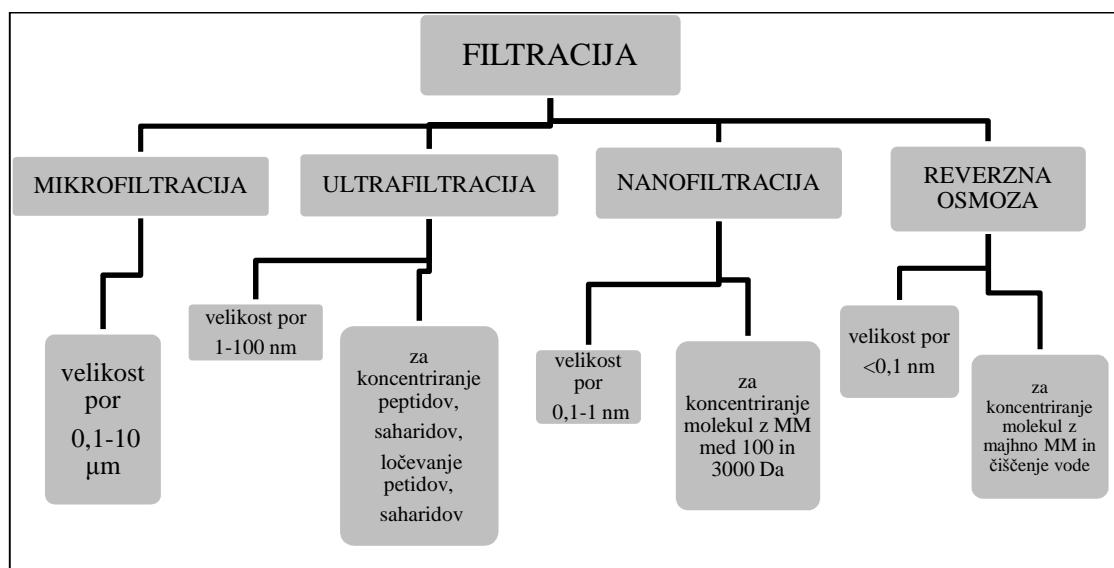
Polisaharidi se lahko raztapljajo v vodi, v prisotnosti mineralnih kislin (pri ekstrakciji pektina) ali soli (ogljikovi hidrati iz alg). Za ločitev polisaharidov od ostalih nizkomolekularnih molekul in soli, lahko uporabimo dializo, gelsko filtracijo, ekstrakcijo ali ultrafiltracijo. Za izolacijo lahko uporabimo tudi naslednje tehnike:

- Obarjalne metode (s spremenjanjem pH medija, z dodajanjem topil, ki se ne mešajo, z dodatkom soli...)
- Kromatografske tehnike
- Specifične tehnike (za polisaharide s strukturnimi posebnostmi)

Čiščenju sledijo metode za določanje kemijskih in fizikalnih lastnosti polisaharida (9).

#### 1.3.4.1 FILTRACIJA

Filtracija je postopek ločevanja tekočine in trdne snovi, suspendirane v njej, pri katerem tekočina prehaja skozi medij (filter), ki je neproposten za trdno snov. Sila, ki poganja filtracijski proces, je lahko posledica razlike pritiskov, gravitacije ali centrifugalnega polja. Velikost delcev trdnine, ki jih filter zadrži, je odvisna od velikosti odprtin v njem. Slika 7 prikazuje razdelitev filtracij glede na velikost por v membrani (filtru) (16, 17).



Slika 7: Vrste filtracij glede na velikost por v filtru

#### a) ULTRAFILTRACIJA

Ultrafiltracija je proces ločevanja zelo majhnih molekul iz raztopin. Prvi kriterij za uspešno ločevanje je velikost molekul. Z ultrafiltracijo lahko ločujemo le molekule, ki se razlikujejo v redu velikosti, ne pa tistih, ki so si po velikosti podobne (17). Ultrafiltracijske

membrane imajo sposobnost zadrževanja molekul od 1 do 1000 kDa, medtem ko soli in topilo lahko enostavno prehajajo skozi pore v membrani. Membrane so narejene iz različnih materialov in primerne za širok spekter aplikacij (16). Izbera membrane za ultrafiltracijo je odvisna od lastnosti proteina ali polisaharida, ki ga želimo izolirati iz analizirane raztopine. Ultrafiltracija se uporablja za ločevanje proteinov in polisaharidov z različno molekulske maso (MM), medtem ko manjše molekule, kot so soli, sladkorji in manjši peptidi, prehajajo v permeat (16, 17).

### 1.3.5 METODE DOLOČANJA POLISAHARIDOV

Metode, s katerimi lahko določamo saharide so naslednje (11, 18, 19, 20):

- **Kemične metode** temeljijo na redukcijskih sposobnostih različnih sladkorjev (Reagenti: pikrinska kislina, Tollensov reagent, 3,4-dinitrobenzojsko kislino, 3,5-dinitrosalicilno kislino, o-dinitrobenzenom,...).
- **Kolorimetrične metode** temeljijo na barvnih reakcijah določanja reducirajočih sladkorjev, polisaharidov ali celokupnih ogljikovih hidratov v vzorcu za analizo.
- **Gravimetrične metode** temeljijo na selektivnem izločanju analita iz vzorca, ki ga po sušenju tehtamo.
- **Volumetrične metode** Z reagenti, kot so cerijev sulfat, bakrov sulfat, natrijev hipojodid, lahko dokazujemo prisotnost že majhnih količin reducirajočih sladkorjev. Analize s temi reagenti so zahtevne, časovno potratne in občutljive na pogoje izvajanja.
- **Refraktometrična metoda** – z njo določamo vrste in koncentracije (c) sladkorjev. Odvisna je od temperature (T) in valovne dolžine ( $\lambda$ ) svetlobe.
- **Polarimetrična metoda**, s katero se določa čistota in koncentracija raztopin optično aktivnih snovi.
- **Kromatografske metode** temeljijo na določanju vrste ter stopnje polimerizacije ogljikovih hidratov (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, plinska kromatografija...).
- **Nuklearna magnetna resonanca**, s katero se določajo strukture saharidov, mesta glikozidnih vezi in sestave monosaharidov v polisaharidni molekuli.
- **Senzorična analiza**, s katero se analizira intenzivnost sladkega okusa.

### **1.3.6 KOLORIMETRIČNE METODE DOLOČANJA SAHARIDOV**

Kolorimetrija je tehnika, s katero določamo koncentracijo (c) obarvanih komponent v raztopini (21). Kolorimetrične metode torej temeljijo na kemični reakciji analizirane komponente do nastanka obarvanega produkta, ki ga lahko spektrofotometrično določimo. Izmerjeni absorbanca (A) ali transmitanca pa sta direktno povezani s količino v reakciji prisotnega analita, ki ga na ta način lahko kvantitativno ovrednotimo.

Osnovni reagenti, ki se uporabljajo:

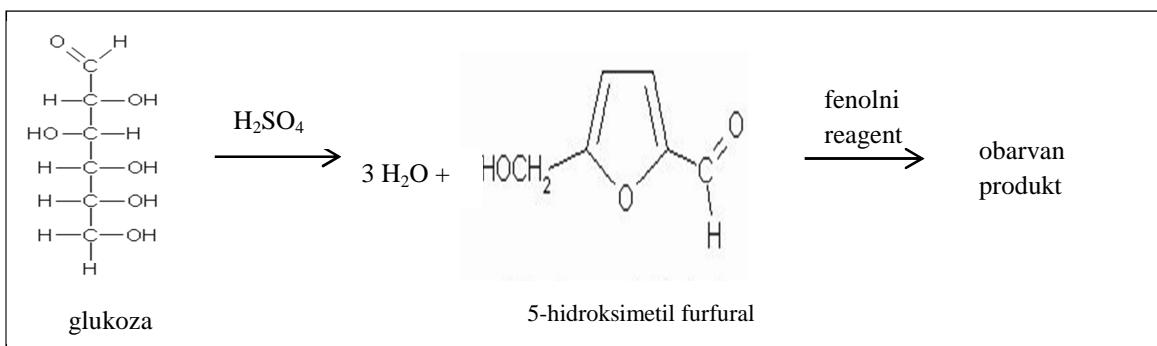
- 1-naftol v kislem mediju – za določanje na splošno vseh ogljikovih hidratov;
- benzidin v kislem mediju – za določanje pentoz in uronskih kislin;
- naftoresorcinol v kislem mediju – za uronske kisline;
- resorcinol, naftoresorcinol, resorcinol-disulfonska kislina v kislem mediju - za ketone;
- antron v kislem mediju - uporaba predvsem za analizo standardnih raztopin sladkorjev in ne za analizo sladkorjev, ki so bili ločeni s kromatografskimi metodami. Ostanki topil, ki so bili uporabljeni pri kromatografiji namreč zelo motijo analizo;
- fenol ob prisotnosti koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Osnova metod je, da polisaharide v kislem mediju hidroliziramo do monosaharidov. V močno kislem mediju pride do dehidrirane oblike sladkorja, nastane t.i. hidroksimetil furfural (Slika 8). Z dodatkom posameznih reagentov nastane intenziven obarvan kompleks, ki ima absorpcijski maksimum pri določeni  $\lambda$ , ki ga lahko izmerimo s spektrofotometrom (18, 20, 21).

### **1.3.7 DOLOČANJE SAHARIDOV S FENOLOM IN ŽVEPLOVO KISLINO**

Določanje saharidov s fenolom ob prisotnosti žveplove kisline (FŽ-reakcija) je kolorimetrična metoda za kvantitativno in kvalitativno določanje polisaharidov. Temelji na reakciji saharidov s fenolom v močno kislem mediju. Vrstni red dodajanja reagentov k raztopini saharidov je lahko različen. Nekateri avtorji trdijo, da je za maksimalno absorbenco nastalega kompleksa pomembno k raztopini vzorca najprej dodati koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in šele na to 5 % vodno raztopino fenola (22), drugi zagovarjajo obratni vrstni red dodatka reagentov vzorcu, torej najprej 5 % vodna raztopina fenola in šele na to 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18, 23, 24). Po dodatku obeh reagentov pa v obeh primerih nastanejo stabilni obarvani produkti, ki jih lahko spektrofotometrično določimo pri  $\lambda$  492 nm. Količino sladkorja nato določimo iz umeritvene krivulje, ki smo jo predhodno pripravili za izbrani sladkor. Natančnost metode se ocenjuje na  $\pm 2\%$  (20). Polisaharide pa

lahko tudi kvalitativno določimo. Vidna je rumeno-rjava barva raztopine, ki nastane po dodatku vseh reagentov. Metoda sicer ni specifična, saj z vsemi saharidi dobimo obarvan produkt. Je pa enostavna za določanje majhnih količin sladkorjev, njihovih metiliranih derivatov, oligosaharidov in polisaharidov (18). Pogosto se uporablja, saj je enostavna, hitra in daje ponovljive rezultate, uporabljeni reagenta pa sta poceni in stabilna. Sladkorje in polisaharide lahko določamo tudi ob prisotnosti soli, proteinskih ostankov ipd. S to metodo lahko določamo tako reducirajoče kot tudi nereducirajoče sladkorje (18, 20).



Slika 8: Shematski prikaz reakcije saharida s fenolom ob prisotnosti žveplove kisline

### 1.3.8 GRAVIMETRIČNO DOLOČANJE POLISAHARIDOV

Gravimetrična analiza je ena izmed najbolj točnih in natančnih metod makro kvantitativne analize. Osnova gravimetrične metode je, da analit, ki ga določamo, izločimo iz vzorca (raztopine) in ga stehtamo. To lahko naredimo s pomočjo obarjalnega reagenta (npr. EtOH različnih koncentracij). Taki metodi rečemo gravimetrična obarjalna metoda. Na ta način torej analit selektivno izločimo v obliki netopne oborine in ga po sušenju tehtamo. Metoda poteka v več korakih. Uporabna je predvsem v začetnih korakih čiščenja in izolacije snovi (25, 26).

Obarjalna metoda se uporablja za ločevanje proteinov in saharidov od drugih komponent v procesni tekočini, s spremenjanjem fizikalno-kemijskega okolja (pH, vrsta topila, ionska moč, vrsta ionov) pa vplivamo na topnost proteinov in saharidov.

## **2. NAMEN DELA**

V okviru diplomske naloge bomo poiskali, optimirali in validirali metode za ugotavljanje vsebnosti polisaharidov v sirupih z izvlečki zdravilnih rastlin s sluzmi. V predstopnji bomo najprej izolirali polisaharide od ostalih monosaharidov, disaharidov in oligosaharidov v sirupu, nato pa jih bomo kvantitativno določili.

Za izolacijo polisaharidov bomo preizkusili obarjalno metodo s primerno koncentracijo (70 %, 80 %, 90 %) ustreznega alkohola (MeOH, EtOH). Na ta način bomo oborili polisaharide, ostali sladkorji pa bodo ostali v raztopini. Za ločbo polisaharidov od ostalih sladkorjev bomo uporabili tudi metodo ultrafiltracije. S to metodo bomo s pomočjo epruvet za ultrafiltracijo, ki vsebujejo celulozno membrano z velikostjo por 10 kD, pripravili frakcije polisaharidov, ki bodo torej večji od 10 kD. Po izolaciji polisaharidov iz sirupa pa bomo bodisi gravimetrično ali spektrofotometrično določili vsebnost izoliranih polisaharidov. Gravimetrična analiza bo potekalo tako, da bomo izolirane polisaharide posušili do suhega in nato stehtali dobljeno oborino. Spektrofotometrična analiza polisaharidov pa bo temeljila na kolorimetrični reakciji s fenolom in žveplovo kislino. Ker ta reakcija ni specifična, bo še posebej pomembno, da iz vzorca odstranimo vso prisotno saharozo.

Namen naloge bo torej razviti metodo, ki bo dajala čim bolj pravilne in ponovljive rezultate. Dokončno optimizirano in validirano metodo bomo nato uporabili za analizo treh sirupov.

### **3. MATERIALI IN METODE**

Delo je potekalo v laboratoriju na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 VZORCI**

Pri optimizaciji in validaciji uporabljenih metod smo uporabili sirup, kupljen v lekarni. Sirup je vseboval tekoči ekstrakt zmesi lista ozkolistnega trpotca in cveta gozdnega slezenovca. Za pripravo sirupa so uporabili vodo kot ekstrakcijsko topilo. Dodane pomožne snovi pa so bile askorbinska kislina, saharoza ter metilparahidroksibenzoat. Pri analizi vzorcev s končno optimizirano in validirano metodo ultrafiltracije in slediče FŽ-reakcijo, smo analizirali tri različne vzorce sirupa.

##### **3.1.2 REAGENTI**

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| fenol   | SIGMA-ALDRICH, USA            |
| pektin  | zbirka Fakultete za farmacijo |
| arabski gumi  | Merck, Nemčija                |
| 95-97 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Preglednica X)                        | Merck, Nemčija                |
| 95-97 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | Fluka, Francija               |
| saharoza (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> , M = 342,99 g/mol) | Merck, Nemčija                |
| 96 % rafinirani etanol (EtOH)   | ECP, d.o.o, Slovenija         |
| Metanol (MeOH)  | Fluka, Francija               |
| Glukoza, brezvodna  | Fluka, Francija               |
| Natrijev hidroksid - NaOH   | Merck, Nemčija                |

##### **3.1.3 PRIPRAVA RAZTOPINE SAHAROZE V dH<sub>2</sub>O (PLACEBO)**

5 ml sirupa je vseboval 4 g saharoze. Za pripravo 20 ml raztopine saharoze v destilirani vodi (dH<sub>2</sub>O), smo natehtali 16 g saharoze in dopolnili z dH<sub>2</sub>O do 20 ml.

##### **3.1.4 PRIPRAVA 5 % RAZTOPINE FENOLA V dH<sub>2</sub>O**

Pripravili smo ga tako, da smo natehtali 5 g redestiliranega fenola in ga raztopili v 95 ml dH<sub>2</sub>O. Vse skupaj smo dobro premešali.

##### **3.1.5 PRIPRAVA 80 % EtOH**

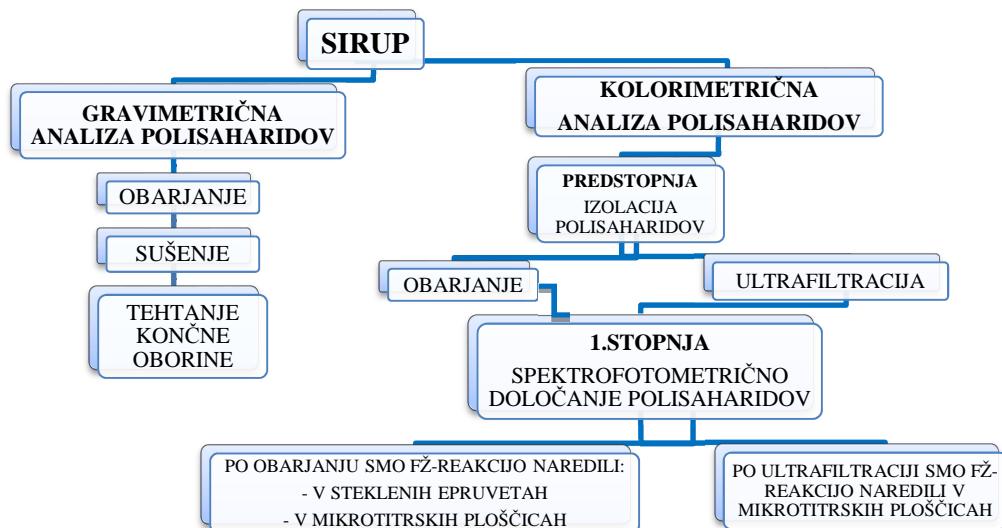
Iz 96 % rafiniranega EtOH in dH<sub>2</sub>O smo pripravili 80 % EtOH (27).

### 3.1.6 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

|  |   |
|--|---|
| precizna tehtnica – za kromatografske standardne | Mettler Toledo (Švica)                            |
| analizna tehtnica                                | Kern ALS 120-4 Kern&Sohn GmbH Belingen, (Nemčija) |
| centrifuga centric 400 R                         | Tehnica (Železniki, Slovenija)                    |
| ultrazvočna kopel                                | Bandelin Sonorex Digitec (Berlin, Nemčija)        |
| namizni spektrofotometer                         | Perkin Elmer, Lambda Bio (UK)                     |
| spektrofotometer Tecan Genious                   | Tecan (Švica)                                     |
| hladilnik  | Gorenje (Velenje, Slovenija)                      |
| vibracijsko mešalo: Vibromix 10                  | Tehnica (Železniki, Slovenija)                    |
| stresalnik, tip: Vibromix 40                     | Tehnica (Železniki, Slovenija)                    |
| rotavapor  | Büchi rotavapor R-200 (Švica)                     |
| rotavapor  | Büchi rotavapor R-114 (Švica)                     |
| enokanalne pipete                                | Bohit (Finska)                                    |
| multikanalne pipete                              | Biohit (Finska)                                   |
| mini centrifuga                                  | LMS Harmony (Japonska)                            |
| nastavki za pipete                               | Eppendorf (Nemčija)                               |
| mikrotitrski plošče s 96 vdolbinicami            | Applied Biosystem (ZDA)                           |
| električni grelec                                | Končar (Hrvaška)                                  |
| 15 ml plastične epruvete                         | TPP (Švica)                                       |
| 50 ml plastične epruvete                         | TPP (Švica)                                       |
| 0,5 ml, 1,5 ml in 2 ml plastične epruvete        | Eppendorf (Nemčija)                               |
| parafilm   | Pechiney plastic Packaging Company (ZDA)          |
| 15 ml plastične epruvete za ultrafiltracijo      | Millipore (ZDA)                                   |

### 3.2 METODE

Vse metode, ki smo jih tekom dela uporabljali, so prikazane na Sliki 9.



Slika 9: Shematski prikaz uporabljenih metod

### **3.2.1 GRAVIMETRIJA**

Osnova gravimetrije je, da analit izločimo iz vzorca ter ga stehtamo. V našem primeru smo želeli polisaharide iz sirupa ločiti z obarjalno metodo z EtOH. Preiskovani analit smo dobili v obliki netopne oborine, ki smo jo po sušenju stehtali.

#### **3.2.1.1 OSNOVNI POSTOPEK**

V 15 ml ali 50 ml plastične epruvete, ki smo jih predhodno stehtali, smo odpipetirali sirup, 96 % EtOH, s katerim smo želeli oboriti polisaharide in dH<sub>2</sub>O v različnih razmerjih. Vsebino smo dobro pretresli. Nato smo epruvete dali v centrifugo in centrifugirali 10 min pri 7500 × g in 21 °C. Po preteku 10 min smo odlili supernatant od nastale oborine ter dopolnili epruvete do ozanke 15 ml ali 50 ml z 80 % EtOH. Vsebino smo ponovno dobro premešali. Namen dodatka 80 % EtOH je bil, da nastalo oborino dobro speremo ter na ta način ločimo polisaharide od ostalih komponent vzorca, kot so nečistote, monosaharidi, disaharidi in oligosaharidi. Ponovno smo centrifugirali epruvete 10 min pri 7500 × g in 21 °C. Pri nekaterih poskusih smo izvedli še dodatno spiranje z 80 % EtOH. Sledilo je odlite supernatanta ter sušenje končne oborine na rotavaporju do konstantne mase pod pogoji: temperatura (T) 40 °C in začetni tlak (p) 601 mbar, ki smo ga počasi zniževali preko vrednosti 175 mbar, kjer je vrelišče za EtOH in 72 mbar, kjer je vrelišče vode do 0 mbar. Na ta način smo iz oborine odstranili ves preostanek topila. Postopek smo končali s tehtanjem oborine v epruvetah. Iz razlike mas stehtanih polnih in praznih epruvet, smo dobili maso nastale oborine, ki je predstavljala oborjene polisaharide.

#### **3.2.1.2 OPTIMIRANI (KONČNI) POSTOPEK**

V 50 ml plastične epruvete, ki smo jih predhodno stehtali, smo odpipetirali 3 ml, 5 ml, 7 ml, 9 ml in 10 ml sirupa ali placebo (vsak vzorec v svojo epruveto). K 3 ml, 5 ml, 7 ml in 9 ml vzorca smo dodali 5 ml dH<sub>2</sub>O, k 10 ml vzorca pa dH<sub>2</sub>O nismo dodali. Nato smo vse epruvete dopolnili z 96 % EtOH do 50 ml. Vsebine epruvet smo dobro premešali. Z namenom povečanja natančnosti in točnosti metode, smo epruvete najprej postavili za eno uro v hladilnik pri 4 °C, šele na to pa smo jih centrifugirali 10 min pri 7500 × g in 21 °C. Po preteku 10 min smo odlili supernatant od nastale oborine ter oborini dodali 50 ml 80 % EtOH. Vsebino smo dobro pretresli. Ponovno smo centrifugirali epruvete 10 min pri 7500 × g in 21 °C. Sledilo je odlite supernatanta, še dodatno spiranje oborine z 80 % EtOH ter centrifugiranje. Po odlitju supernatanta smo mokre oborine iz 50 ml plastičnih epruvet

prenesli v 15 ml plastične epruvete. Sušenje in tehtanje oborine je potekalo enako kot je to opisano pod osnovnim postopkom gravimetrije 3.2.1.1.

### **3.2.2 KOLORIMETRIČNA ANALIZA**

#### **3.2.2.1 PREDSTOPNJA**

Za določitev vsebnosti polisaharidov v sirupu smo morali le-te najprej ločiti od oligosaharidov, disaharidov in monosaharidov in na ta način pripraviti vzorec za kvantitativno ovrednotenje vsebnosti polisaharidov v vzorcu. To smo naredili na dva načina in sicer z obarjalno metodo in z ultrafiltracijsko metodo.

##### **a) IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ SIRUPA Z OBARJANJEM**

###### **KONČNI POSTOPEK:**

V prazne 15 ml plastične epruvete smo odpipetirali 1 ml vzorca (sirupa ali placebo), dodali 1 ml dH<sub>2</sub>O ter dopolnili z 96 % EtOH do 10 ml. Vsebino smo dobro pretresli. Delo smo nadaljevali tako, da smo epruvete dali v centrifugo za 10 min na 7500 × g in 21 °C. Po končanem centrifugiranju smo od nastalih oborin odlili supernatant ter oborine sprali z 10 ml 80 % EtOH. Za spiranje smo se odločili zato, ker 80 % EtOH polisaharidov ne raztaplja, raztaplja pa vse saharide z manjšo stopnjo polimerizacije, ki se jih na ta način znebimo in preprečimo, da bi motile določanje vsebnosti polisaharidov s FŽ-reakcijo (23, 28). Epruvete z raztopinami smo dobro pretresli in nato ponovno dali v centrifugo za 10 min na 7500 × g in 21 °C. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, tako da nam je ostala na dnu epruvete le oborina. Nastalim oborinam smo dodali 10 ml dH<sub>2</sub>O in epruvete postavili v ultrazvočno kadičko za 5 min z namenom popolnoma raztopiti nastale oborine. Po ponovnem centrifugiranju (10 min, 7500 × g, 21 °C) smo odpipetirali 1 ml supernatanta v 10 ml plastično epruveto ter dopolnili do oznake 10 ml z dH<sub>2</sub>O. Tako smo pripravili takšno koncentracijo saharidov, ki bi dajala barvno reakcijo z absorbanco, primerno za merjenje na spektrofotometru. Od tako pripravljenih raztopin smo odpipetirali vzorce za določitev vsebnosti polisaharidov za izvedbo FŽ-reakcije v steklenih epruvetah ali v mikrotitrski ploščici.

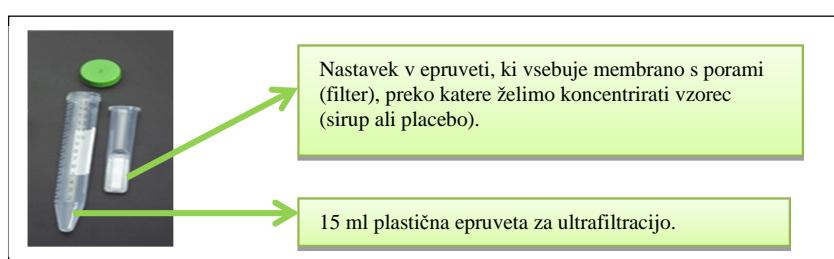
##### **b) PRIPRAVA FRAKCIJE POLISAHARIDOV Z ULTRAFILTRACIJO**

Za ločbo polisaharidov od ostalih komponent v sirupu smo najprej delali v epruvetah za ultrafiltracijo, ki je vsebovala celulozno membrano z velikostjo por 3 kD. Ker pa je bilo

delo s temi epruvetami precej zamudno, saj so molekule počasneje prehajale preko manjših por, smo se odločili za prehod na epruvete za ultrafiltracijo, ki imajo velikost por v membrani 10 kD. Na ta način smo v frakciji po koncu spiranja raztopine vzorca (sirupa ali placebo) z dH<sub>2</sub>O dobili polisaharide, katerih velikost je bila večja od 10 kD.

#### KONČNI POSTOPEK:

Vzeli smo plastične epruvete za ultrafiltracijo, z velikostjo por v membrani 10 kD (Slika 10). V posamezen nastavek 15 ml epruvete smo odpipetirali 1 ml vzorca (sirupa ali placebo) ter si natančno zabeležili maso odpipetiranega vzorca. K vzorcu smo dodali 3 ml dH<sub>2</sub>O ter s pipeto trikrat dobro premešali raztopine. Sledilo je centrifugiranje pri  $7500 \times g$  in 21 °C toliko časa, da smo dobili končni volumen ( $V_{končni}$ ) približno 0,5 ml. Nato smo ponovno odpipetirali 1 ml vzorca v posamezen nastavek epruvete ter si natančno zabeležili odpipetirano maso ter nato dodali še 2,5 ml dH<sub>2</sub>O. V vsak nastavek epruvete smo torej odpipetirali v dveh stopnjah po približno 2 ml točno natehtanega vzorca. Zopet smo raztopine v posameznih nastavkih epruvet dobro premešali s pipeto, nato pa epruvete centrifugirali pri  $7500 \times g$  in 21 °C toliko časa, da smo dobili  $V_{končni}$  približno 0,5 ml. Vse raztopine vzorcev smo nato sprali desetkrat s 3 ml dH<sub>2</sub>O. Približno 0,5 ml raztopine, ki je ostala v nastavku po desetem spiranju v 15 ml epruveti za ultrafiltracijo, smo prenesli v 1,5 ml plastično epruveto ter natančno stehtali maso prenesene raztopine. Od tako pripravljene raztopine smo odpipetirali 100 µl vzorca v 0,5 ml plastično epruveto ter dodali 100 µl dH<sub>2</sub>O (dvakratna redčitev). Vsebino 0,5 ml plastične epruvete smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Od tako pripravljene raztopine smo odpipetirali vzorce po 50 µl za izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrskih ploščicah.



Slika 10: Plastična epruveta za ultrafiltracijo z volumnom 15 ml

### **3.2.2.2 KVANTITATIVNA DOLOČITEV POLISAHARIDOV V VZORCU**

Vsebnost izoliranih polisaharidov v vzorcu smo določili s FŽ-reakcijo. Najprej je delo potekalo v steklenih epruvetah (24). Zaradi neponovljivosti dobljenih rezultatov smo delo nadaljevali s kvantitativnim določanjem polisaharidov v mikrotitrskih ploščicah (22). S tem smo poleg boljše ponovljivosti rezultatov dosegli tudi večjo avtomatizacijo postopka, saj smo izmerili absorbance s TECAN spektrofotometrom več vzorcem hkrati, ki so bili pripravljeni v enakih razmerah. Ostale prednosti so bile, da smo analizirali več vzorcev istočasno na eni mikrotitrski ploščici ter tako skrajšali čas analiziranja, delo je potekalo z manjšimi količinami vzorca in izvedba je bila enostavnejša.

a) **POSTOPEK DOLOČANJA VSEBNOSTI POLISAHARIDOV V STEKLENIH EPRUVETAH**

Osnovni predpis za metodo določanja vsebnosti polisaharidov smo povzeli po članku (24) in ga modificirali. Spremenili smo temperaturo ( $T$ ), pri kateri smo inkubirali raztopine v steklenih epruvetah po dodatku vseh reagentov. Namesto inkubacije pri sobni  $T$  smo se odločili za inkubacijo pri  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na ta način naj bi izboljšali ponovljivost metode (23, 24).

V stekleni epruveti smo zmešali:

- 0,5 ml raztopine saharidov,
- 0,5 ml 5 % vodne raztopine fenola.

Nato smo s pomočjo steklene pipete z batom zelo hitro (1-2 s) dodali 2,5 ml 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Razvila se je oranžno-rumena barva, ki je značilna za reakcijo fenola s pentozami in heksozami v močno kislem mediju. Zmes smo dobro premešali in steklene epruvete, pokrite s parafilmom, inkubirali v vodni kopeli eno uro pri  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po preteku tega časa smo raztopinam v epruvetah izmerili absorbanco na namiznem spektrofotometru pri  $\lambda$  490 nm. Pripravili smo tudi negativni kontrolni vzorec, kjer smo raztopino sladkorjev zamenjali z  $\text{dH}_2\text{O}$ .

#### **POTEK MERJENJA ABSORBANCE NA NAMIZNEM SPEKTROFOTOMETRU**

Po vklopu spektrofotometra smo nastavili  $\lambda$  492 nm. To je tista valovna dolžina, pri kateri so absorbirali obarvani produkti, ki so nastali po dodatku 5 % vodne raztopine fenola v močno kislem mediju. Pri tej  $\lambda$  smo najprej izmerili absorbanco slepe raztopine ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) in s tem nastavili absorbanco referenčnega vzorca na vrednost nič. Nato smo izmerili absorbanco naših vzorcev. Posebej smo bili previdni, da smo med posameznimi merjenji kiveto trikrat sprali z  $\text{dH}_2\text{O}$  in da je bila zunanjina kivete vedno suha in čista, preden

smo izvedeli meritev. V ta namen smo kiveto s papirnato brisačo dobro obrisali, saj bi umazana kiveta lahko motila samo meritev.

b) POSTOPEK DOLOČANJA VSEBNOSTI POLISAHARIDOV V MIKROTITRSKIH PLOŠČICAH

Osnovni predpis za metodo določanja vsebnosti polisaharidov smo povzeli po članku (22).

V vdolbinice mikrotitrsko ploščico smo zmešali:

- 50 µl raztopine polisaharidov v dH<sub>2</sub>O;
  - 150 µl koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- 15 min smo stresali pri sobni T na namiznem stresalniku;
- nato smo dodali 30 µl 5 % fenola v dH<sub>2</sub>O;
- sledila je inkubacija mikrotitrsko ploščice 5 min pri 90 °C v vodni kopeli;
- nato smo ploščico ohladili na sobno T, pri tem se je ploščica tudi osušila;
- nato smo izmerili absorbance na spektrofotometru TECAN (Slika 11), pri  $\lambda$  492 nm. Za zagotovitev konstantnosti pogojev pri izvedbi reakcije smo ob dodatku 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ali 5 % vodne raztopine fenola premešali raztopine tako, da smo z multikanalno pipeto raztopino trikrat potegnili v nastavek pipete in nazaj ven v vdolbinice mikrotitrsko ploščice. Kot rezultat smo podali vsebnost saharidov, izražen glede na saharozo, za katero smo naredili umeritveno krivuljo (Graf 3 – Poglavlje 4.2.2.1). Vsak vzorec smo analizirali vzporedno v petih vdolbinicah mikrotitrsko ploščice in izračunali povprečje meritev.

#### POTEK MERJENJA ABSORBANCE NA TECAN SPEKTROFOTOMETRU

Najprej smo vklopili TECAN spektrofotometer in računalnik, ki je z njim povezan. Nato smo v odprtino spektrofotometra položili mikrotitrsko ploščo z vzorci ter jo zaprli. Nastavili smo pogoje merjenja in sicer: 5 s inkubacija, 5 s stresanja, 2 s mirovanja plošče, desetkratna meritev absorbance vzorcem pri  $\lambda$  492 nm v posamezni vdolbinici mikrotitrsko ploščice. V nadaljevanju smo rezultate prenesli v Microsoft Excel ter jih analizirali.



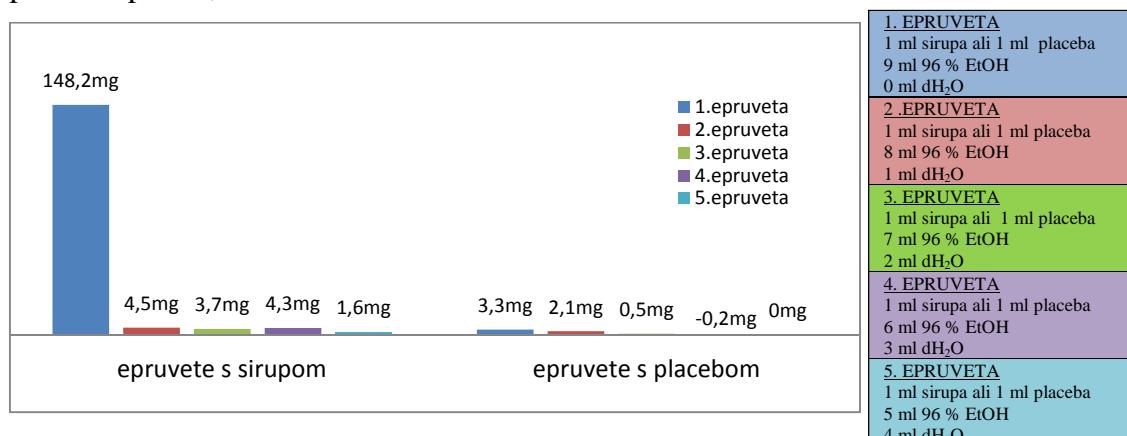
Slika 11: TECAN spektrofotometer

## **4. REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1 GRAVIMETRIJA**

#### **I. OSNOVNI POSTOPEK**

Gravimetrični postopek analize sirupa smo začeli tako, da smo v 10 plastičnih epruvet z volumnom 15 ml, ki smo jih predhodno stehtali, odpipetirali 1 ml sirupa ali 1 ml placebo, dodali bodisi 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, ali 4 ml dH<sub>2</sub>O ter dopolnili z 96 % EtOH do 10 ml. Delo je potekalo po postopku opisanem pod 3.2.1.1. Iz razlike mas stehtanih polnih in praznih epruvet, smo dobili maso nastale oborine.



Slika 12: Prikaz mase nastalih oborin po osnovnem postopku gravimetrije

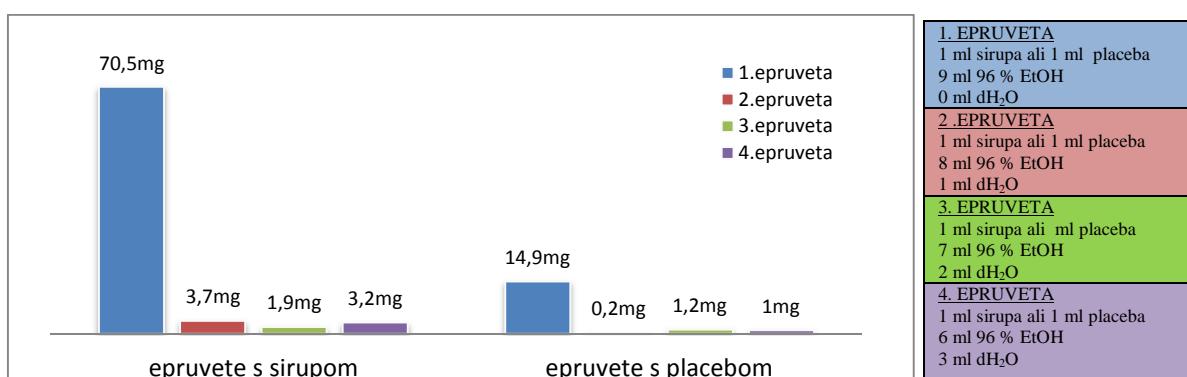
Masa oborine v prvi epruveti, kamor smo odpipetirali 1 ml sirupa in 9 ml 96 % EtOH, je bila 148,2 mg (Slika 12). Ta rezultat je previsok, saj je glede na znane podatke nemogoče, da bi sirup vseboval toliko polisaharidov. V 1 ml sirupa se nahaja 50 mg lista ozkolistnega trpotca in 50 mg cveta gozdnega slezenovca. Glede na literturne podatke o vsebnosti sluzi v drogah smo izračunali teoretično količino sluzi, ki je 3,2 mg, prisotne v 1 ml sirupa (Preglednica XXII v Prilogi). Torej je nemogoče, da bi zgornja dobljena masa 148,2 mg, predstavljal le željene oborjene polisaharide. Vzroki za tako visok rezultat bi lahko bili:

- Kemijsko vezana voda, ki je z rotavaporjem v vakuumu nismo mogli odstraniti.
- V stopnji spiranja nastale oborine z 80 % EtOH se nismo znebili vseh nečistoč in nizkomolekularnih snovi (predvsem saharoze) in torej nastalo oborino poleg oborjenih polisaharidov predstavlja tudi druge komponente iz sirupa, ki so se prav tako oborile.
- Vezanje vlage na posušeno oborino. Ta razlog je manj verjeten, saj bi se moral vezati na oborino zelo velik del vlage iz zraka.

## 4.1.1 OPTIMIZACIJA METODE GRAVIMETRIJE

### 4.1.1.1 PRVA MODIFIKACIJA OSNOVNega POSTOPKA

Osnovnemu postopku (4.1.1.) smo pred prvim centrifugiranjem uvedli dodatni korak in sicer, da smo epruvete s pripravljenimi raztopinami dali za eno uro v hladilnik na 4 °C. Z modifikacijo smo želeli podaljšali čas obarjanja in zmanjšati stopnjo polisaharidov v vzorcu ter tako povečati količino oborjenih polisaharidov. Izpustili smo pripravo vzorcev z 1 ml sirupa ali placebo, 4 ml dH<sub>2</sub>O in 5 ml 96 % EtOH, saj smo glede na rezultate dobljene pri osnovnem poskusu (Slika 12) ugotovili, da se ni oborilo skoraj nič polisaharidov.

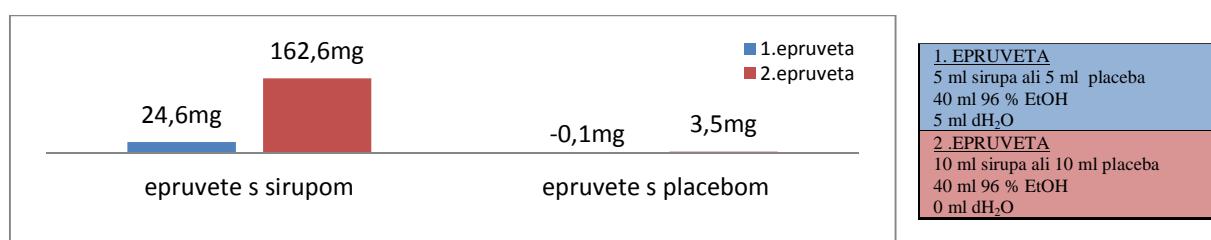


Slika 13: Prikaz mase nastalih oborin po daljšem času obarjanja polisaharidov pri T = 4°C

Iz Slike 13 vidimo, da je največ oborine nastalo v prvi epruveti, kamor smo odpipetirali 1 ml sirupa ter 9 ml 96 % EtOH. Obori se namreč 70,5 mg snovi. Ta rezultat je še vedno previsok, saj glede na znane podatke sirup ne vsebuje toliko polisaharidov. Vendar pa je rezultat nižji kot pri osnovnem postopku, kamor smo prav tako odpipetirali 1 ml sirupa ter 9 ml 96 % EtOH. Uvedba modifikacije, in sicer shranjevanje epruvete v hladilniku pri 4 °C pred prvim centrifugiranjem, je bila potrebna za dosego večje točnosti in ponovljivosti metode. Na ta način smo zagotovili večje in boljše obarjanje polisaharidov, ki jih tako v večji meri izoliramo iz sirupa, kar je pomembno v nadaljevanju kvantitativnega vrednotenja polisaharidov. Spremenjeni pogoji obarjanja so prispevali k večji stopnji obarjanja vseh saharidov, kar nam prikazuje rezultat stehtane mase oborine v prvi epruveti s placebom, za katero vemo, da vsebuje zgolj saharozo. Obarjanje disaharidov sicer ni bilo zaželeno.

#### 4.1.1.2 DRUGA MODIFIKACIJA OSNOVNEGA POSTOPKA

Z osnovnim postopkom in prvo modifikacijo osnovnega postopka smo ocenili, da ima tehtanje napako  $\pm 2$  mg. Na površino epruvet je bila pri sobni T normalno adsorбирana določena količina vlage, na popolnoma osušeni epruveti, ki smo jo vzeli iz vakuma, pa je še ni bilo. Tako smo v nekaterih primerih pri tehtanju dobili celo negativne vrednosti (4.1.1. – četrta epruveta). Odločili smo se za ponovitev postopka po prvi modifikaciji osnovnega postopka (4.1.1.1). Spremenili smo le to, da smo v 50 ml plastične epruvete odpipetirali petkrat in desetkrat večje količine sirupa ali placebo ter dodali dH<sub>2</sub>O in 96 % EtOH. Na ta način smo želeli zmanjšati napako pri tehtanju in tako dobiti bolj natančne rezultate dobljene oborine.

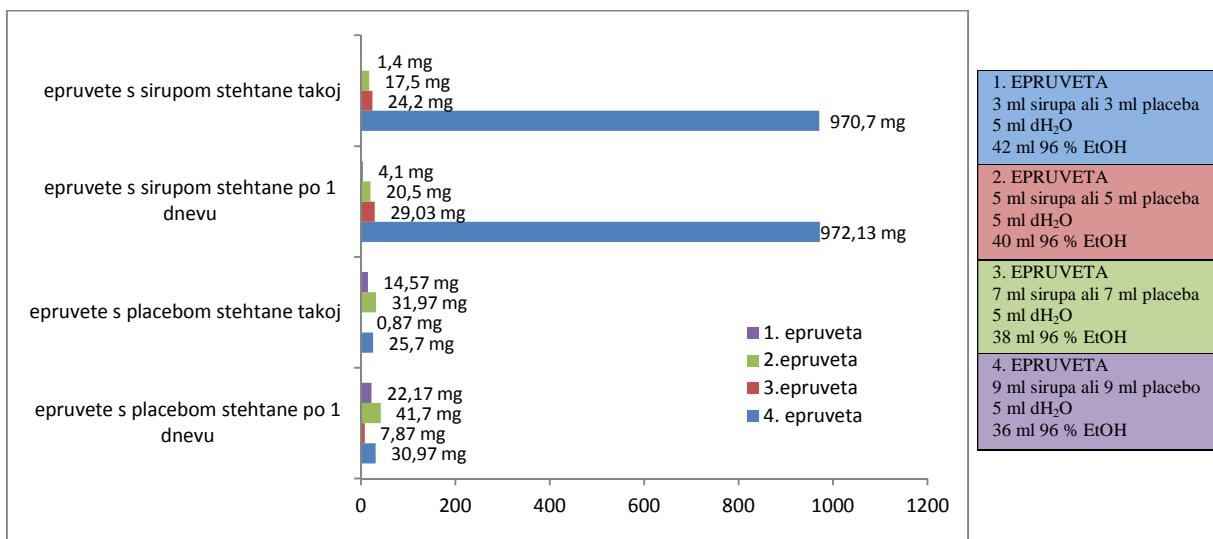


Slika 14: Prikaz mase nastalih oborin z uvedbo večjih količin analiziranega vzorca

Iz Slike 14 lahko vidimo, da je masa nastale oborine v prvi epruveti, kamor smo odpipetirali 5 ml začetnega sirupa, manjša kot v drugi epruveti, kamor smo odpipetirali 10 ml sirupa. Rezultata se razlikujeta za faktor 6,6. Teoretično bi morali dobiti  $2\times$  višje vrednosti nastale oborine v drugi epruveti s sirupom, saj se teoretično v njej nahaja  $2\times$  višja vsebnost polisaharidov iz sirupa. Razlog za večjo končno maso oborine v drugi epruveti s sirupom je lahko ta, da oborine ne predstavljajo le oborjenih polisaharidov, temveč tudi druge visokomolekularne ali kompleksne snovi, ki jih obarja 96 % EtOH ali jih z 80 % EtOH nismo uspeli sprati. Vzrok nelinearnosti dobljenih rezultatov je lahko tudi začetno odmerjanje vzorca. Ker je sirup zelo viskozen, lahko pride do nenatančnega odmerjanja vzorca za analizo in do odstopanja končnih rezultatov. Rezultati mas nastalih oborin v epruvetah s placebi so bili skladni s spoznanji, da so monosaharidi, disaharidi in oligosaharidi topni v 80 % EtOH (23). Z enkratnim spiranjem smo torej v tem poskusu odstranili večino prisotne saharoze. Še vedno pa so bile mase oborin sirupov večje od pričakovanih vsebnosti polisaharidov v sirupih.

#### 4.1.1.3 TRETJA MODIFIKACIJA OSNOVNEGA POSTOPKA

Postopek smo ponovili tako, da smo zajeli tako prvo kot drugo modifikacijo osnovnega postopka gravimetrije (4.1.1.1. in 4.1.1.2.). Razlikovala se je le stopnja sušenja oborin do konstantne mase. Vse epruvete smo sušili tako, da smo jih postavili v eksikator ter povezali eksikator z vakuumsko črpalko. Sušenje je potekalo pri  $40^{\circ}\text{C}$  in 0 mbar. V vseh prejšnjih postopkih smo namreč sušili vsako epruveto posebej na rotavaporju (4.1.1). Po končanem sušenju oborin do konstantne mase smo plastične epruvete stehtali dvakrat in sicer takoj po odvzemu iz eksikatorja in po enem dnevnu shranjevanja epruvet pri sobni T. Želeli smo dokazati vezavo vlage iz zraka na popolnoma osušene epruvete.



Slika 15: Primerjava stehtane mase oborine takoj po sušenju in po enem dnevu

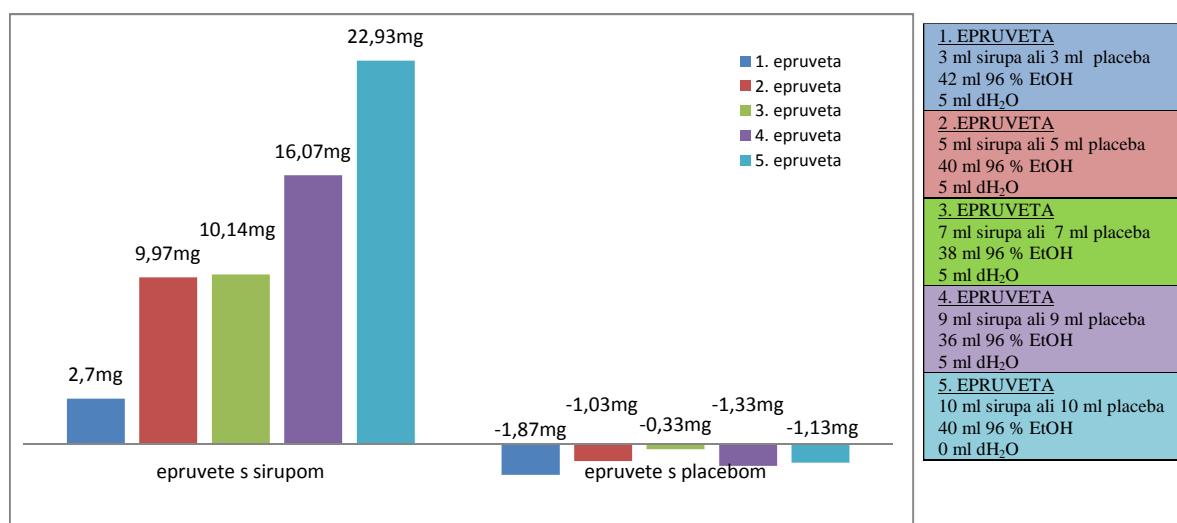
Z rezultati na Sliki 15 lahko potrdimo, da se na popolnoma osušeno površino epruvet res veže vlaga iz zraka. Masa takoj stehtanih polnih epruvet z oborinami se je razlikovala od polnih epruvet z oborinami stehtanih po enem dnevu. Razlika v masi je bila v nekaterih epruvetah skoraj 10 mg. Tako smo bili v nadaljnjih analizah previdni, da smo plastične epruvete stehtali takoj, ko je bilo sušenje končano ter tako dobili bolj pravilne količine mas suhih oborin.

Po literaturnih podatkih se v 3 ml sirupa nahaja 9,6 mg polisaharidov, v 5 ml 16 mg, v 7 ml 22,4 mg ter v 9 ml 28,8 mg sluzi (Preglednica XXII v Prilogi). Rezultati nastalih oborin stehtanih takoj po koncu analize torej niso bili v korelaciji z začetim odpipetiranim volumnom sirupa (3 ml, 5 ml, 7 ml, 9 ml). Najbližje literaturnim podatkom sta bili oborini, ki smo jih stehtali v drugi in tretji epruveti s sirupom. Zaključimo lahko, da se je v prvih treh epruvetah, kamor smo odpipetirali sirup, nakazala linearnost med stehtano oborino in

volumnom sirupa, ki smo ga analizirali. Za 4. epruveto s sirupom je bil rezultat popolnoma izven območja linearnosti. Sklep je bil, da se z enkratnim spiranjem oborin z 80 % EtOH nismo znebili vseh nečistot in nizkomolekularnih snovi. Dokaz za slednjo trditev je bil tudi nastanek oborin v epruvetah s placebo. V nadaljevanju optimizacije gravimetričnega postopka smo uvedli dodatno spiranje z 80 % EtOH.

#### **4.1.1.4 KONČNI POSTOPEK**

Ob upoštevanju vseh modifikacij (vključno z dvakratnim spiranjem oborin z 80 % EtOH) smo izvedli končni postopek gravimetrične analize. V 50 ml plastične epruvete, ki smo jih predhodno stehtali, smo odpipetirali sirup, 96 % EtOH in dH<sub>2</sub>O v razmerjih, kot jih prikazuje Slika 16. Delo smo izvajali po postopku opisanem pod 3.2.1.2.



Slika 16: Prikaz mase nastalih oborin po končnem postopku gravimetrije

Iz Slike 16 je razvidno, da smo dobili večjo maso suhe oborine v epruvetah s sirupom pri večjem začetnem volumnu sirupa, ki smo ga odpipetirali za analizo. To je skladno s tem, da imamo v večjem volumnu sirupa več polisaharidov, ki se pri metodi gravimetrije tudi oborijo. Ne moremo pa zaključiti, koliko je metoda gravimetrije točna, saj ne poznamo količine polisaharidov v sirupu. Potrdimo lahko, da je bilo dvakratno spiranje zadostno in potrebno za doseg boljših rezultatov. To je razvidno iz Slike 16, saj smo z dvakratnim spiranjem odstanili vso saharozo v epruvetah, kjer smo kot vzorec analizirali placebo. Vrednosti pri placebo so celo negativne. Vzrok negativnim vrednostim je, da smo pri tehtanju praznih plastičnih epruvet stehtali še vlago, ki je bila adsorbirana na površino epruvet, pri tehtanju plastičnih epruvet s posušeno oborino, pa se na njihovo površino še ni vezala vlaga, saj smo jih stehtali takoj, ko smo jih vzeli izpod vakuma. Postopek bi bil še

bolj informativen, če bi vse vzorce vseh epruvet obarjali z enako koncentracijo EtOH. Zaključimo lahko, da metoda gravimetrije ni dovolj specifična, saj lahko k skupni masi oborine prispevajo poleg polisaharidov tudi fenoli, tanini, druge kompleksne ter visokomolekularne snovi iz sirupa.

#### **4.1.2 VALIDACIJA KONČNEGA POSTOPKA**

Delo smo nadaljevali tako, da smo optimirani končni postopek gravimetrije (3.2.1.2 oziroma 4.1.1.4) še validirali. Preglednica III nam prikazuje, kakšna razmerja vzorca (sirupa ali placebo), dH<sub>2</sub>O in 96 % EtOH smo v ta namen odpipetirali.

Preglednica III: Prikaz razmerij vzorca, dH<sub>2</sub>O in 96 % EtOH za validacijo končnega postopka gravimetrije

|  |  |  |
|--|--|--|
| 1. 50 ml plastična epruveta                          | 4 ml sirupa<br>6 ml placebo<br>40 ml 96% EtOH  | <b>ZA DOLOČANJE LINEARNOSTI METODE</b>   |
| 2. 50 ml plastična epruveta                          | 7 ml sirupa<br>3 ml placebo<br>40 ml 96 % EtOH |  |
| 3. tri 50 ml plastične epruvete<br>(tri dni zapored) | 10 ml sirupa<br>40 ml 96 % EtOH                | <b>ZA DOLOČANJE PONOVLJIVOSTI METODE</b> |

##### **4.1.2.1 ZNOTRAJDNEVNA IN MEDDNEVNA PONOVLJIVOST**

Tri dni zapored smo v tri 50 ml plastične epruvete odpipetirali 10 ml sirupa ter dodali 40 ml 96 % EtOH. Želeli smo določiti znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost končnega postopka gravimetične metode. V Preglednici IV so prikazani rezultati mas nastalih oborin v treh paralelah tri dni zapored in povprečne vrednosti treh paralel.

Preglednica IV: Mase nastalih oborin treh paralel po dnevih in povprečna vrednost treh paralel

|   |                                 | <b>1. dan</b>                   | <b>2. dan</b>                   | <b>3. dan</b>                   |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|   |                                 | <b>m<sub>oborine</sub> (mg)</b> | <b>m<sub>oborine</sub> (mg)</b> | <b>m<sub>oborine</sub> (mg)</b> |
| 1. PARALELA   | 10 ml sirupa<br>40 ml 96 % EtOH | 54,57 mg                        | 42,97 mg                        | 49,17 mg                        |
| 2. PARALELA   | 10 ml sirupa<br>40 ml 96 % EtOH | 47,13 mg                        | 37,97 mg                        | 44,30 mg                        |
| 3. PARALELA   | 10 ml sirupa<br>40 ml 96 % EtOH | 50,03 mg                        | 46,17 mg                        | 46,53 mg                        |
| <b><math>\overline{m_{oborine}} \text{ (mg)}</math></b> |                                 | <b>50,58 mg</b>                 | <b>42,37 mg</b>                 | <b>46,67 mg</b>                 |

Relativni standardni odmik (RSD) treh vzorcev po dnevih:

1.dan – RSD = **7,41 %**

2.dan – RSD = **9,75 %**

3.dan – RSD = **5,22%**

Relativni standardni odmik povprečnih vrednosti mas nastalih oborin med dnevi:

RSD = **8,83 %**

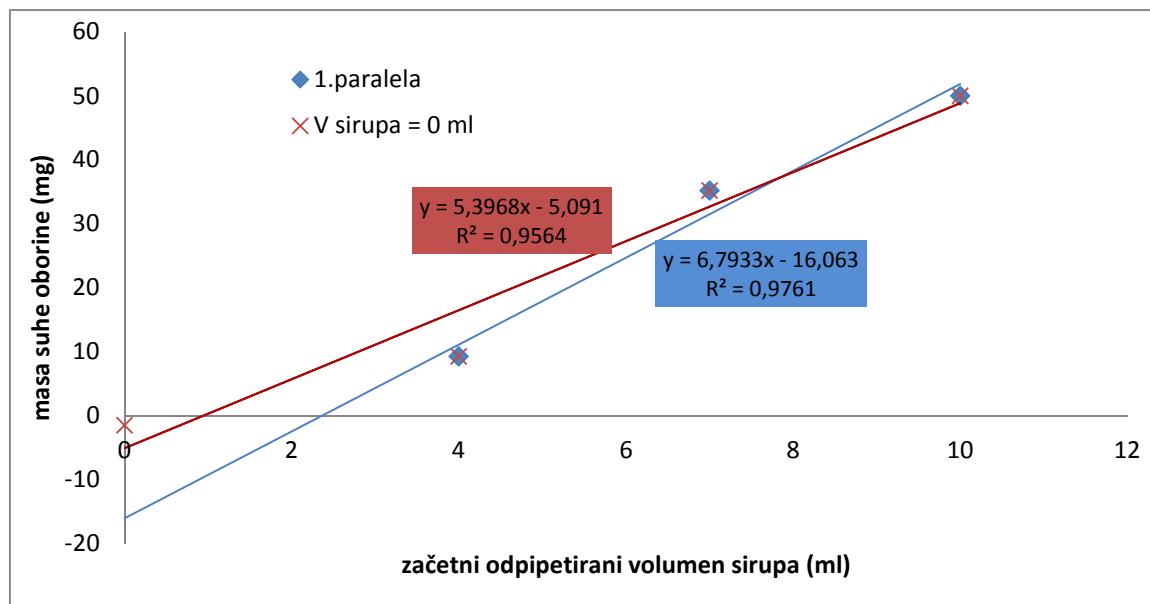
Končna optimirana in validirana metoda gravimetrije bi bila primerna za raziskovalne namene določevanja polisaharidov v vzorcu, saj bi bila v te namene dovolj natančna. Po drugi stani pa je sama metoda premalo natančna, da bi jo uporabili na regulatornih področjih farmacije.

K neponovljivosti metode lahko prispeva zaradi viskoznosti neenakomerno odpipetiran vzorec v začetnih stopnjah. Boljšo ponovljivost bi lahko dobili s tehtanjem začetnega vzorca za analizo.

V 10 ml sirupa naj bi se po literaturnih podatkih nahajalo približno 32 mg polisaharidov (Preglednica XXII v Prilogi). Z gravimetrično metodo smo dobili primerljiv rezultat. Vzrok za nekoliko višji rezultat bi lahko bil ta, da so se nam priobarjanju oborile tudi druge komponentne vzorca, ali da se s spiranjem nismo znebili vseh monosaharidov, disaharidov in oligosaharidov. Torej masa nastala oborine ni odraz le prisotnih polisaharidov v vzorcu, temveč tudi drugih komponent sirupa. Drugi vzrok bi bil, da drogi v analiziranem sirupu vsebujeta večji delež polisaharidov kot so literaturni podatki. Če bi želeli bolj natančne in točne podatke, bi morali najprej določiti delež sluzi v drogah, iz katerih je bil pripravljen sirup.

#### 4.1.2.2 LINEARNOST

Linearnost gravimetrične metode smo preverili tako, da smo odpipetirali različna razmerja sirupa in dopolnili s placebo do 10 ml. Nato smo dodali 40 ml 96 % EtOH (Preglednica III).

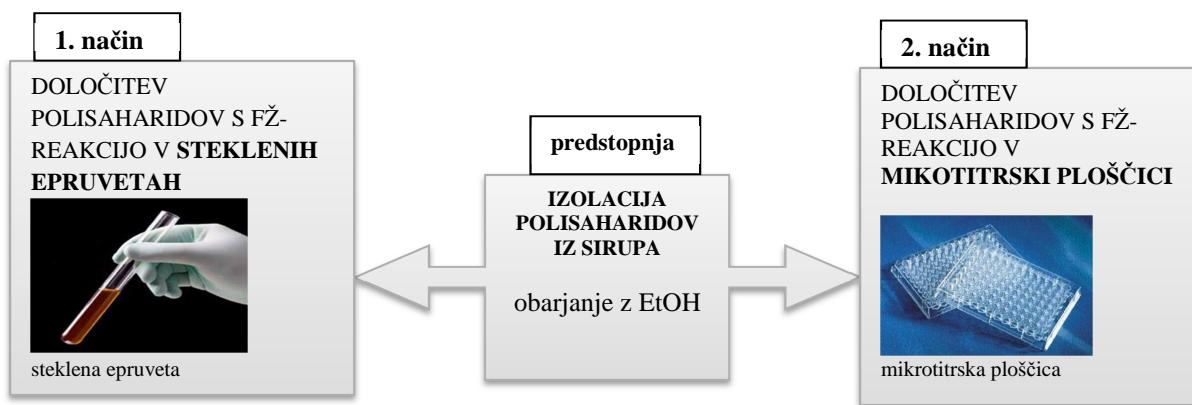


Graf 1: Masa oborine v odvisnosti od začetnega volumena sirupa

Glede na Graf 1 vidimo, da je Pearsonov koeficient korelacije ( $R^2$ ) 0,9761 za premico, ki prikazuje dobljene mase suhih oborin pri 4 ml, 7 ml in 10 ml začetnega odpipetiranega volumena sirupa. Večji kot je ta koeficient (torej bližje 1), večja je korelacija in takrat lahko govorimo o linearnosti med dvema spremenljivkama. Pearsonov koeficient korelacije za premico, kjer smo upoštevali začetni  $V_{\text{sirupa}}=0$  ml, je 0,9564. Poleg resnične nelinearosti končnega optimiranega postopka gravimetrije vpliva na Pearsonov koeficient korelacije slabša ponovljivost metode.

Glede na zgornje vrednosti prav tako ne moremo govoriti o točnosti metode, saj premica, ki prikazuje dobljene mase suhih oborin pri začetnem odpipetiranem volumenu sirupa 4, 7 in 10 ml sirupa, seka ordinatno os pri -16,06 mg. Pri 0 ml sirupa se namreč ne more oboriti nič polisaharidov, ker nismo odpipetirali nič sirupa. Sklepamo, da je dobljena vrednost netočna (-16,06 mg), saj smo dobili celo negativni rezultat. Ker je metoda precej nespecifična, tudi ne moremo trditi, da je nastala končna oborina samo odraz izoliranih polisaharidov.

## 4.2 OBORITEV POLISAHARIDOV IN SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV SAHARIDOV



Slika 17: Shematični pregled izvedenih postopkovobarjanja polisaharidov in kolorimetrične reakcije

Za razvoj ustreznih analiznih metod, smo morali najprej ločiti polisaharide od enostavnih sladkorjev in oligosaharidov, nato pa kvantitativno določiti vsebnost izoliranih polisaharidov s FŽ-reakcijo. Kolorimetrično reakcijo smo preizkusili v steklenih epruvetah in v mikrotitrskih ploščicah. Pregled postopkov shematično prikazuje Slika 17.

### 4.2.1 DOLOČANJE POLISAHARIDOV S KOLORIMETRIČNO REAKCIJO V STEKLENIH EPRUVETAH

#### 4.2.1.1 IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ SIRUPA

Za izolacijo polisaharidov smo vzeli prazne 15 ml plastične epruvete in v vsako od njih odpipetirali po 1 ml sirupa ali placebo, dodali 96 % EtOH ali MeOH in dH<sub>2</sub>O v različnih razmerjih ter raztopine dobro premešali. Namen dodatka dH<sub>2</sub>O je bil, da smo iz 96 % EtOH in MeOH pripravili približno 90 %, 80 % in 70 % EtOH in MeOH ter tako ugotovili, v katerih primerih se nam obori največ polisaharidov. Največ polisaharidov se nam je oborilo pri 90 % EtOH in MeOH. Poskusi so nam pokazali tudi, da EtOH in MeOH podobno obarjata polisaharide, zato smo izolirali polisaharide le z EtOH. Po nastanku oborine smo le-te centrifugirali, odlili supernatant ter oborine sprali z 80 % EtOH. Vsebino smo pretresli, ponovno centrifugirali, odlili supernatant in pripravili raztopine polisaharidov za kvantitativno analizo.

#### 4.2.1.2 ANALIZA VSEBNOSTI IZOLIRANIH POLISAHARIDOV

Kvantitativno analizo polisaharidov smo povzeli po Duboisu (24) in ga modificirali. Postopek je opisan pod 3.2.2.2.a.

#### 4.2.1.3 ANALIZA VZORCA (*sirupa ali placebo*)

V 15 ml plastične epruvete smo odpipetirali 1 ml vzorca (sirupa ali placebo), dodali 1 ml (tri paralele), 2 ml ali 3 ml dH<sub>2</sub>O ter dopolnili z 96 % EtOH do 10 ml (Preglednica V). Po izolaciji polisaharidov (po postopku 3.2.2.1.a) je sledila še FŽ-reakcija (po postopku 3.2.2.2.a).

Preglednica V: Absorbance raztopin vzorcev dobljene po izolaciji in izvedeni FŽ-reakciji

| Vzorci  | redčitev | A <sub>končna</sub> (A <sub>izmerjena</sub> - A <sub>slepa</sub> ) | Vzorci   | redčitev | A <sub>končna</sub> (A <sub>izmerjena</sub> - A <sub>slepa</sub> ) |
|---|----------|--|--|----------|--|
| 1 ml sirupa<br>8 ml 96 % EtOH<br>1 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,303</b>   | 1 ml placebo<br>8 ml 96 % EtOH<br>1 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,028</b>   |
| 1 ml sirupa<br>8 ml 96 % EtOH<br>1 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,428</b>   | 1 ml placebo<br>8 ml 96 % EtOH<br>1 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,089</b>   |
| 1 ml sirupa<br>8 ml 96 % EtOH<br>1 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,215</b>   | 1 ml placebo<br>8 ml 96 % EtOH<br>1 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,009</b>   |
| 1 ml sirupa<br>7 ml 96 % EtOH<br>2 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>1,532</b>   | 1 ml placebo<br>7 ml 96 % EtOH<br>2 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>-0,005</b>  |
| 1 ml sirupa<br>6 ml 96 % EtOH<br>3 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,749</b>   | 1 ml placebo<br>6 ml 96 % EtOH<br>3 ml dH <sub>2</sub> O | 100×     | <b>0,400</b>   |
| slepa raztopina   |          | 0,099  | slepa raztopina  |          | 0,099  |

Iz Preglednice V opazimo, da je vrednost za slepo raztopino 0,099. Ta vrednost je bila previsoka. Previsoka sta bila tudi rezultata, v katerem smo 1 ml sirupa obarjali z nižjimi koncentracijami EtOH. Na podlagi vizualnega spremeljanja nastalih oborin po obarjanju z EtOH različnih koncentracij, je največ oborine nastalo pri vzorcu, kjer smo polisaharide obarjali z 90 % EtOH. To pomeni, da se je tam oborilo največ polisaharidov. Tako visoki absorbanci, ki smo ju izmerili pri vzorcih, kjer smo obarjali polisaharide z 80 % in 70 % EtOH, ne moreta biti odraz prisotnih polisaharidov, temveč sta lahko posledica naključne napake ali napake samega postopka.

Pri izvedbi poskusa smo opazili visoko nihanje rezultatov, če smo istim raztopinam vzorcev zaporedoma dvakrat pomerili absorbance. V Preglednici V so prikazani samo rezultati prve meritve absorbance. Vzrok za nihanje rezultatov bi lahko bila nehomogenost raztopin in s tem pojav meglic (predela v raztopini z različnima lomnima količnikoma), ki vplivajo na samo meritev. Po dodatku koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nastaneta namreč dve faz, vodna faza in faza s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki se slabo mešata (23). Pri merjenju absorbance tako pride do neenakomerne sisanja svetlobe, zaradi česar je ponovljivost rezultatov slaba. Po dodatku 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v raztopino vzorca lahko nastanejo tudi mehurčki, ki prav tako lahko vplivajo na neponovljivost metode (23). Kljub začetni uvedeni modifikaciji, torej inkubaciji raztopine vzorca z dodatkom fenola in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pri 70 °C, namesto pri sobni T, nismo uspeli izboljšati ponovljivosti metode.

Iz Preglednice V torej ugotovimo visoko variabilnost rezultatov za enake vzorce (1 ml sirupa, 8 ml 96 % EtOH in 1 ml dH<sub>2</sub>O). Ker smo želeli razviti metodo, ki nam bo dajala ponovljive rezultate, smo delo nadaljevali v smeri optimizacije analiznega postopka.

**Ob iskanju vzrokov za neponovljivost rezultatov, smo se odločili nadaljevati z optimizacijo metode tako, da smo spremenjali po en parameter pri FŽ-reakciji.** Kot vodno raztopino polisaharida smo v vseh primerih uporabljali vzorec, ki smo ga pripravili tako, da smo v začetni stopnji izolacije polisaharidov odpipetirali 1 ml sirupa, dodali 1 ml dH<sub>2</sub>O ter 8 ml 96 % EtOH. Postopek smo nadaljevali tako, kot je opisano v poglavju 3.2.2.1.a.

- Vpliv dodanega volumna 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

V štiri epruvete smo odpipetirali 0,5 ml raztopine vzorca polisaharidov, v druge štiri pa 0,5 ml dH<sub>2</sub>O, nato smo dodali 0,5 ml 5 % vodne raztopine fenola ter dobro premešali. S pomočjo steklene pipete z batom smo v epruvete hitro (1-2 s) dodali različne volumne 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dodali smo bodisi 1, 1,5, 2, ali 2,5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zmes smo dobro premešali in steklene epruvete, pokrite s parafilmom, inkubirali v vodni kopeli eno uro pri 70 °C. Po preteku tega časa pa smo raztopinam v epruvetah dvakrat zaporedoma izmerili absorbanco na namiznem spektrofotometru pri  $\lambda$  490 nm.

Preglednica VI: Vpliv dodanega volumna 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

| VZOREC  | A izmerjena 1. meritev | A izmerjena 2. meritev | SLEPI VZOREC   | A izmerjena 1. meritev | A izmerjena 2. meritev |
|---|------------------------|------------------------|--|------------------------|------------------------|
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>1 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0,054                  | 0,059                  | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>1 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0,026                  | 0,027                  |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>1,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,127                  | 0,370                  | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>1,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,093                  | 0,540                  |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0,554                  | 0,490                  | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>2 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0,627                  | 0,446                  |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,451                  | 0,374                  | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,282                  | 0,430                  |

S tem poskusom smo želeli določiti najbolj optimalen volumen 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki bi nam dal čim bolj ponovljive rezultate in preveriti, kako vpliva spremenjen volumen (volumen manjši od 2,5 ml) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na variabilnost rezultatov. Iz Preglednice VI lahko vidimo, da so se vrednosti izmerjenih absorbanc razlikovale med zaporednima meritvama. Z modifikacijo osnovnega predpisa izvedbe FŽ-reakcije v smeri spremenjenega dodanega volumna koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nismo dobili zadovoljivih rezultatov.

- Vpliv časa izvajanja meritve absorbance po nalitju raztopin vzorca v kivete

Poskus smo naredili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.2.2.a. V zadnji stopnji smo nalili raztopino vzorca v kiveto in pomerili absorbanco takoj in po 30 s. Želeli smo potrditi in odstraniti možne prisotne meglice (predela v raztopini z različnima lomnima količnikoma) v raztopini vzorca, ki se jih kljub enournem segrevanju nismo znebili.

Preglednica VII: Vpliv časa izvedene meritve po nalitju raztopin v kivete

| Vzorci   | A izmerjena takoj | A izmerjena po 30 s |
|--|-------------------|---------------------|
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>            | 0,415             | 0,419               |
| 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,124             | 0,116               |

Z rezultati, ki so prikazani v Preglednici VII, nismo mogli potrditi prisotnosti meglic, za katere smo predpostavljali, da so vzrok slabo ponovljivim rezultatom. Zaključili smo, da čas izvedene meritve po nalitju raztopin vzorcev v kivete za merjenje absorbance na namiznem spektrofotometru ne vpliva na rezultate izvedenega postopka.

- Vpliv vrstnega reda dodajanja reagentov

Poskus smo naredili dvakrat in sicer prvič z dodatkom reagentov, kot je opisano v poglavju 3.2.2.2.a. Drugič smo postopek ponovili tako, da smo spremenili vrstni red dodajanja reagentov vzorcu polisaharidov in slepi raztopini (dH<sub>2</sub>O). Tako smo najprej raztopini vzorca zelo hitro dodali 2,5 ml 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, po premešanju pa še 0,5 ml 5 % vodne raztopine fenola. Zmesi smo dobro premešali in steklene epruvete, pokrite s parafilmom, inkubirali v vodni kopeli eno uro pri 70° C. Po preteku tega časa smo raztopinam izmerili absorbance na namiznem spektrofotometru pri  $\lambda$  490 nm.

Preglednica VIII: Vpliv vrstnega reda dodajanja reagentov

| VZOREC<br>(3 paralele)  | A izmerjena<br>dodatek reagentov po<br>osnovnem predpisu | A izmerjena<br>spremenjen vrstni red<br>dodajanja reagentov | SLEPI<br>VZOREC<br>(3 paralele)  | A izmerjena<br>dodatek reagentov po<br>osnovnem predpisu | A izmerjena<br>spremenjen vrstni red<br>dodajanja reagentov |
|---|--|---|--|--|---|
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,285  | 0,365   | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,062  | 0,019   |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,161  | 0,317   | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,027  | 0,017   |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,374  | 0,253   | 0,5 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,039  | 0,042   |

Rezultati (Preglednica VIII) so bili zelo variabilni, ne glede na vrstni red dodatka reagentov. Tako smo zaključili, da vrstni red dodajanja reagentov ne prispeva k izboljšanju ponovljivosti metode.

- Vpliv novo pripravljene 5 % vodne raztopine fenola

5 % vodna raztopina fenola naj bi bila obstojna pri shranjevanju na sobnih pogojih tudi do treh mesecev (18). Vseeno smo se odločili, da preverimo, ali je že pripravljena raztopina fenola kriva za neponovljivost rezultatov. FŽ-reakcijo smo naredili po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.2.a. tako, da smo v šest steklenih epruvet odpipetirali po 0,5 ml vzorca, nato smo v tri odpipetirali 0,5 ml sveže pripravljene 5 % vodne raztopine fenola, v tri pa 0,5 ml en mesec stare raztopine fenola ter vse dobro premešali. V zadnji stopnji smo hitro dodali še 2,5 ml 96 %  $H_2SO_4$  ter nadaljevali po postopku 3.2.2.2.a. Enako smo naredili tudi s 6 steklenimi epruvetami, v katere smo odpipetirali namesto vzorca 0,5 ml d $H_2O$ .

Preglednica IX: Vpliv sveže pripravljene 5 % vodne raztopine fenola

| VZOREC<br>(3 paralele)                             | A izmerjena<br>sveže pripravljena<br>vodna razt. fenola | A izmerjena<br>stara vodna razt.<br>fenola | SLEPI<br>VZOREC<br>(3 paralele)                      | A izmerjena<br>sveže pripravljena<br>vodna razt. fenola | A izmerjena<br>stara vodna razt.<br>fenola |
|--|---|--|--|---|--|
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,201   | 0,280                                      | 0,5 ml d $H_2O$<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,023   | 0,023                                      |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,317   | 0,207                                      | 0,5 ml d $H_2O$<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,030   | 0,023                                      |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,202   | 0,257                                      | 0,5 ml d $H_2O$<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,027   | 0,027                                      |

Sveža ali nekaj dni star fenolna raztopina v d $H_2O$  ne vpliva na končne rezultate in na njihovo variabilnost, kar je razvidno iz rezultatov v Preglednici IX. Zaključili smo, da ni potrebe po pripravi sprotne sveže fenolne raztopine.

- Odprtje sveže steklenice 96 %  $H_2SO_4$

Želeli smo preveriti, ali je vzrok našim neponovljivim rezultatom nečista 96 %  $H_2SO_4$ , ki smo jo uporabljali iz že odprte steklenice. V ta namen smo vzeli tri steklene epruvete, v katere smo odpipetirali 0,5 ml vzorca in tri steklene epruvete, v katere smo odpipetirali 0,5 ml d $H_2O$ . Nato smo nadaljevali s postopkom, ki je opisan v poglavju 3.2.2.2.a. V zadnji stopnji dodajanja reagentov smo hitro dodali 2,5 ml 96 %  $H_2SO_4$  iz novo odprte steklenice.

Preglednica X: Odprtje sveže steklenice 96 %  $H_2SO_4$

| VZORCI<br>(3 paralele)                             | A izmerjena | SLEPI VZORCI<br>(3 paralele)                         | A izmerjena |
|--|-------------|--|-------------|
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,100       | 0,5 ml d $H_2O$<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,303       |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,134       | 0,5 ml d $H_2O$<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,295       |
| 0,5 ml vzorca<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,252       | 0,5 ml d $H_2O$<br>0,5 ml fenola<br>2,5 ml $H_2SO_4$ | 0,106       |

96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> iz nove steklenice ni izboljšala ponovljivosti rezultatov, saj so bili rezultati še vedno zelo variabilni (Preglednica X). Dvomljivi pa so bili tudi rezultati za slepe raztopine, saj so bili previsoki.

- Izvedba FŽ-reakcije po članku

Poskus smo naredili po članku (22), z enakimi reagenti, ki smo jih povečali za faktor 20. Tako smo v stekleni epruveti zmešali 1 ml raztopine vzorca (vzorec polisaharidov ali dH<sub>2</sub>O) ter 3 ml 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Raztopine v steklenih epruvetah smo dobro premešali. Nato smo dodali 0,6 ml fenola v dH<sub>2</sub>O ter ponovno dobro premešali raztopine. Sledila je inkubacija steklenih epruvet 15 min pri 80 °C. Po preteku 15 min smo ohladili raztopine na sobno T in izmerili absorbance na namiznem spektrofotometru pri  $\lambda$  490 nm. Razlika v primerjavi s člankom je bila, da nismo delali v mikrotitrskih ploščicah, temveč v steklenih epruvetah in da smo epruvete z raztopino vzorca in dodanima reagentoma inkubirali 15 min pri 80 °C, ne pa 5 min pri 90 °C, kot je opisano v članku.

Preglednica XI: Izvedba FŽ-reakcije po članku (22)

| VZORCI<br>( 3 paralele)  | A izmerjena<br>dodatek reagentov po<br>osnovnem predpisu | SLEPI<br>VZORCI<br>( 3 paralele)  | A izmerjena<br>dodatek reagentov po<br>osnovnem predpisu |
|--|--|---|--|
| 1 ml vzorca<br>3 ml 96 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,6 ml fenola | 0,406; 0,408;<br>0,406                                   | 1 ml dH <sub>2</sub> O<br>3 ml 96 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,6 ml fenola | 0,300; 0,305;<br>0,307                                   |
| 1 ml vzorca<br>3 ml 96 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,6 ml fenola | 0,456; 0,458;<br>0,456                                   | 1 ml dH <sub>2</sub> O<br>3 ml 96 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,6 ml fenola | 0,313; 0,307;<br>0,307                                   |
| 1 ml vzorca<br>3 ml 96 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,6 ml fenola | 0,390; 0,394;<br>0,397                                   | 1 ml dH <sub>2</sub> O<br>3 ml 96 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>0,6 ml fenola | 0,376; 0,372;<br>0,377                                   |

Trikrat zaporedoma smo izmerili absorbance trem paralelam, ki so kot vzorec vsebovali sirup in trem paralelam, ki so kot vzorec vsebovale le dH<sub>2</sub>O in ugotovili visoka nihanja rezultatov. Iz rezultatov v Preglednici XI vidimo, da ni prišlo do izboljšanja ponovljivosti rezultatov.

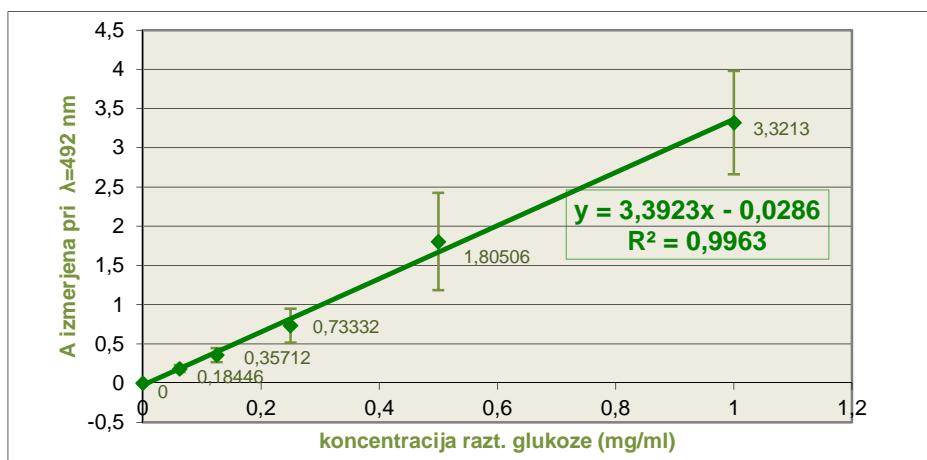
Ker smo bili brez jasnih zaključkov, smo se odločili, da bomo delo nadaljevali v mikrotitrskih ploščicah.

## 4.2.2 DOLOČANJE POLISAHARIDOV S KOLORIMETRIČNO REAKCIJO V MIKROTITRSKIH PLOŠČICAH

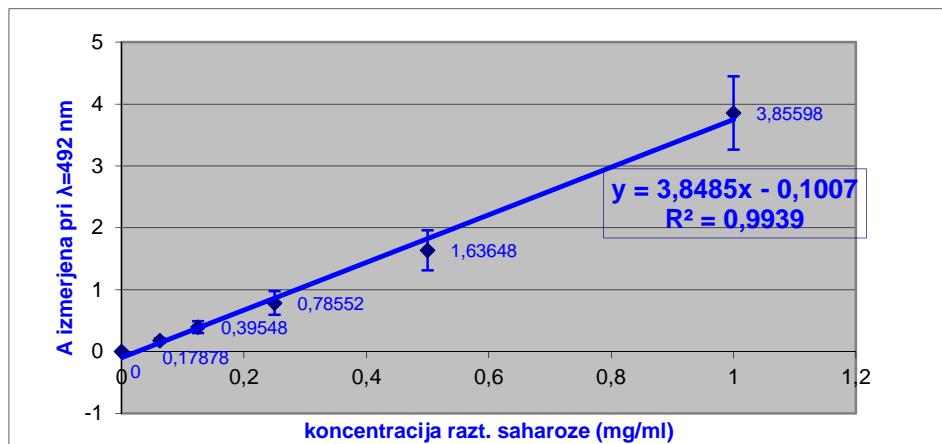
Razvoj analizne metode, ki bi nam dala čim bolj ponovljive in točne rezultate, smo nadaljevali z delom v mikrotitrskih ploščicah. Po izolaciji polisaharidov iz sirupa, smo kvantitativno želeli določiti vsebnost izoliranega analita s FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah (3.2.2.2.b). Osnova za delo je bil članek, v katerem so že optimizirali FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah (22).

### 4.2.2.1 OPTIMIZACIJA SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE DOLOČANJA POLISAHARIDOV V MIKROTITRSKI PLOŠČICI

- a) Pripravili smo osnovni raztopini glukoze ( $c=1 \text{ mg/ml}$ ) ter saharoze ( $c=1 \text{ mg/ml}$ ). Osnovni raztopini smo nato redčili do naslednjih koncentracij:  $0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,25 \text{ mg/ml}$ ,  $0,125 \text{ mg/ml}$  ter  $0,0625 \text{ mg/ml}$ . Nato smo določali vsebnost saharidov s FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah (3.2.2.2.b)



Graf 2: Umeritvena krivulja za glukozo. Prikazan je graf absorbance v odvisnosti od koncentracije glukoze

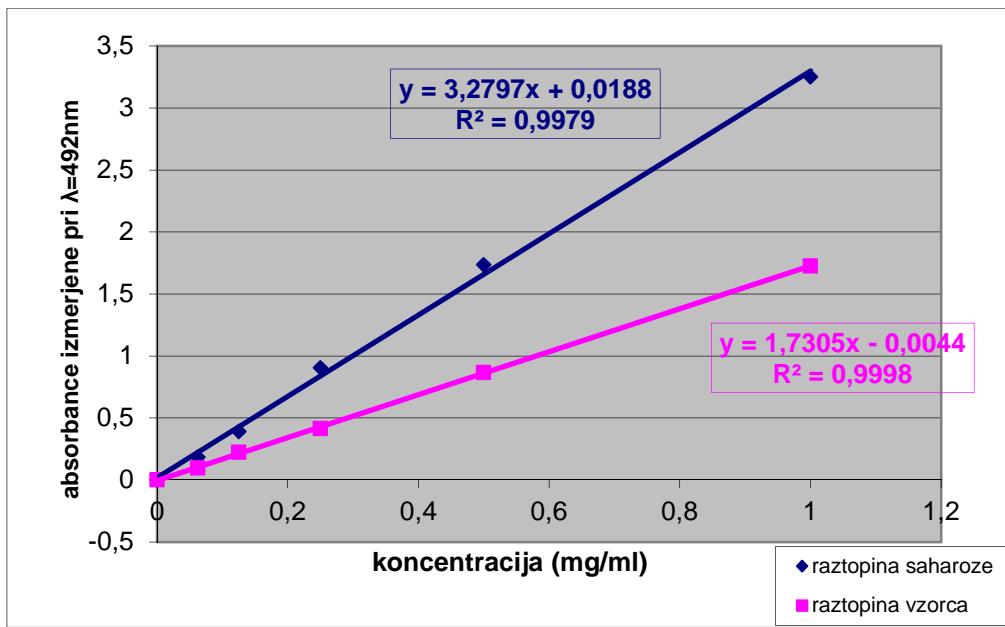


Graf 3: Umeritvena krivulja za saharozo. Prikazan je graf absorbance v odvisnosti od koncentracije saharoze

Graf 2 in Graf 3 prikazujeta, da izmerjene absorbance linearno naraščajo z višjimi koncentracijami vodnih raztopin glukoze in saharoze. Tako smo dokazali linearnost uporabljeni spektrofotometrične metode v mikrotitrskih ploščicah v širokem območju od 0 do 1 mg/ml. Dokaz za to sta visoka Pearsonova koeficienta korelacija. Za raztopine glukoze je ta koeficient 0,9963, za raztopino saharoze pa 0,9939, kar pomeni, da je korelacija med absorbanco raztopin vzorca in koncentracijo vodnih raztopin sladkorjev visoka.

- b) Pripravili smo osnovno raztopino saharoze ( $c=1$  mg/ml) in vzorec polisaharidov ( $c=1$  mg/ml) ter ju redčili do 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ter 0,0625 mg/ml. Nato smo določali vsebnost saharidov s FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah (3.2.2.2.b).

Za pripravo vzorca polisaharidov smo vzeli že posušeno oborino iz tretje modifikacije osnovnega postopka gravimetrije (glej 4.1.1.3). Vzeli smo tisto oborino iz gravimetrije po enkratnem spiranju, kjer smo zmešali 5 ml sirupa in 5 ml dH<sub>2</sub>O ter 40 ml 96 % EtOH in je nastala končna masa oborine 17,5 mg. 17,5 mg oborine smo dodali 17,5 ml dH<sub>2</sub>O, saj smo želeli raztopiti oborino v danem volumnu topila in pripraviti  $c_{\text{raztopine vzorca}}=1$  mg/ml. Pri raztplavljanju oborine se ni vse raztopilo, zato smo 15 ml plastično epruveto z raztopino dali v ultrazvočno kadičko za 30 min pri 75 °C, na vsakih 5 min pa smo epruveto z raztopino vzorca premešali še na vibracijskem mešalu. Po 30 min smo še vedno lahko opazili manjše trdne delce, zato smo raztopino centrifugirali 10 min pri 7500 × g in 21 °C. Od supernatanta smo odpipetirali po 50 µL vzorca, ki smo ga uporabili za FŽ-reakcijo. Spektrofotometrično analizo smo naredili po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.2.b. FŽ-reakcijo smo naredili tudi za različne koncentracije vodnih raztopin saharoze.



Graf 4: Odvisnost absorbance od koncentracije raztopine saharoze in od koncentracije raztopine vzorca

Iz Grafa 4 lahko opazimo, da je naklon premice, ki predstavlja raztopino vzorca polisaharidov, skoraj za polovico manjši od naklona premice, ki predstavlja raztopino saharoze. Možni vzroki:

- ob dodatku 96 %  $H_2SO_4$  ni prišlo do popolne hidrolize polisaharidov do monosaharidov;
- pri raztopljanju oborine, ki naj bi jo sestavliali polisaharidi, se ob dodatku  $dH_2O$  in mešanju na vibracijskem mešalu ter stresanju v ultrazvočni kadički ni vse raztopilo (raztopilo se je le približno  $\frac{1}{2}$  oborine), zato smo dobili za  $\frac{1}{2}$  manjši odziv;
- ob razpadu polisaharidov na monosaharide, lahko slednji dajejo manjši odziv kot sahariza. Dokazano je bilo, da kompleksi različnih sladkorjev s fenolom v močno kislem mediju različno absorbirajo svetlobo  $\lambda$  492 nm (18, 22, 24).

Iz Grafa 4 smo lahko še enkrat potrdili linearnost metode, ker sta  $R^2$  tako za raztopino vzorca polisaharidov, kot za raztopino saharaze visoka.

#### 4.2.2.2 VALIDACIJA SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE DOLOČANJA POLISAHARIDOV V MIKROTITRSKI PLOŠČICI

Validirali smo le spektrofotometrično metodo, torej drugi del po izolaciji polisaharidov iz sirupa (3.2.2.2.b). Za validacijo metode smo uporabili vodno raztopino polisaharidov s  $c=0,5$  mg/ml in vodno raztopino saharaze s  $c=0,25$  mg/ml. Ti dve koncentraciji smo izbrali na podlagi odzivov oziroma izmerjene absorbance, ki se je gibala okrog  $A=1$ .

### a) LINEARNOST

Linearnost metode določanja vsebnosti saharidov s FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah smo dokazali z rezultati na Grafu 2, Grafu 3 in Grafu 4 (4.2.2.1).

### b) ZNOTRAJDNEVNA IN MEDDNEVNA PONOVLJIVOST

Z namenom določiti znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost smo vsak dan tri dni zapored naredili FŽ-reakcijo za 3 paralele po 5 ponovitev. Dobljeni rezultati so predstavljeni v Preglednici XII in Preglednici XIII.

Preglednica XII: Izmerjene A treh paralel in povprečna vrednost treh paralel za raztopino saharoze s  $c=0,25 \text{ mg/ml}$

| ZNOTRAJDNEVNA<br>PONOVLJIVOST                                |  | 1. dan   | 2. dan   | 3. dan   |
|--|--|--|--|--|
|  | $A_{\text{končna}} - \text{povprečje 5 ponovitev}$ |
| 1. PARALELA  | Raztopina saharoze<br>$c=0,25 \text{ mg/ml}$       | <b>1,2321</b>                                      | <b>1,1211</b>                                      | <b>1,0222</b>                                      |
| 2. PARALELA  | Raztopina saharoze<br>$c=0,25 \text{ mg/ml}$       | <b>1,2919</b>                                      | <b>1,1306</b>                                      | <b>1,0522</b>                                      |
| 3. PARALELA  | Raztopina saharoze<br>$c=0,25 \text{ mg/ml}$       | <b>1,2024</b>                                      | <b>1,1687</b>                                      | <b>1,0331</b>                                      |
| <i>A končna</i> za raztopino saharoze $c=0,25 \text{ mg/ml}$ |  | <b>1,2422</b>                                      | <b>1,1402</b>                                      | <b>1,0358</b>                                      |

Preglednica XIII: Izmerjene A treh paralel in povprečna vrednost treh paralel za raztopino polisaharidov s  $c=0,5 \text{ mg/ml}$

| ZNOTRAJDNEVNA<br>PONOVLJIVOST                                      |  | 1. dan   | 2. dan   | 3. dan   |
|--|--|--|--|--|
|  | $A_{\text{končna}} - \text{povprečje 5 ponovitev}$ |
| 1. PARALELA  | Raztopina polisaharidov<br>$c=0,5 \text{ mg/ml}$   | <b>1,0689</b>                                      | <b>0,9289</b>                                      | <b>0,8238</b>                                      |
| 2. PARALELA  | Raztopina polisaharidov<br>$c=0,5 \text{ mg/ml}$   | <b>1,0226</b>                                      | <b>0,9712</b>                                      | <b>0,8996</b>                                      |
| 3. PARALELA  | Raztopina polisaharidov<br>$c=0,5 \text{ mg/ml}$   | <b>1,0087</b>                                      | <b>0,8788</b>                                      | <b>0,8956</b>                                      |
| <i>A končna</i> za raztopino polisaharidov s $c=0,5 \text{ mg/ml}$ |  | <b>1,0334</b>                                      | <b>0,9263</b>                                      | <b>0,8730</b>                                      |

Relativni standardni odmik treh paralel raztopine saharoze s  $c=0,25 \text{ mg/ml}$  po dnevih:

1.dan – RSD = **3,67 %**

2.dan – RSD = **2,21 %**

3.dan – RSD = **1,46 %**

Relativni standardni odmik povprečnih vrednosti izmerjenih absorbanc za raztopino saharoze s  $c=0,25 \text{ mg/ml}$  med dnevi:

RSD = **8,19 %**

Relativni standardni odmik treh paralel raztopine polisaharidov s  $c=0,5 \text{ mg/ml}$  po dnevih:

1.dan – RSD = **3,05 %**

2.dan – RSD = **5,00 %**

3.dan – RSD = **4,89 %**

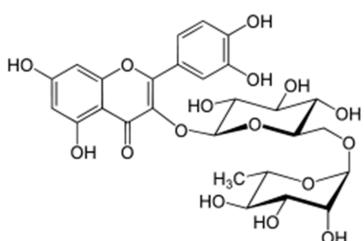
Relativni standardni odmik povprečnih vrednosti imerjenih absorbanc za raztopino polisaharidov s  $c=0,5$  mg/ml med dnevi:

RSD = **8,37 %**

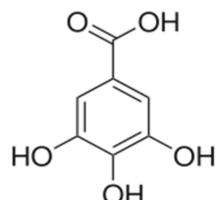
Glede na rezultate lahko zaključimo, da je znotrajdnevna ponovljivost veliko boljša od meddnevne ponovljivosti za obe raztopini. Meddnevna ponovljivost nam torej pokaže, da je natančnost metode prenizka, da bi se metoda uporabljala za regulatorne namene v farmaciji, je pa zadovoljiva za raziskovalne namene.

### c) TOČNOST

Za ugotavljanje točnosti metode smo pripravili vodno raztopino galne kisline ( $c=2$  mg/ml) in rutina ( $c=2$  mg/ml), ki sta nam služila kot vzorca. Z naslednjim poskusom smo želeli potrditi, da reagenta, ki ju uporabimo pri FŽ-reakciji z ostalimi fenolnimi spojinami, ne reagirata in sta torej specifična za reakcijo s sladkorji. Slika 18 prikazuje strukturo rutina, Slika 19 pa strukturo galne kisline.



Slika 18: Rutin



Slika 19: Galna kislina

### 1. POSKUS

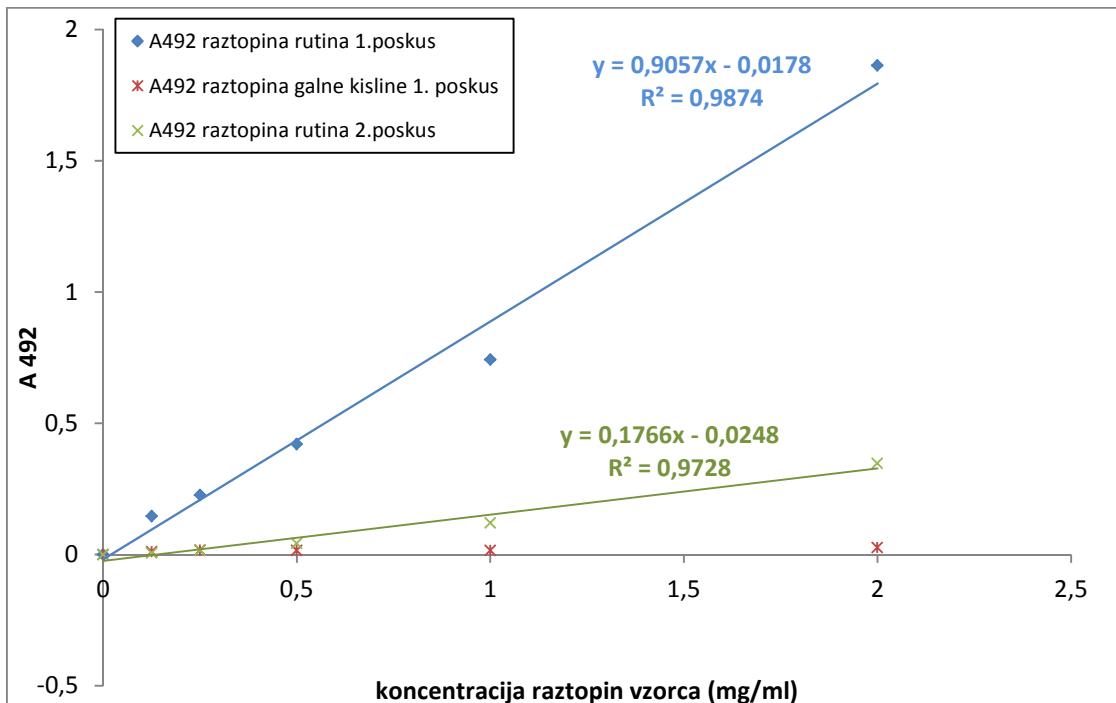
Osnovni raztopini galne kisline in rutina smo redčili, da smo dobili manjše koncentracije (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml), nato smo naredili FŽ-reakcijo po postopku opisanem pod 3.2.2.2.b.

### 2. POSKUS

Vodno raztopino rutina z osnovno  $c=2$  mg/ml smo redčili, da smo dobili manjše (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml) koncentracije. Nato smo v vdolbinice mikrotitrsko plošče zmešali:

- 50  $\mu\text{l}$  vodne raztopine rutina različnih koncentracij;
  - 150  $\mu\text{l}$  koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
- 15 min smo stresali mikrotitrsko ploščico pri sobni T;
- namesto 5 % vodne raztopine fenola (3.2.2.2.b) smo dodali 30  $\mu\text{l}$  d $\text{H}_2\text{O}$ ;**

- sledila je inkubacija mikrotitrsko ploščice 5 min pri 90 °C v vodni kopeli;
- ploščico smo ohladili na sobno T, pri tem pa se je ploščica tudi osušila;
- v zadnji stopnji pa smo izmerili absorbanco na spektrofotometru TECAN, pri  $\lambda$  492 nm.



Graf 5: Odvisnost absorbance od koncentracije vodne raztopine rutina in od koncentracije vodne raztopine galne kisline za 1. poskus in 2. poskus

V 1. poskusu smo FŽ-reakcijo naredili na vzorcih vodne raztopine galne kisline in rutina različnih koncentracij. Iz rezultatov, ki so prikazani na Grafu 5, lahko sklepamo, da večja kot je koncentracija vodne raztopine rutina, večja je absorbanca. Glede na strukturo rutina je to povsem jasno, saj ob dodatku 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> povzročimo razpad dveh glikozidnih vezi v strukturi, s tem dobimo dva prosta monosaharida. FŽ-reakcija pa je specifična za dokaz monosaharidov. Kadar imamo večjo koncentracijo rutina, povzročimo razpad dveh glikozidnih vezi pri večjem številu molekul rutina, več prostih monosaharidov v raztopini pa ima možnost reagirati z dodatkom fenola, kot drugim reagentom v spektrofotometrični metodi. Na ta način dobimo višje izmerjene absorbance.

Graf 5 nam prikazuje, da galna kislina, ki je polifenol, ne reagira z našimi reagenti v FŽ-reakciji, torej ne reagira z 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in dodanim fenolom.

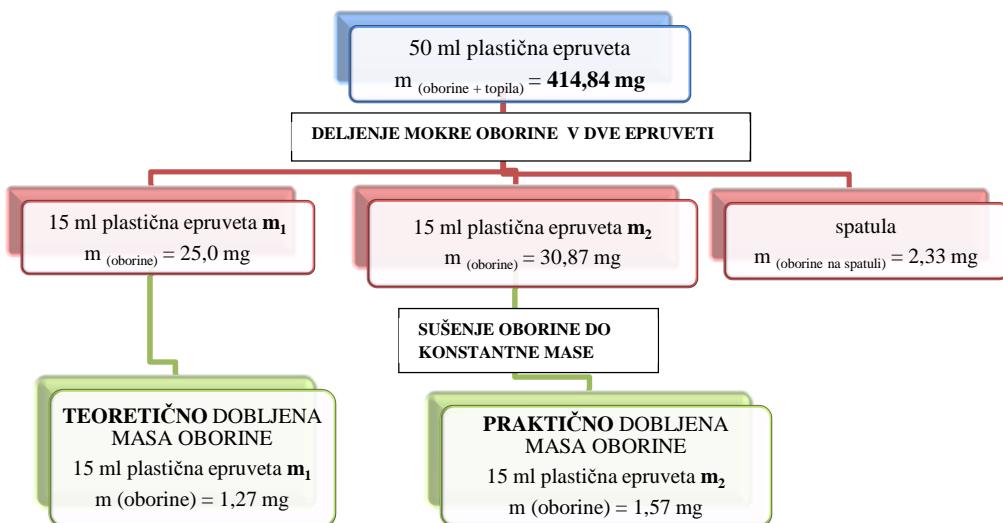
V 2. poskusu smo namesto 5 % vodne raztopine fenola v FŽ-reakciji uporabili kar dH<sub>2</sub>O. Želeli smo ugotoviti, ali rutin že sam po sebi nekoliko absorbira svetlobo  $\lambda$  492 nm. Iz rezultatov lahko potrdimo, da ali rutin že sam po sebi nekoliko absorbira svetlobo  $\lambda$  492

nm ali pa sladkorji reagirajo s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tudi brez pisotnosti fenola. Dobljene vrednosti absorbanc za vodno raztopino rutina iz 2. poskusa bi lahko odšteli od dobljenih vrednosti absorbanc za vodno raztopino rutina iz 1. poskusa. Na ta način bi dobili vrednost, ki bi nam prikazovala le količino reagirajočih saharidov.

#### **4.2.2.3 UGOTAVLJANJE VZROKOV ZA SLABO RAZTAPLJANJE OBORINE PRI PRIPRAVI VZORCA ZA KOLORIMETRIČNO ANALIZO**

Ker se nam vsa oborina (17,5 mg) ni raztopila po dodatku 17,5 ml dH<sub>2</sub>O (glej 4.2.2.1.b), nas je zanimalo, ali je za slabo raztopljanje oborine v dH<sub>2</sub>O krivo sušenje oborine do konstantne mase. Tisto sušenje, kjer smo oborino sušili na rotavaporju pod pogoji: temperatura (T) 40° in začetni tlak 601 mbar, ki smo ga zniževali preko 175 mbar, kjer je vrelišče za EtOH in 72 mbar, kjer je vrelišče vode do 0 mbar (glej 4.1.1.3).

Naredili smo sledeči poskus. Vzeli smo 50 ml plastično epruveto, ki smo jo predhodno stehtali. Vanjo smo odpipetirali 5 ml sirupa, 5 ml dH<sub>2</sub>O ter dodali 40 ml 96 % EtOH. Vsebino smo dobro premešali in jo pustili v hladilniku pri 4°C 60 min. Sledilo je centrifugiranje ( $7500 \times g$ , 10 min pri 21°C). Nato smo nastalo oborino dvakrat spirali s približno 50 ml 80 % EtOH in ponovno centrifugirali. Po odlitju supernatanta smo še mokro oborino s spatulo razdelili približno na polovico in vsako od teh polovic prenesli v svojo predhodno stehtano 15 ml plastično epruveto. Epruveto, ki je vsebovala več mokre oborine, smo sušili do konstantne mase. Po končanem sušenju oborine in določitvi mase, smo preko sklepnega računa preračunali, koliko bi bila teoretično masa suhe oborine v drugi epruveti, ki je nismo sušili do konstantne mase (Slika 20). Nato smo obema epruvetama dodali takšen volumen dH<sub>2</sub>O, da smo predpostavili, da bo po raztopljanju vse oborine nastala raztopina polisaharidov s  $c=1 \text{ mg/ml}$ . Oborini smo želeli popolnoma raztopiti v dodanem volumnu dH<sub>2</sub>O, zato smo epruveti dali v ultrazvočno kadičko za 30 min pri 75° C ter ju občasno premešali na vibracijskem mešalu. Ker sta se oborini zelo slabo razapljalji, smo epruveti centrifugirali 10 min pri  $7500 \times g$  in 21°C. Predpostavili smo, da ima suprant  $c_{\text{polisaharidov}}=1 \text{ mg/ml}$ , zato smo osnovno raztopino redčili, da smo dobili  $c_{\text{polisaharidov}}=0,5 \text{ mg/ml}$ . Pripravili pa smo tudi vodno raztopino saharoze s  $c=0,25 \text{ mg/ml}$ . Nato smo poskus zaključili z izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrski ploščici po postopku (3.2.2.2.b). Za vsak vzorec vodne raztopine polisaharida in vodne raztopine saharoze smo naredili 3 paralele po 5 ponovitev FŽ-reakcije v mikrotitrski ploščici. Rezultati so prikazani na Sliki 20 in v Preglednici XIV.



Slika 20: Shematični prikaz rezultatov poskusa izvedenega po postopku opisanem pod 4.2.2.3

#### a) PRIPRAVA VZORCA

V 30,87 mg mokre oborine v epruveti z oznako **m<sub>2</sub>** (glej Slika 20) je bilo 29,3 mg topila (dH<sub>2</sub>O in EtOH). Tako bi teoretično bilo v 25,0 mg mokre oborine, ki je nismo sušili do konstantne mase, 23,73 mg topila. Masa suhe oborine, ki bi jo dobili, če bi oborino v 15 ml plastični epruveti z oznako **m<sub>1</sub>** sušili do konstantne mase, bi bila 1,27 mg. 1,57 mg oborini v epruveti z oznako **m<sub>2</sub>** smo dodali 1,57 ml dH<sub>2</sub>O in oborini v epruveti z oznako **m<sub>1</sub>** 1,27 ml dH<sub>2</sub>O. Želeli smo pripraviti raztopini polisaharidov v vodi s c=1 mg/ml.

#### b) DOLOČANJE VSEBNOSTI SAHARIDOV S FŽ-REAKCIJO

Preglednica XIV: Rezultati poskusa izvedenem po postopku opisanem pod 4.2.2.3

| PARALELA                                   | Raztopina saharoze<br>c=0,25 mg/ml | Raztopina polisaharidov c=0,5 mg/ml,<br>ki smo jo dobili z razapljanjem<br>nastale oborine, ki je nismo sušili do<br>konstantne mase in sledenjem<br>redčenjem <b>m<sub>1</sub></b> | Raztopina polisaharidov c=0,5 mg/ml,<br>ki smo jo dobili z razapljanjem<br>oborine, ki smo jo sušili do konstantne<br>mase in sledenjem redčenjem <b>m<sub>2</sub></b> |
|--|------------------------------------|---|--|
|  | A <sub>končna</sub>                | A <sub>končna</sub>   | A <sub>končna</sub>  |
| 1. PARALELA                                | 1,0177                             | 0,6112  | 0,4596   |
| 2. PARALELA                                | 1,0424                             | 0,6199  | 0,3751   |
| 3. PARALELA                                | 0,9728                             | 0,5673  | 0,3440   |
| povprečje 3 paralel<br>A <sub>končna</sub> | <b>1,0110</b>                      | <b>0,5995</b>   | <b>0,3929</b>  |

Če primerjamo rezultate za vzorce raztopin polisaharidov v dH<sub>2</sub>O iz Preglednice XIV z rezultati za vzorec raztopine polisaharida iz Grafa 4 (Vrednost A = 0,865 za raztopino s c= 0,5 mg/ml - 4.2.2.1), lahko ugotovimo, da so bile izmerjene absorbance v Preglednici XIV nižje, kot pri vzorcu raztopine polisaharidov iz 1. poskusa, čeprav naj bi povsod pripravili raztopine polisaharidov s c=0,5 mg/ml. V epruveti z oznako **m<sub>1</sub>**, je bila absorbanca 1,4×

nižja, v epruveti z oznako **m<sub>2</sub>** pa kar 2,2× nižja glede na Graf 4. Ker so bile izmerjene absorbance nižje, je bila nižja tudi koncentracija polisaharidov v teh dveh raztopinah (Preglednica XIV) v primerjavi z raztopino polisaharidov iz prvega poskusa (Graf 4). Prvi razlog za to je lahko, da se je raztopilo manj oborine oz. polisaharidov, ko smo oborini v tem poskusu raztoplali v dH<sub>2</sub>O, v primerjavi z oborino, ki smo jo raztoplali v prvem poskusu (Graf 4). Drugi razlog je lahko, da so bile oborine vsebovanih polisaharidov sestavljene iz različnih monomerov. Eni med njimi so manj reaktivni kot drugi in zato dobimo manjši odziv na spektrofotometru (18, 22). Torej se v opisanem poskusu ni raztopilo manj polisaharidov v primerjavi s prvim poskusom (4.2.2.1), ampak so se tu v prvi stopnji oborili in kasneje pri razapljanju raztopili drugi polisaharidi, ki so manj reaktivni ter tako ne dajo enakega odziva kot polisaharidi v prvem poskus (4.2.2.1). Tretji razlog pa je lahko ta, da je ob dodatku dH<sub>2</sub>O oborini prišlo do naključnega razapljanja polisaharidov. Nekateri so se torej raztopili, drugi, ki so bolj kompleksni, pa se niso. Zaradi njihove kompleksnosti in nepopolne hidrolize jih tako nismo določili s FŽ-reakcijo in smo posledično dobili nižje vrednosti izmerjenih absorbanc. Četrti razlog za nižje rezultate pa bi lahko bila kriva tudi ocenjena napaka tehtanja ( $\pm 2$  mg). Če primerjamo le vodni raztopini polisaharidov, ki smo jih analizirali v tem poskusu, lahko zaključimo, da vmesno sušenje oborine do konstantne mase vpliva na slabše razapljanje oborine v dH<sub>2</sub>O.

Ob primerjanju vodnih raztopin saharoze s  $c=0,25$  mg/ml iz prvega poskusa ( $A = 0,905$ , Graf 4) in iz tega poskusa (Preglednica XIV), so vrednosti za 10 % višje v tem poskusu. Odstopanje je posledica naključnih napak pri pripravi raztopine saharoze, napak pipet, ki smo jih uporabili tekom analize ali ocenjene napake tehtanja ( $\pm 2$  mg).

#### **4.2.2.4 VPLIV DODANEGA 0,5M NaOH NA RAZTAPLJANJE OBORINE PRI PRIPRAVI VZORCA ZA KOLORIMETRIČNO REAKCIJO**

V poskusu opisanem v poglavju 4.2.2.3 je bil glavni problem slabo razapljanje oborine v dH<sub>2</sub>O. Da bi povečali razapljanje oborine, smo se odločili za poskus, kjer smo na stopnji priprave vzorca za FŽ-reakcijo dodali raztopini polisaharidov 0,5M vodno raztopino NaOH. Odločili smo se tudi za poenostavitev poskusa opisanega pod 4.2.2.3, saj smo ugotovili, da je delitev oborine na polovico precej zahtevno. Le-ta je bila namreč mokra in se je prijemala na stene epruvete.

Poskus smo začeli tako, da smo v dve 50 ml plastični epruveti odpipetirali 5 ml sirupa, dodali 5 ml dH<sub>2</sub>O ter nato še 40 ml 96 % EtOH. Epruveti smo postavili za 60 min v

hladilnik na 4 °C, nato je sledilo centrifugiranje (10 min,  $7500 \times g$ , 21 °C). Nastali oborini v epruveti smo dvakrat sprali s 50 ml 80 % EtOH ter ponovno centrifugirali. Nato smo odlili supernatant ter pustili stati 15 min na zraku pri sobni T, da smo zagotovili blago sušenje. V prvo epruveto smo v nadaljevanju dodali 4 ml dH<sub>2</sub>O, v drugo epruveto 4 ml 0,5 M NaOH in ju postavili v ultrazvočno kadičko za 30 min, vmes pa smo na vsakih 5 min dobro premešali raztopine na vibracijskem mešalu. V epruveti, kamor smo dodali 4 ml dH<sub>2</sub>O, se oborina ni raztopila v celoti, zato smo jo ponovno centrifugirali, da se je oborina zopet posedla, v drugi epruveti, kamor smo dodali 4 ml 0,5M NaOH, se je oborina popolnoma raztopila. V dve 2 ml plastični epruveti smo odpipetirali po 1 ml supernatanta iz vsake od 15 ml epruvet in dodali 1 ml dH<sub>2</sub>O. Raztopini smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku ter tako dobili vzorca polisaharidov, ki smo ju analizirali s FŽ-reakcijo po postopku opisanim pod 3.2.2.2.b. Za vsak vzorec vodne raztopine polisaharida smo naredili 3 paralele po 5 ponovitev FŽ-reakcije v mikrotitrski ploščici.

Preglednica XV: Vizualno spremjanje nastalih oborin v dveh paralelah med postopkom (4.2.2.4)

|  | <b>1. paralela</b>   | <b>2. paralela</b>                       |
|--|--|--|
| po 1. centrifugiraju, ko smo epruveti vzeli iz hladilnika                                | na oku sta nastali enako veliki oborini temno–rjave barve  |  |
| po 1. spiranju   | po spiranju z 80 % EtOH, sta se obe oborini podobno suspendirali, v vsaki od epruvet je bila videna ena malo večja oborina, peleta (približno 1ml velika) in veliko majhnih delcev |  |
| po 2. spiranju   | po spiranju z 80 % EtOH, sta se obe oborini podobno suspendirali in premešali  |  |
| 1. paralela - po dodatu 4 ml dH <sub>2</sub> O<br>2. paralela - po dodatu 4 ml 0,5M NaOH | <u>ni se popolnoma raztopila vsa oborina</u>   | <u>oborina se je popolnoma raztopila</u> |

Preglednica XVI: Vpliv dodanega 0,5 M NaOH na razapljanje oborine

| PARALELA                                | Raztopina polisaharidov (oborino smo razapljalji v 4 ml dH <sub>2</sub> O) | Raztopina polisaharidov (oborino smo razapljalji v 4 ml 0,5 M NaOH) |
|---|--|---|
|   | <b>A<sub>končna</sub></b>  | <b>A<sub>končna</sub></b>   |
| 1. PARALELA                             | 0,9452   | 0,8605  |
| 2. PARALELA                             | 1,0084   | 0,9013  |
| 3. PARALELA                             | 1,1519   | 0,9378  |
| povprečje 3 paralel A <sub>končna</sub> | <b>1,0352</b>  | <b>0,8999</b>   |

Med postopkom smo ves čas vizualno spremljali obliko, velikost in barvo oborine (Preglednica XV). Tekom vizualnega pregleda oborin smo mislili, da nam je dodatek NaOH res pomagal pri razapljanju oborine. Glede na končne rezultate izmerjenih absorbanc (Preglednica XVI) pa tega ne moremo potrditi, saj smo dobili višje absorbance raztopin, za vzorce, kjer smo oborino raztoplili v 4 ml dH<sub>2</sub>O. Višje absorbance pa kažejo na večje količine polisaharidov. Opustili smo optimizacijo analizne metode z dodatkom NaOH, saj nam le-ta ni doprinesel izboljšav.

## 4.3 ULTRAFILTRACIJA IN SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV SAHARIDOV

**predstopnja**

IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ SIRUPA  
priprava frakcije polisaharidov in odstranitev sladkorjev z  
metodo ultrafiltracije

DOLOČITEV POLISAHARIDOV S  
FŽ-REAKCIJO  
V MIKROTITRSKI PLOŠČICI

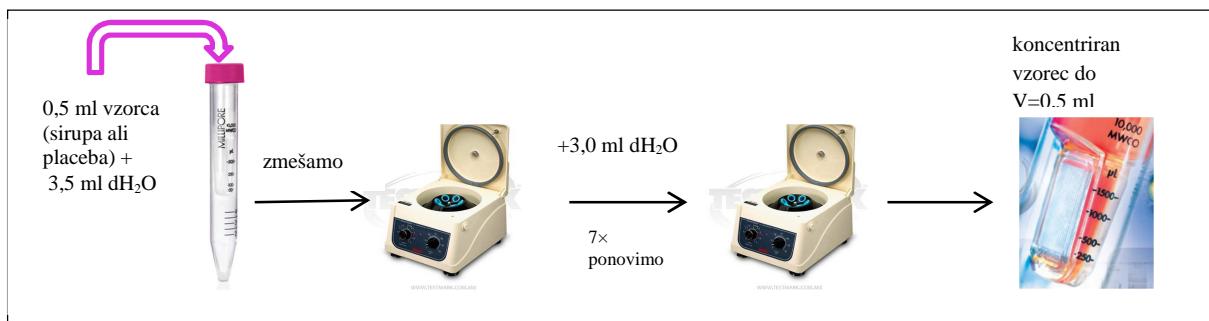
Slika 21: Shematični pregled izvedenih postopkov ultrafiltracije in kolorimetrične reakcije

### I. OSNOVNI POSTOPEK

Potek vseh uporabljenih metod shematično prikazuje Slika 21.

#### a) IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ SIRUPA

Vzeli smo 15 ml plastične epruvete za ultrafiltracijo, ki so vsebovale membrano z določeno velikostjo por. V nastavek epruvete smo odpipetirali 0,5 ml vzorca (sirupa ali placebo) ter vzorcu dodali 3,5 ml dH<sub>2</sub>O. S pipeto smo trikrat dobro premešali vsebino v nastavku. Sledilo je centrifugiranje epruvet pri  $7500 \times g$  in 21 °C toliko časa, da smo dobili končni volumen koncentrirane raztopine v nastavku približno 0,5 ml. V vsak nastavek smo ponovno dodali 3 ml dH<sub>2</sub>O, vsebino dobro premešali s pipeto ter epruvete ponovno centrifugirali do končnega volumna raztopine v nastavku približno 0,5 ml. Postopek smo ponovili 7×, saj smo teoretično izračunali, kolikokrat moramo sprati vzorec z dH<sub>2</sub>O, da se bo sprala večina saharoze iz vzorca. Potek dela je prikazan na Sliki 22. Približno 0,5 ml raztopine, ki je ostala v nastavku v epruveti po 7× spiranju, smo prenesli v 1,5 ml plastično epruveto ter dopolnili z dH<sub>2</sub>O do 1,0 ml oznake na 1,5 ml epruveti. 1,5 ml epruveto smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Od tako pripravljenih raztopin v 1,5 ml epruveti smo odpipetirali vzorce za izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrskih ploščicah.



Slika 22: Prikaz priprave frakcije polisaharidov iz vzorca z metodo ultrafiltracije

#### b) SPEKTROFOTOMETRIČNA DOLOČITEV POLISAHARIDOV

Z validiranim končnim postopkom FŽ-reakcije v mikrotitrski ploščici (3.2.2.2.b) smo določili vsebnost saharidov v analiziranem vzorcu.

Vsi rezultati so prikazani kot ekvivalenti saharoze, na podlagi umeritvene krivulje (Graf 3).

### **4.3.1 OPTIMIZACIJA CELOTNEGA POSTOPKA (IZOLACIJE POLISAHARIDOV IN NJIHOVEGA KVANTITATIVNEGA VREDNOTENJA)**

#### **4.3.1.1 Ultrafiltracija z velikostjo por v membrani 3,0 kD**

##### **a) 1. POSKUS**

Poskus smo naredili tako, kot je opisan pod osnovnim postopkom (4.3). Ker so bile dobljene absorbance raztopin vzorcev previsoke za merjenje na spektrofotometru TECAN, smo naredili redčitve ( $10\times$ ,  $50\times$ ,  $100\times$ ,  $200\times$ ) ter ponovili FŽ-reakcijo (3.2.2.2.b)

Preglednica XVII: Masa<sub>(saharidov)</sub> v 0,5 ml vzorca sirupa ali placeba po 7× spiranju z dH<sub>2</sub>O

| REDČITVE | vzorec  | m <sub>(saharidov)</sub> V<br>0,5 ml začetnega odpipetiranega vzorca | REDČITVE | vzorec  | m <sub>(polisaharidov)</sub> V<br>0,5 ml začetnemu odpipetiranemu vzoru |
|----------|---------|--|----------|---------|---|
| 10×      | sirup   | 3,11 mg  | 100×     | sirup   | 2,86 mg   |
|          | placebo | 4,94 mg  |          | placebo | 4,55 mg   |
| 50×      | sirup   | 2,61 mg  | 200×     | sirup   | 2,32 mg   |
|          | placebo | 4,46 mg  |          | placebo | 5,76 mg   |

Iz preglednice XVII lahko vidimo, da je masa saharidov v placebu vzorcih visoka. Želeli pa smo dobiti čim nižje vrednosti, saj bi nam tako rezultat dokazoval, da smo se znebili vseh mono-, di- in oligosaharidov. Zato smo se odločili, da bomo poskus ponovili z uvedbo treh dodatnih spiranj raztopin vzorcev, obenem pa smo bili posebej pozorni, da smo vzorce na stopnji vsakega spiranja z dH<sub>2</sub>O dobro premešali.

##### **b) 2. POSKUS**

Poskus smo ponovili tako, kot je opisano v osnovnem postopku (4.3), s tem da smo bili res posebej pozorni na to, da smo pri vsakem spiranju s 3 ml dH<sub>2</sub>O v nastavku epruvet za ultrafiltracijo, raztopino **dobro premešali**. To smo naredili tako, da smo s pipeto trikrat potegnili vsebino noter v nastavek pipete in nazaj ven v epruveto. S premešanjem raztopin smo zagotovili enakomernejšo porazdelitev delcev v raztopini vzorca ter tako bolj učinkovito spiranje raztopine polisaharidov. S tem smo se izognili tudi posedanju delcev vzorca na dno nastavka v epruveti. Po 7× spiranju smo pripravili vzorec za FŽ-reakcijo tako, da smo od približno 0,5 ml raztopine vzorca v nastavku, odpipetirali po 20 µl vzorca ter dodali 2000 µl dH<sub>2</sub>O ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b). Vsebino, ki je ostala v nastavku v epruveti, smo nato še dodatno 3× sprali s 3 ml dH<sub>2</sub>O in ponovno pripravili 100× razredčen vzorec za izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrski ploščici ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b).

Preglednica XVIII: Masa<sub>(saharidov)</sub> v 0,5 ml vzorca sirupa ali placebo po 7× in 10× spiranju z dH<sub>2</sub>O

| po 7× spiranju   | vzorec  | m <sub>(saharidov)</sub> v 0,5 ml začetnega odpipetiranega vzorca | po 10× spiranju  | vzorec  | m <sub>(saharidov)</sub> v 0,5 ml začetnemu odpipetiranemu vzorcu |
|------------------|---------|---|------------------|---------|---|
| REDČITVE<br>100× | sirup   | 0,118 mg  | REDČITVE<br>100× | sirup   | 0,243 mg  |
|                  | placebo | 0,154 mg  |                  | placebo | 0,077 mg  |

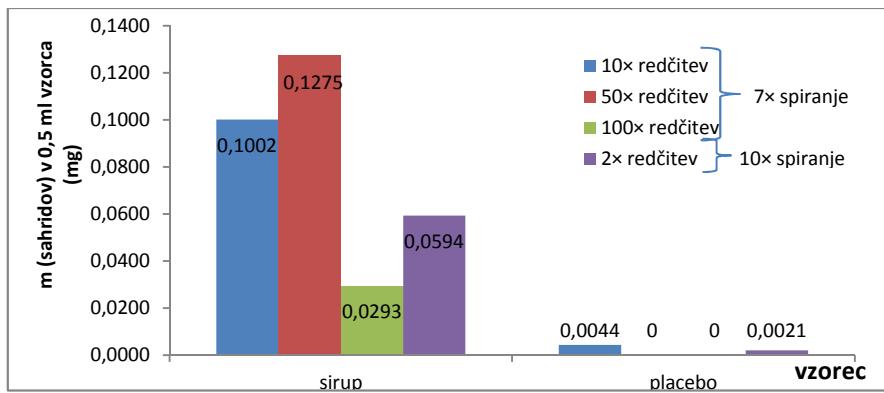
Če primerjamo dobljene mase saharidov (izraženi kot ekvivalenti saharoze) v Preglednici XVII in XVIII, lahko vidimo, da so v Preglednici XVII rezultati skoraj za faktor 10× višji. Vzrok za to je najverjetneje premalo premešana raztopina v prvem poskusu (Preglednica XVII), tako so se vsi saharidi najverjetneje posedli na dno nastavka epruvete za ultrafiltracijo. Ko smo pripravili vzorec za FŽ-reakcijo v prvem poskusu, je ta poleg želenih polisaharidov vseboval tudi druge monosaharide, disaharide, oligosahride in polisaharide. Zagotovo vemo, da je bila prisotna saharozna kajti nahajala se je tako v sirupu kot v placebo. Za to so bile absorbance in posledično tudi mase saharidov precej višje kot v drugem primeru (Preglednica XVIII). V 2. poskusu, kjer smo bili posebej previdni, da smo ob vsakem spiranju raztopine z dH<sub>2</sub>O, vzorce dobro premešali s pipeto, pa smo dobili nižje vrednosti. Če predpostavimo, da smo v 2. poskusu sprali vse monosaharide in disaharide, nam mase saharidov predstavljaljo le tisti del saharidov, ki so večji od 3kD.

#### 4.3.1.2 Ultrafiltracija z velikostjo por v membrani 10,0 kD

Ker je bilo delo v 15 ml plastičnih epruvetah z velikostjo por v membrani 3,0 kD precej zamudno, smo se odločili, da poskusimo metodo v epruvetah za ultrafiltracijo z velikostjo por v membrani 10,0 kD. S slednjimi epruvetami smo tako pripravili frakcije polisaharidov, ki so bili večji od 10 kD in so tako po spiranju z dH<sub>2</sub>O ostali v nastavku epruvete. Vse druge molekule, ki so bile manjše od 10 kD, pa so prehajale v permeat.

##### a) 1. POSKUS: OSNOVNI POSKUS

Poskus smo naredili tako, kot je opisano v osnovnem postopkom (4.3). Po sedmih spiranjih vzorca (0,5 ml sirupa ali placebo) smo naredili 10×, 50× in 100× redčitve raztopine, ki je ostala v nastavku epruvete ter tako pripravljene vzorce uporabili za izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrski ploščici (3.2.2.2.b). Več različnih redčitev smo naredili zato, da bi pridobili najbolj optimalno koncentracijsko območje vzorca, ki nam bi dajala ustrezni odziv na spektrofotometru. Vsebino, ki je ostala v nastavku v epruveti po odvzetih vzorcih, smo nato še dodatno 3× sprali in pripravili dvakrat razredčen vzorec ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b).



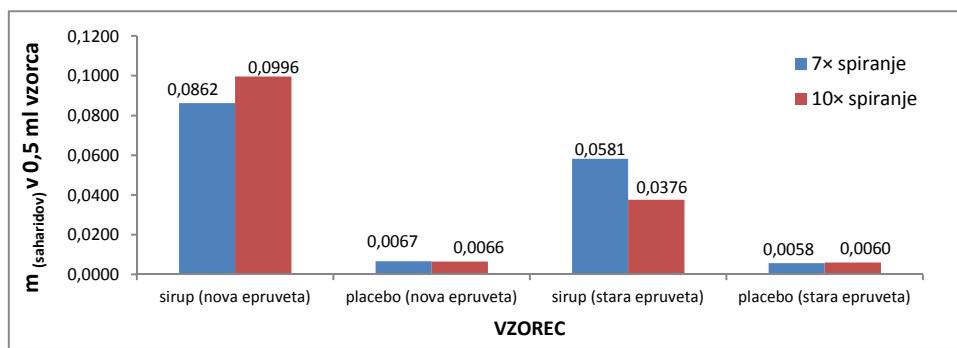
Slika 23: Masa<sub>(saharidov)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 0,5 ml vzorca po 7× in 10× spiranju (osnovni poskus)

Vrednost absorbance za slepo raztopino je bila 0,05646 (Priloga - 7.2.1.1) Ta je bila zelo podobna vrednosti absorbance za raztopino polisaharidov, ki smo jo 100× redčili (0,05836). Tako smo ugotovili veliko napako meritev, saj je bila vrednost slepe raztopine blizu vrednostim vzorca in tako nismo mogli dobro zaupati končnim rezultatom. Na podlagi rezultatov (Slika 23) po 7× spiranju smo zaključili, da je smiselno narediti manjšo razredčitev vzorca, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za FŽ-reakcijo, saj smo na ta način povečali odziv na spektrofotometru in s tem dobili višje vrednosti izmerjenih absorbanc za vzorce. V primeru 10× redčitve je absorbanca skoraj enkrat večja kot vrednost absorbance za slepo raztopino. Na ta način je vpliv napake manjši in tako lahko bolj zaupamo dobljenim rezultatom. Odločili smo se, da bomo v naslednjih poskusih naredili manjše redčitve in sicer zgolj 2× redčenje raztopin vzorcev. Iz rezultatov po 10× spiranju lahko zaključimo, da je v 0,5 ml sirupa 0,0594 mg saharidov, ki so večji od 10 kD. Če predpostavimo, da smo se s spiranjem znebili vseh mono-, di-, oligo- ter polisaharidov manjših od 10 kD, nam dobljeni rezultat prikazuje maso polisaharidov večjih od 10 kD v sirupu, izraženo kot ekvivalent saharoze. Dobljeni rezultat tako predstavlja le 3,71 % polisaharidov, glede na literurne podatke, ki je torej 1,6 mg/0,5 ml sirupa (Preglednica XXII). Če bi rezultat podali kot ekvivalente kakšnega drugega sladkorja, bi bil rezultat lahko večji ali manjši, odvisno od izbranega sladkorja, za katerega bi pripravili umeritveno krivuljo (18, 22, 24).

## b) 2. POSKUS: RABLJENI FILTRI

Vzeli smo dve novi in dve stari epruveti za ultrafiltracijo. Stare epruvete so bile že uporabljene, vendar dobro pomite. Namen dela s starimi epruvetami je bil ta, da smo preverili, če med izvedbo poskusa membrana v nastavku epruvete na kakršen koli način poškoduje oziroma, če pride do zamašitve por v membrani nastavka epruvete. Poleg tega

pa smo želeli varčevati z materialom, saj so takšne epruvete drage. V eno novo in eno staro smo v nastavek odpipetirali 0,5 ml sirupa, v drugo novo in drugo staro 0,5 ml placeba ter jih 7× sprali z dH<sub>2</sub>O in koncentrirali do 0,5 ml. Nato smo odpipetirali po 50 µL vzorca iz končnega koncentriranega vzorca v 0,5 ml plastične epruvete ter dodali 50 µL dH<sub>2</sub>O (2× redčenje). Tako pripravljeni dvakrat razredčene vzorce smo uporabili za izvedbo FŽ-reakcije ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b). Preostanek raztopine v nastavkih starih in novih epruvetah smo nato še 3× spirali. Po končanem spiranju smo odpipetirali po 100 µL vzorca iz končnih raztopin v 0,5 ml plastične epruvete ter jim dodali po 100 µL dH<sub>2</sub>O. 0,5 ml plastične epruvete smo zmešali na vibracijskem mešalu ter od tako pripravljenih raztopin odpipetirali vzorce za izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrskih ploščicah ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b).



Slika 24: Masa<sub>(saharidose)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 0,5 ml vzorca (rabljeni filtri)

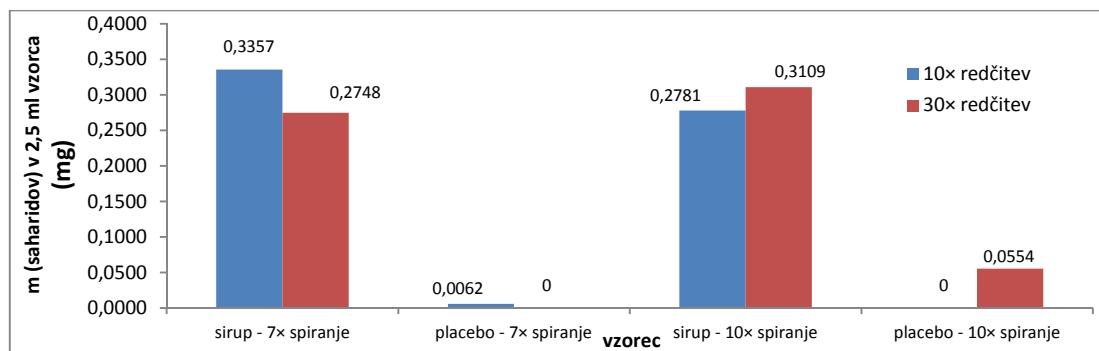
Iz Slike 24 je razvidno, da so mase saharidov za vzorec placeba po 7× in 10× spiranju ostale zelo podobne. Glede na rezultate pri placebo poskusih vemo, da se po 10× spiranju nismo znebili vse saharoze, ki je prisotna v vzorcu, čeprav je njena MM manjša od 10 kD. Prvi vzrok bi lahko bil, da se en del saharoze veže na pore membrane v nastavku 15 ml plastične epruvete za ultrafiltracijo, drugi pa da sahariza reagira s plastiko, kar onemogoča prehod saharoze preko por membrane. Ker pa vemo, da vzorec sirupa vsebuje določen delež saharoze, lahko sklepamo, da del rezultata, ki predstavlja količino saharidov v sirupu, lahko predstavlja del saharoze, ki se ni sprala po vseh izvedenih spiranjih.

Če primerjamo rezultate mas saharidov v 0,5 ml sirupa, opazimo neponovljivost rezultatov. Vzrok za to bi lahko bilo naključno odpipetiran vzorec sirupa, ki je vseboval večjo ali manjšo količino polisaharidov, večjih od 10 kD. Če sirupa nismo pretresli pred odpipetiranjem vzorca za analizo, so bile večje molekule najverjetneje na dnu steklenice s sirupom in jih tako nismo zajeli v analizo. V primeru dobro pretresene steklenice sirupa, pa smo zagotovili ustrezno porazdelitev molekul v sirupu. V naslednjih poskusih smo bili

posebej pozorni, da smo pred odpipetiranjem vzorca za analizo steklenico pretresli. Drugi vzrok bi lahko bil, da je bila membrana s porami v nastavku že uporabljene, a oprane stare epruvete poškodovana in smo tako pri spiranju raztopine vzorca izgubili določen del polisaharidov.

### c) 3. POSKUS: VEČJA KOLIČINA SIRUPA

V nastavek prve epruvete smo odpipetirali 0,5 ml sirupa, v nastavek druge pa 0,5 ml placebo ter dodali 3,5 ml dH<sub>2</sub>O. Po premešanju, centrifugiranju ter koncentriranju raztopin vzorca približno 0,5 ml, smo v vsak nastavek epruvete dodali 0,5 ml novega vzorca sirupa ali placebo ter 3 ml dH<sub>2</sub>O. Po premešanju in centrifugiranju smo postopek še 3× ponovili, tako, da je bila skupna količina vsega sirupa in placebo, ki smo ga vnesli v analizo v posamezen nastavek epruvete 2,5 ml. Po zadnjem odpipetirjanju vzorcev smo raztopine v nastavkih 7× sprali z dH<sub>2</sub>O ter koncentrirali vzorce do 0,5 ml. Pripravili smo 10× in 30× redčene vzorce ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b). Preostanek raztopine v nastavku posameznih epruvet smo nato še 3× sprali. Zopet pripravili 10× in 30× redčene vzorce ter izvedli FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah (3.2.2.2.b).

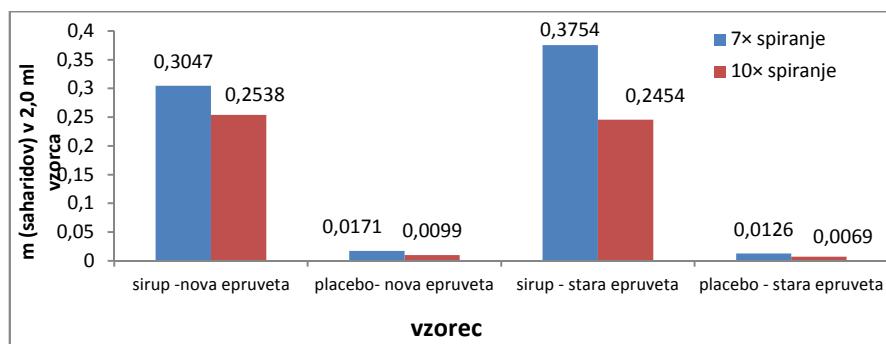


Slika 25: Masa<sub>(saharidov)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 2,5 ml vzorca (večje količine)

Glede na rezultate 10× redčitve za vzorec placebo lahko zaključimo, da je bilo 10× spiranje vzorca zelo pomembno, saj se na ta način znebimo večino mono-, di-, oligo- in polisaharidov, ki so manjši od 10kD. V 2,5 ml sirupa smo določili maso saharidov 0,28 mg. Torej je teoretično v 0,5 ml sirupa masa saharidov 0,06 mg. Vsebnost mase saharidov v 0,5 ml sirupa po 10× spiranju je glede na rezultate iz 2. poskusa v poglavju 4.3.1.2 približno sredinska vrednost mas saharidov, saj smo dobili vrednosti mase saharidov po 10× spiranju za vzorce sirupa od 0,10 do 0,04 mg.

#### d) 4. POSKUS: ANALIZA 2 ml VZORCA

V eno novo in eno staro epruveto smo v nastavek odpipetirali 1 ml sirupa, v drugo novo in drugo staro pa 1 ml placebo ter dodali 3,5 ml dH<sub>2</sub>O. Po premešanju, centrifugiranju ter koncentriranju raztopin vzorca približno 0,5 ml, smo v vsak nastavek epruvete dodali 1 ml novega vzorca sirupa ali placebo ter 2,5 ml dH<sub>2</sub>O. Po premešanju in centrifugiranju smo vzorce 7× sprali z dH<sub>2</sub>O in koncentrirali do 0,5 ml. Od končne raztopine, ki je ostala v posameznem nastavku epruvete, smo odpipetirali 50 µL vzorca v 0,5 ml plastične epruvete ter dodali 50 µL dH<sub>2</sub>O. Tako pripravljene, dvakrat razredčene in premešane vzorce, smo uporabili za kvantitativno vrednotenje vsebnosti saharidov s FŽ-reakcijo (3.2.2.2.b). Preostanek raztopine smo nato še 3× spirali z dH<sub>2</sub>O do približno 0,5 ml. Po končanem spiranju smo pripravili dvakrat razredčene vzorce ter izvedli kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b).



Slika 26: Masa<sub>(saharidov)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 2,0 ml vzorca

Glede na Sliko 26 lahko trdimo, da je ponovljivost rezultatov boljša glede na prejšnje poskuse (Slika 23, Slika 24, Slika 25), saj so vrednosti po 10× spiranju za sirup v novi in starji epruveti primerljivi. Tudi vrednosti za vzorec placebo so nizke, kar pomeni, da smo dobro sprali vzorce in se tako znebili skoraj vseh molekul manjših od 10 kD. Tako zopet lahko potrdimo, da je 10× spiranje nujno in potrebno za doseg bolj ponovljivih rezultatov.

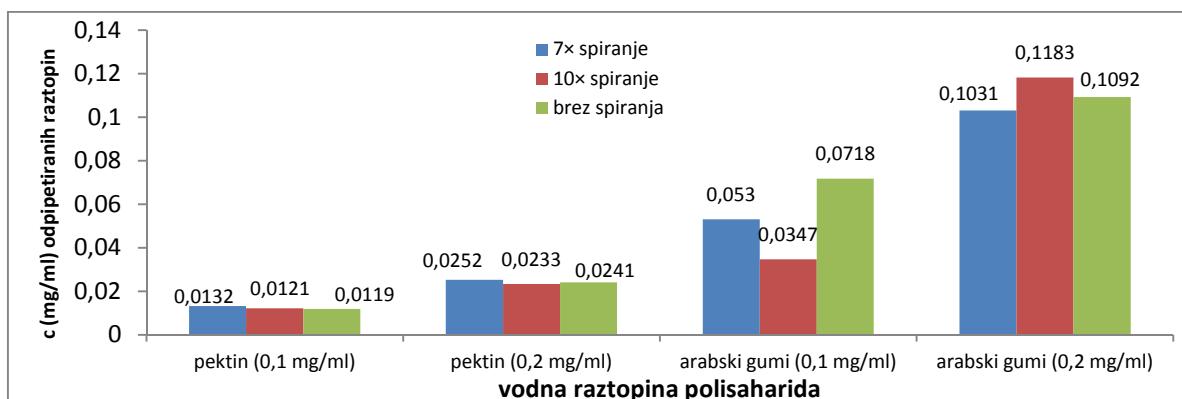
#### e) 5. POSKUS: STANDARD POLISAHARIDA V VODI

Poskus smo naredili po postopku, opisanem pod 4. poskusom (4.3.1.2.d). Namesto sirupa in placebo smo kot osnovna vzorca uporabili raztopini pektina in arabskega gumija v dH<sub>2</sub>O, z dvema različnima koncentracijama. Raztopine polisaharidov v dH<sub>2</sub>O smo tudi direktno odpipetirali v mikrotitrsko ploščico (Slika 27). Torej jih nismo 7× in 10× spirali z dH<sub>2</sub>O, temveč smo od osnovnih raztopin odpipetirali po 50µL raztopine in naredili FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah (3.2.2.2.b).

Pripravljene raztopine polisaharidov v dH<sub>2</sub>O so bile:

- raztopina pektina v dH<sub>2</sub>O s koncentracijo c = 0,1 mg/ml
- raztopina pektina v dH<sub>2</sub>O s koncentracijo c = 0,2 mg/ml
- raztopina arabskega gumija v dH<sub>2</sub>O s koncentracijo c = 0,1 mg/ml
- raztopina arabskega gumija v dH<sub>2</sub>O s koncentracijo c = 0,2 mg/ml

VZORCI



Slika 27: Koncentracija<sub>(saharidov)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 2,0 ml vzorca (vodni raztopini pektina in arabskega gumija s c=0,1 mg/ml in c=0,2 mg/ml) – standard polisaharida v vodi

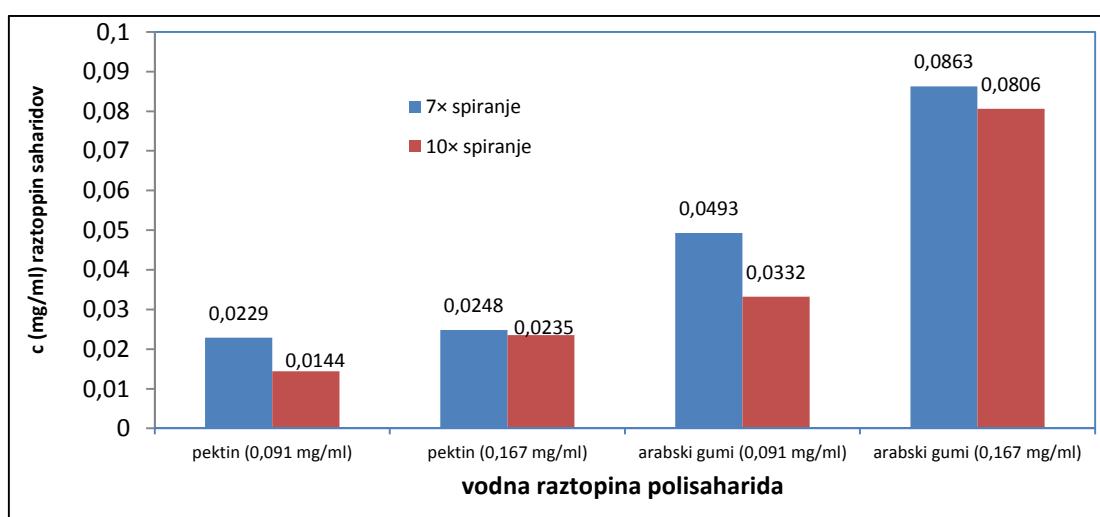
S tem poskusom (Slika 27) smo pripravili pozitivne kontrole, in sicer vodne raztopine pektina in arabskega gumija, z dvema različnima koncentracijama. Ko smo analizirali raztopini pektina s c=0,1 mg/ml in c=0,2 mg/ml, smo po koncu FŽ-reakcije določili skoraj 10× nižje koncentracije, v primeru raztopine arabskega gumija pa približno 2× nižje koncentracije, v primerjavi s koncentracijami osnovnih raztopin pektina in arabskega gumija. Koncentracije raztopin saharidov, ki smo jih določili v raztopinah, smo izrazili kot ekvivalente saharoze, glede na umeritveno krivuljo saharoze (Graf 3). Če bi preračunali koncentracije raztopin saharidov kot ekvivalente drugih monosaharidov ali polisaharidov, bi lahko dobili povsem druge rezultate. Prednost izražanja saharidov kot ekvivalente saharoze je v tem, da imamo ves čas znano in enako sestavo saharoze, medtem ko polisaharidi niso vedno enake sestave. Ker ne poznamo sluzi, ki sestavljajo sirup, ne moremo točno opredeliti, kako reaktivni so polisaharidi, ki so prisotni v njem. Tako so lahko sluzi reaktivne kot sahariza ali kakšen polisaharid. Zaradi primerljivosti dobljenih rezultatov je torej pomembno, da rezultate podajamo kot ekvivalente ene spojine.

## f) 6. POSKUS: STANDARD POLISAHARIDA V PLACEBU

Poskus smo naredili po postopku, opisanem pod 4. poskusom (4.3.1.2.d). Namesto sirupa in placebo smo pripravili raztopini pektina in raztopini arabskega gumija v dH<sub>2</sub>O, tako da smo 10 mg pektina oziroma arabskega gumija raztopili v 10 ml dH<sub>2</sub>O in dobili raztopini s c=1 mg/ml. Nato smo odpipetirali:

- 1 ml raztopine s c=1 mg/ml ter dodali 10 ml raztopine saharoze v vodi (placebo)
- 1 ml raztopine s c=1 mg/ml ter dodali 5 ml raztopine saharoze v vodi (placebo)

} VZORCI



Slika 28: Koncentracija<sub>(saharidov)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 2,0 ml vzorca (vodni raztopini pektina in arabskega gumija s c=0,091 mg/ml in c=0,167 mg/ml) – standard polisaharida v placebo

Iz Slike 28 lahko zaključimo, da je pri enkrat višji koncentraciji vodne raztopine polisaharida tudi skoraj enkrat večja koncentracija izmerjenih saharidov. Vidimo, da so dobljene koncentracije, preračunane iz izmerjenih absorbanc preko umeritvene krivulje za saharozo (Graf 3), za vodni raztopini pektina približno 15× manjše od koncentracije osnovnih vodnih raztopin pektina. Pri vodnih raztopinah arabskega gumija so dobljene koncentracije raztopin saharidov 2-3× manjše od koncentracije osnovnih vodnih raztopin arabskega gumija. Le-te smo izrazili kot ekvivalente saharoze. Rezultati so primerljivi z rezultati iz 5. poskusa, Slika 27.

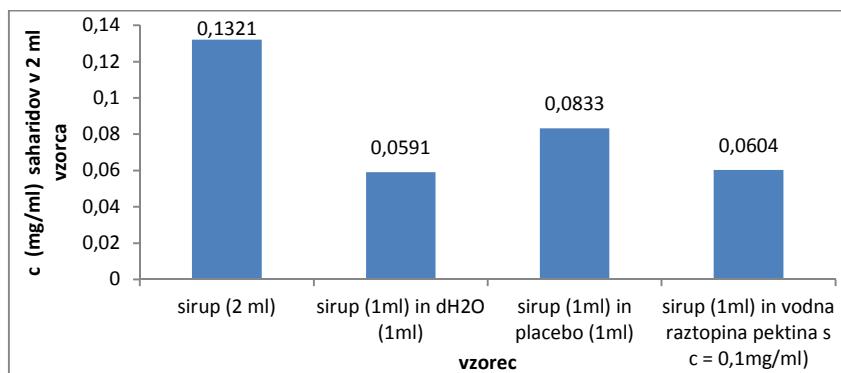
V opisanem poskusu smo znova potrdili, da je za boljšo ponovljivost rezultatov potrebno 10× spirati vzorce. Na ta način zagotovimo ustrezno spran vzorec, kjer ni več nečistot ali saharidov manjših od 10 kD ter nam rezultat predstavlja le željene izolirane polisaharide večje od 10 kD.

## g) 7. POSKUS: 10× SPIRANJE

Poskus smo naredili po postopku, opisanem pod 4. poskusom (4.3.1.2.d). Namesto sirupa in placebo smo uporabili naslednje vzorce:

1. VZOREC: 2 ml sirupa
2. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml placebo
3. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml dH<sub>2</sub>O
4. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=0,1 mg/ml

Spremembu v primerjavi s 4. poskusom (4.3.1.2.d) je bila, da smo vzorce direktno 10× sprali, saj smo glede na prejšnje poskuse zaključili, da je 10× spiranje potrebno. Po zadnjem spiranju smo v 0,5 ml plastične epruvete odpipetirali 100 µL vzorca iz končnih raztopin ter jim dodali 100 µL dH<sub>2</sub>O. 0,5 ml epruvete smo zmešali na vibracijskem mešalniku in od tako pripravljenih raztopin odpipetirali vzorce za izvedbo FŽ-reakcije v mikrotitrskih ploščicah ter naredili kolorimetrično reakcijo (3.2.2.2.b).



Slika 29: Koncentracija<sub>(saharidov)</sub> (kot ekvivalent saharoze) v 2,0 ml vzorca – 10× spiranje

Na Sliki 29 lahko opazimo linearnost, če primerjamo vzorec, kjer smo odpipetirali 2 ml sirupa z vzorec, kjer smo odpipetirali 1 ml sirupa in 1 ml dH<sub>2</sub>O. Torej ob 2× večjem volumnu odpipetiranega sirupa dobimo tudi večji odziv in posledično tudi 2,2× večjo koncentracijo saharidov, izraženih kot ekvivalente saharoze. Ob analizi rezultata vzorca, kjer smo odpipetirali 1 ml sirupa in 1 ml placebo vidimo, da se kljub 10× spiranju nismo znebili vse saharoze iz placebo. Mogoče se določen del saharoze veže na pore nastavka epruvet za ultrafiltracijo ali reagira s plastiko in je zato nismo mogli sprati. Prisotni ostanki saharoze tako prispevajo k celokupni višji koncentraciji izmerjenih saharidov. V primeru vzorca, kjer smo odpipetirali 1 ml sirupa in 1 ml vodne raztopine pektina, pa težko zaključimo, da vodna raztopina pektina prispeva določen delež saharidov k rezultatu, saj je rezultat podoben tistemu, ki smo ga dobili ob analizi vzorca 1 ml sirupa in 1 ml dH<sub>2</sub>O. V nadaljevanju smo poskusili analizo narediti z višjo koncentracijo vodne raztopine pektina v sirupu.

## h) 8. POSKUS: TEHTANJE VZORCA

Poskus smo naredili po postopku, opisanem pod 4. poskusom (4.3.1.2.d). Z namenom dobiti bolj natančne rezultate, smo stehtali vzorec, ki smo ga uporabili pri analizi. Namesto sirupa in placebo, smo uporabili naslednje vzorce:

**Vzorci: 1,0 ml dH<sub>2</sub>O + 1,0 ml vodne raztopine pektina različnih koncentracij**

1. VZOREC: 1,0 ml dH<sub>2</sub>O + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=0,5 mg/ml
2. VZOREC: 1,0 ml dH<sub>2</sub>O + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=1,0 mg/ml
3. VZOREC: 1,0 ml dH<sub>2</sub>O + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=2,5 mg/ml

**Vzorci: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina različnih koncentracij**

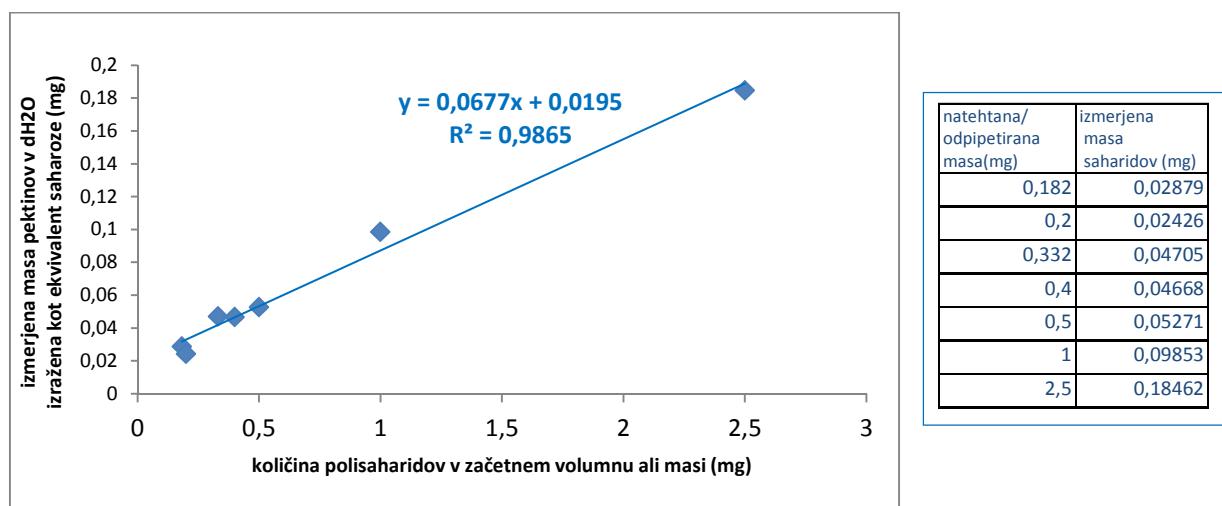
### 1. paralela

1. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=0,5 mg/ml
2. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=1,0 mg/ml
3. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=2,5 mg/ml
4. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=5,0 mg/ml

### 2. paralela

1. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=0,5 mg/ml
2. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=1,0 mg/ml
3. VZOREC: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina s c=2,5 mg/ml

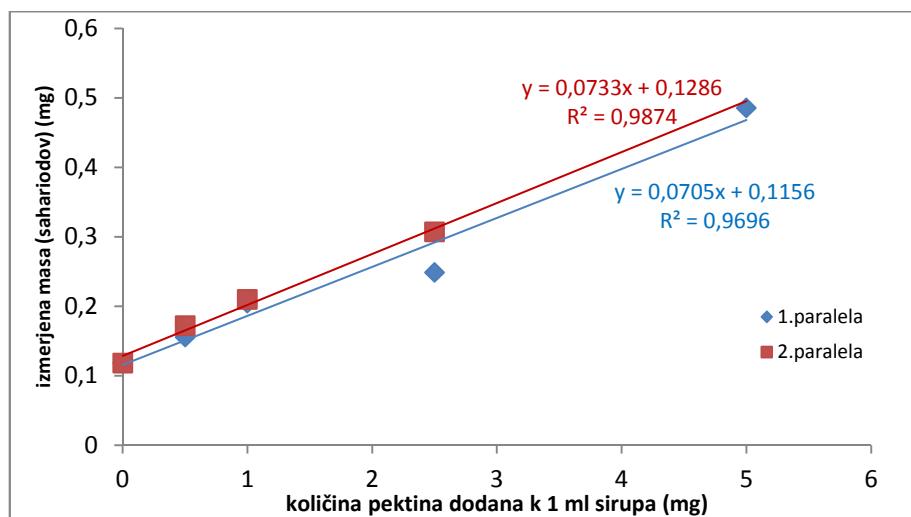
Tudi pri tem poskusu smo vzorce direktno 10× sprali, brez vmesnega odvzema vzorcev po 7× spiranju.



Graf 6: Masa<sub>(pektina)</sub>, izražena kot ekvivalent saharoze, v odvisnosti od količine polisaharidov v začetnem volumnu ali masi

Graf 6 prikazuje izmerjeno količino pektinov v dH<sub>2</sub>O (mg) v odvisnosti od natehtane oz. odpipetirane mase (mg). Rezultati so zbrani iz 5., 6. in 8. poskusa (4.3.1.2)

Zaključimo lahko, da je celotna metoda, torej koncentriranje analita in njihovo kvantitativno vrednotenje s FŽ-reakcijo, linearna. Na odstopanje od popolne linearnosti pa lahko vpliva določen delež napake pri vrednotenju natančnosti metode (Glej 4.3.2.a).



Graf 7: Masa<sub>(saharidov)</sub>, izražena kot ekvivalent saharoze, v odvisnosti od količine pektina dodanega k 1 ml sirupa

Graf 7 prikazuje odnos med izmerjeno maso saharidov (izraženo kot ekvivalente saharoze) v odvisnosti od količine pektina dodanega k 1 ml sirupa za dve zaporedni paraleli. Ocenili smo, da je bila linearnost za prvo paralelo  $R^2=0,969$ . Ker smo želeli preveriti ali je tekom postopka prišlo do slučajne napake ali je metoda res nelinearna, smo se odločili za ponovitev postopka. Z drugo paralelo smo ocenili višji linearni odziv med opazovanima spremenljivkama,  $R^2$  je bil 0,987.

Literatura kot možen kriterij ocenjevanja linearnosti navaja Pearsonov koeficient variacije, ki naj bo večji od 0,99 (29). Z drugo paralelo smo se približali zahtevam. Za odstopanje od kriterijev pa je lahko kriva bodisi nelinearnosti metode bodisi posledica slabše ponovljivosti metode.

#### **4.3.2 VALIDACIJA KONČNE METODE (ULTRAFILTRACIJA S SLEDEČO KOLORIMETRIČNO REAKCIJO)**

##### **KONČNI POSTOPEK**

Validacija končne metode ultrafiltracije s sledečo FŽ-reakcijo je potekala tako, da smo najprej pripravili frakcije polisaharidov, večjih od 10,0 kD po postopku opisanim po 3.2.2.1.b, nato pa smo kvantitativno določili vsebnost polisaharidov po postopku 3.2.2.2.b.

##### **a) ZNOTRAJDNEVNA IN MEDDNEVNA PONOVLJIVOST**

Želeli smo določiti znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost celotne metode določanja polisaharidov (ultrafiltracija, ki ji sledi FŽ-reakcija v mikrotitrskih ploščicah). V ta namen smo tri dni zapored v treh ponovitvah naredili končni postopek. Preglednica XIX nam prikazuje rezultate mas saharidov paralel po dnevih in njihove povprečne vrednosti.

Preglednica XIX: Mase<sub>(saharidov)</sub> paralel, kot ekvivalenti saharoze, po dnevih in povprečne vrednosti

|  |             | <b>1. dan</b>                                    | <b>2. dan</b>                                    | <b>3. dan</b>                                    |
|--|-------------|--|--|--|
|  |             | <b>m<sub>(saharidov)</sub> / 1 g vzorca (mg)</b> | <b>m<sub>(saharidov)</sub> / 1 g vzorca (mg)</b> | <b>m<sub>(saharidov)</sub> / 1 g vzorca (mg)</b> |
| 1. PARALELA                                      | 2 ml sirupa | 0,111395 mg saharidov / g mase                   | 0,1133620 mg saharidov / g mase                  | 0,1016609 mg saharidov / g mase                  |
| 2. PARALELA                                      | 2 ml sirupa | 0,105247 mg saharidov / g mase                   | 0,1176535 mg saharidov / g mase                  | 0,0936660 mg saharidov / g mase                  |
| 3. PARALELA                                      | 2 ml sirupa | 0,107429 mg saharidov / g mase                   | 0,113628 mg saharidov / g mase                   | 0,1028546 mg saharidov / g mase                  |
| 4. PARALELA                                      | 2 ml sirupa | 0,108304 mg saharidov / g mase                   | /  | /  |
| <b>m<sub>(saharidov)</sub> / 1 g vzorca (mg)</b> |             | <b>0,108094 mg saharidov / g vzorca</b>          | <b>0,114881 mg saharidov / g vzorca</b>          | <b>0,099394 mg saharidov / g vzorca</b>          |

Relativni standardni odmik treh vzorcev po dnevih:

1.dan – RSD = **2,36 %**

2.dan – RSD = **2,09 %**

3.dan – RSD = **5,03 %**

Relativni standardni odmik povprečnih vrednosti mas nastalih oborin med dnevi:

RSD = **7,22 %**

Pri trikrat oz. štirikrat neodvisni vzporedni ponovitvi celotnega postopka določitve izoliranih polisaharidov iz sirupa, izhaja del variabilnosti rezultatov iz prve faze, del pa iz druge faze. Zaključimo, da je metoda ultrafiltracije s sledečo kvantitativno analizo saharidov za raziskovalne namene dobro ponovljiva znotraj posameznega dne in med dnevi. Na to kažejo nizke vrednosti relativnega standardnega koeficiente.

### 4.3.3 TESTIRANJE VZORCEV SIRUPA

Vzeli smo tri prazne 15 ml plastične epruvete za ultrafiltracijo. V njih smo odpipetirali vzorce sirupa in določali vsebnost polisaharidov po validiranem končnem postopku (4.3.2). Analizirali smo tri različne vzorce sirupa. Za analizo smo odpipetirali približno (točno natehtanega) 2 ml vsakega sirupa.

Preglednica XX: Rezultati treh paralel treh vzorcev sirupa ter povprečne vrednosti, podanih  $m_{(\text{saharidov})}/1 \text{ g vzorca}$  (mg) in izraženih kot ekvivalentni saharoze

|   | SIRUP 1  | SIRUP 2  | SIRUP 3  |
|---|--|--|--|
|   | $m_{(\text{saharidov})} / 1 \text{ g vzorca (mg)}$ | $m_{(\text{saharidov})} / 1 \text{ g vzorca (mg)}$ | $m_{(\text{saharidov})} / 1 \text{ g vzorca (mg)}$ |
| 1. PARALELA   | 0,084658 mg<br>saharidov / g mase                  | 0,079617 mg<br>saharidov / g mase                  | 0,0752616 mg<br>saharidov / g mase                 |
| 2. PARALELA   | 0,0827199 mg<br>saharidov / g mase                 | 0,0931192 mg<br>saharidov / g mase                 | 0,0734189 mg<br>saharidov / g mase                 |
| 3. PARALELA   | 0,074743 mg<br>saharidov / g mase                  | 0,081387 mg<br>saharidov / g mase                  | 0,075959 mg<br>saharidov / g mase                  |
| povprečje $m_{\text{saharidov}}$<br>(vseh treh paralel) | 0,080707 mg<br>saharidov / g mase                  | 0,084708 mg<br>saharidov / g mase                  | 0,07488 mg<br>saharidov / g mase                   |
| sd  | 0,00526  | 0,00734  | 0,00131  |
| RSD   | 6,51 %   | 8,66 %   | 1,75 %   |

Rezultate testiranja sirupov prikazuje Preglednica XX. Sirup 1 in sirup 2 sta se že na prvi pogled razlikovala po viskoznosti od sirupa 3. Sirup 3 je bil bolj tekoč in manj viskozen.

Vzrok temu je lahko drugačna sestava sirupa 3. Ker na viskoznost vzorca vplivajo daljši in bolj kompleksnejši polisaharidi, lahko sklepamo, da vsebuje sirup 3 krajše polisaharide, ki ne naredijo sirupa tako viskoznega kot pri sirupu 1 in sirupu 2. Ostali lastnosti, kot sta barva in vonj sirupa, pa sta bili med sirupi na prvi pogled podobni.

Analiza sirupov je pokazala različne vsebnosti polisaharidov v posameznih sirupih. Najnižjo vsebnost polisaharidov smo določili za sirup 3. Sklepamo lahko, da je sirup 3 vseboval manj polisaharidov ali pa so bili ti krajši. To nam je potrdila že na videz precej nižja viskoznost sirupa 3. Najvišjo vsebnost polisaharidov, izraženih kot ekvivalenti saharoze, smo določili za sirup 2. Slednji je bil glede na konsistenco tudi najbolj viskozen. Sklepamo lahko, da vsebuje veliko polisaharidov, ki so dolgi in kompleksni. Najboljšo ponovljivost metode smo določili pri sirupu 3. To je skladno s pričakovanji, saj je bilo lažje in bolj enakomerno trikrat zaporedoma odvzeti enake količine za analizo vzorca, ker je bil sirup 3 najmanj viskozen. In obratno, najslabšo ponovljivost metode smo določili za sirup 2, ki je bil tudi najbolj viskozen.

## **4.4 PRIMERJAVA GRAVIMETRIČEGA IN SPEKTOFOTOMETRIČNEGA DOLOČANJA POLISAHARIDOV**

V preglednici XXI so zbrani rezultati, ki smo jih dobili pri validaciji končnega postopka gravimetrije in ultrafiltracije s sledečo FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah. Kot vzorec smo v obeh metodah vzeli sirup, ki smo ga kupili v lekarni.

Preglednica XXI: Primerjava gravimetrije in ultrafiltracije s sledečo FŽ-reakcijo

|  | METODA 1                                    | METODA 2  |
|--|---|---|
| ZNOTRAJDNEVNA PONOVLJIVOST                 | <b>GRAVIMETRIJA</b>                         | <b>ULTRAFILTRACIJA S SLEDEČO FŽ-REAKCIJO</b>                      |
| 1. DAN                                     | RSD = 7,41 %                                | RSD = 2,36 %  |
| 2. DAN                                     | RSD = 9,75 %                                | RSD = 2,09 %  |
| 3. DAN                                     | RSD = 5,22 %                                | RSD = 5,03 %  |
| MEDDNEVNA PONOVLJIVOST                     | <b>RSD = 8,83 %</b>                         | <b>RSD = 7,22 %</b>   |
| volumen/masa sirupa, ki smo ga analizirali | <b>10 ml</b>                                | <b>2 ml predstavlja 2,36 g<br/>1 ml sirupa predstavlja 1,23 g</b> |
| količina polisaharidov povprečje treh dni  | <b>46,54 mg polisaharidov</b>               | <b>0,10746 mg saharidov/ g sirupa</b>                             |
| preračunano na 1 ml oziroma na 1 g sirupa  | <b>4,654 mg polisaharidov / 1 ml sirupa</b> | <b>0,10746 mg saharidov/ g sirupa</b>                             |

Pri gravimetričnem postopku smo za analizo odpipetirali 10 ml sirupa. Določili smo 46,54 mg polisaharidov v 10 ml sirupa. Torej je v 1 ml sirupa 4,65 mg polisaharidov. Če to primerjamo z literurnimi podatki (3,2 mg - Preglednica XXII), je vrednost določenih polisaharidov primerljiva. V 1 ml sirupa se nahaja 50 mg lista ozkolistnega trpotca, za katerega literatura navaja vsebnost sluzi v drogi 0,8 % (13) in 50 mg cveta gozdnega slezenovca, za katerega literatura navaja, da vsebnost sluzi v drogi lahko variira med 3,8 % in 7,3% (15). Če bi predpostavili, da se v cvetu gozdnega slezenovca nahaja najvišja določena vsebnost sluzi, torej 7,3 %, pa bi v 1 ml sirupa lahko določili približno 4,45 mg. Ta vrednost je zelo blizu našim rezultatom. Ker pa ne poznamo točne sestave, strukture in vsebnosti polisaharidov v preiskovanem sirupu, ne moremo zaključiti, če je bila metoda gravimetrije točna.

Pri metodi ultrafiltracije in sledeči kolorimetrični reakciji smo namesto pipetiranja vzorca sirupa za analizo le-tega natehtali. Tako smo določili, da se v 1 g sirupa (1 ml sirupa predstavlja približno 1,23 g sirupa) nahaja 0,1075 mg saharidov, ki smo jih izrazili glede na saharozo. Rezultat je sicer skoraj 45× nižji kot tisti, ki smo ga dobili z gravimetrijo. Vzrok je v tem, da smo pri metodi ultrafiltracije s sledečo FŽ-reakcijo, maso podali kot

ekvivalente saharoze, glede na umeritveno krivuljo raztopine saharoze (Graf 3), v primeru gravimetrije pa nam rezultat predstavlja izolirane ter stehtane polisaharide. Če bi pri drugi metodi (ultrafiltracija, ki ji je sledila spektrofotometirčna določitev saharidov) izrazili maso saharidov glede na drugi sladkor, bi se vrednosti lahko precej razlikovale. Pri kolorimetrični reakciji torej nastanejo obarvani produkti med saharidom in fenolom, v močno kislem mediju, ki jim izmerimo absorbanco pri  $\lambda$  492 nm. Specifična odzivnost pa se nekoliko razlikuje med različnimi vrstami monosaharidnih enot (24). To pomeni, da kompleksi različnih sladkorjev s fenolom v močno kislem mediju, različno absorbirajo svetlobo  $\lambda$  492 nm. Dokazano je bilo (24), da različni monosaharidi, oligosaharidi in polisaharidi dajejo različne linearne absorbančne profile pri  $\lambda$  492 nm, torej da različni saharidi dajejo različne naklone premic (odvisnost mase sladkorja ( $\mu\text{g}$ ) od absorbance nastalega kompleksa pri  $\lambda$  492 nm). Delno je to posledica razlik v masi prostega monosaharida, delno od njihove kemijske oblike v velikih molekulah (24). Tako lahko zaključimo, da je pomembno, da vse dobljene rezultate predstavimo in podamo glede na saharid, za katerega smo pripravili umeritveno krivuljo. V našem primeru je bil ta sladkor disaharid sahariza. Disaharidi, ki so zelo higroskopni, naj bi kazali nižje absorbance (24) na umeritvenih premicah. Tako lahko zaključimo, da je nizek rezultat 0,1075 mg / 1g sirupa, lahko posledica izražanja saharidov glede na umeritveno krivuljo vodne raztopine saharoze.

Če primerjamo znotrajdnevne ponovljivosti gravimetrije in metode ultrafiltracije s sledečo FŽ-reakcijo, ugotovimo, da je le-ta boljša za kolorimetrično metodo določanja polisaharidov, saj se je RSD gibal med 2,09 % in 5,09 %. Tudi meddnevna ponovljivost je bila za dober 1 % boljša kot pri gravimetrični metodi. Za analizo sirupov smo tako izbrali kolorimetrično metodo (ultrafiltracijo s sledečo FŽ-reakcijo), saj smo poleg dobre ponovljivosti določili tudi linearnost metode ( $R^2 = 0,987$ ). Prednosti pa so bile tudi manj čakanja med posameznimi stopnjami analize ter tako krajši čas izvajanja analize in hitrejša analiza večjega števila vzorcev.

## **5. ZAKLJUČEK**

Za določanje vsebnosti polisaharidov v sirupih smo razvili, optimirali in validirali dve metodi in sicer gravimetrično in kolorimetrično metodo.

Prva metoda, s katero smo analizirali sirup, je bila gravimetrična obarjalna metoda. V 1 ml sirupa smo določili 4,65 mg polisaharidov. Glede na znano sestavo sirupa in literaturne podatke (Preglednica XXII – Priloga) smo dobili podatek, da se v 1 ml sirupa nahaja 50 mg lista ozkolistnega trpotca, za katerega literatura navaja vsebnost sluzi v drogi 0,8 % (13) in 50 mg cveta gozdnega slezenovca, za katerega literatura navaja, da vsebnost sluzi v drogi lahko variira med 3,8 % in 7,3% (15). Če bi predpostavili, da se v cvetu gozdnega slezenovca nahaja najvišja določena vsebnost sluzi, torej 7,3 %, bi v 1 ml sirupa lahko določili približno 4,45 mg. Ta vrednost je zelo blizu našim rezultatom. Če bi vzeli sredinski podatek za vsebnost sluzi v gozdnem slezenovcu, to je 5,5 %, pa bi bil rezultat nekoliko višji, a še vedno primerljiv z literaturnimi podatki. Vzrok za nekoliko višji rezultat bi lahko bil ta, da je tekom obarjanja prišlo do vključevanja tudi drugih komponent vzorca v oborino ali da se s spiranjem z 80 % EtOH nismo znebili vseh monosaharidov, disaharidov in oligosaharidov. Drugi vzrok pa bi bil lahko, da drogi v analiziranem sirupu vsebujeta večji delež polisaharidov, kot to navaja literatura. Sestava, struktura in vsebnost polisaharidov v preiskovanem sirupu ni bila znana, zato ne moremo zaključiti, če je metoda gravimetrije točna. Iz rezultatov smo lahko izpeljali, da je metoda za raziskovalne namene zadovoljivo ponovljiva, ocenjena linearnost pa je bila  $R^2 = 0,976$ .

Druga metoda je bila kolorimetrična analiza izoliranih polisaharidov. Najprej smo izolacijo polisaharidov od ostalih komponent sirupa naredili z obarjanjem s 90 % EtOH in tako dobili analit v obliki oborine. Pri tej metodi smo se soočili s problemom ponovnega raztplavljanja oborine v dH<sub>2</sub>O pri pripravi vzorca za FŽ-reakcijo. Tudi dodatek 0,5 M NaOH nam ni izboljšal raztplavljanja oborine, zato smo izolacijo polisaharidov naredili z metodo ultrafiltracije, s katero smo pripravili frakcije polisaharidov večjih od 10 kD. Slabost je bila ta, da smo določen delež polisaharidov, ki so bili manjši od 10 kDa sprali in jih torej pri analizi nismo določili. Ker ne poznamo točne sestave in strukture polisaharidov, ki so prisotne v sirupu, ne moremo zaključiti, kakšen delež polisaharidov smo izgubili. Izolirane polisaharide smo nato kvantitativno ovrednotili s FŽ-reakcijo v mikrotitrskih ploščicah, za

katero smo potrdili linearnost ( $R^2 = 0,9939$ ) ter za raziskovalne namene ustrezeno ponovljivost metode. Znotrajdnevna ponovljivost se je gibala od 1,5 % do 5,0 %, meddnevna ponovljivost pa je bila okrog 8 %. Umeritveno krivuljo smo naredili z vodno raztopino saharoze. Vsebnost polisaharidov smo tako izrazili kot ekvivalente saharoze. Potrdili smo, da je za primerljivost rezultatov pomembno rezultate vedno izražati glede na en saharid, saj različni sladkorji tvorijo s fenolom v močno kislem mediju različno obarvane produkte, torej izmerimo različne absorbance nastalih produktov pri  $\lambda = 490$  nm (22).

Za končno analizo treh sirupov smo izbrali metodo ultrafiltracije s sledečo FŽ-reakcijo. Z validacijo celotne metode smo ocenili linearnost ( $R^2 = 0,987$ ) in ponovljivost metode (RSD 7,22 %). Analizirani sirupi so se razlikovali po viskoznosti in vsebnosti polisaharidov. Najvišjo vsebnost polisaharidov smo določili v sirupu 2, najnižjo pa v sirupu 3.

Poznanih je veliko kolorimetričnih in drugih metod, s katerimi lahko določamo saharide. Po članku (22) se predstavlja FŽ-reakcija kot ena najenostavnejših in najbolj zanesljivih metod za določanje sladkorjev, oligosaharidov, proteoglikanov, glikoproteinov in glikolipidov. Poleg enostavnosti in zanesljivosti metode smo ugotovili še veliko drugih prednosti te metode. In sicer: kratek čas analize (manj kot eno uro), analiza velikega števila vzorcev naenkrat (do 96, saj je toliko vdolbinic v mikrotitrski ploščici), delo poteka z majhnimi količinami fenola in koncentrirane  $H_2SO_4$ , kar je zelo pomembno z vidika varnosti in manjše izpostavljenosti agresivnim in toksičnim reagentom. Vodna raztopina fenola je stabilna pri sobnih pogojih in je torej ni potrebno pred analizo sproti pripravljati. Poleg tega smo potrdili, da je metoda izredno občutljiva (analiziramo lahko že  $\mu\text{g}$  količine sladkorjev), linearna in ponovljiva (RSD okrog 7 %).

## **6. VIRI IN LITERATURA**

1. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Trpotec>, 27.3.2012.
2. Aichele D, Golte-Bechtle M: Kaj neki tu cveti?, Narava, Kranj, 2004
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/Malva>, 27.3.2012.
4. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Plantago+lanceolata>, 27.3.2012.
5. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Gozdni\\_slezenovec](http://sl.wikipedia.org/wiki/Gozdni_slezenovec), 27.3.2012.
6. European Medicines Agency:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal -  
Community\\_herbal\\_monograph/2012/02/WC500123352.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2012/02/WC500123352.pdf), 26.5.2012
7. <http://www.trebnik.com/?id=101>, 27.3.2012.
8. [http://www.ezdravje.com/si/zeli/kaselj/?v=g\\_slezenovec](http://www.ezdravje.com/si/zeli/kaselj/?v=g_slezenovec), 27.3.2012.
9. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry Medical Plants, 2nd Edition, Lavoisier Publishing, USA, 1999: 3-5, 35-38 in 89-122.
10. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Ogljikovi\\_hidrati](http://sl.wikipedia.org/wiki/Ogljikovi_hidrati), 3.4.2012.
11. Sadasivam S, Manickam A: Biochemical methods, New Age International, India, 1996;1-22. in <http://www.newagepublishers.com/samplechapter/000091.pdf>, 3.4.2012
12. Bräutigam M, Franz G: Structural Features of Plantago lanceolata Mucilage, *Planta Medica* 1985; 51(4): 293-297
13. Stewart A V: Plantain (Plantago lanceolata) – a potential pasture species, *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 1996, 58: 77–86
14. Drug information online, <http://www.drugs.com/npp/mallow.html>, 27.3.2012.
15. Gasparetto J C, Martins C A F, Hayashi S S, Otuky M F, Pontarolo R: Ethnobotanical and scientific aspects of Malva sylvestris L.: a millennial herbal medicine, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 64, Issue 2, 2012: 172–189.
16. Štukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 124-127
17. Merck Millipore:  
[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/0  
34105b0cba822d7852574a60051e0bd/\\$FILE/tp0040en00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/034105b0cba822d7852574a60051e0bd/$FILE/tp0040en00.pdf), 3.4.2012.

18. Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F: Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Division of Biochemistry, University of Minnesota, St. Paul, Minn. Volume 28, No. 3, march 1956: 350.
19. Dijaški.net:  
[http://www.dijaski.net/get/kem\\_ref\\_ogljkovi\\_hidrati\\_03\\_predstavitev.ppt](http://www.dijaski.net/get/kem_ref_ogljkovi_hidrati_03_predstavitev.ppt),  
3.4.2012.
20. Fournier E: Colorimetric Quantification of Carbohydrates, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001.
21. [http://en.wikipedia.org/wiki/Colorimetry\\_%28chemical\\_method%29](http://en.wikipedia.org/wiki/Colorimetry_%28chemical_method%29), 3.4.2012.
22. Masuko T, Minani A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee Y C: Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format, Analytical Biochemistry 339 (2005): 69-72.
23. Glavac K N, Kosir I J, Rode J, Kreft S: Optimization and use of spectrophotometric method for determining polysaccharides in *Echinacea purpurea*, Central European Journal of Biology, 2011, 1-6.
24. Saha S K, Brewer C F: Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method, Carbohydrate Research 1994, 254: 157-167.
25. Gorenjak A H: Živilska kemija z analizo živil in analiza živil, Zavod IRC, Ljubljana, 2010: 5-8.
26. [http://en.wikipedia.org/wiki/Gravimetric\\_analysis](http://en.wikipedia.org/wiki/Gravimetric_analysis), 3.4.2012.
27. European Pharmacopoeia 6<sup>th</sup> ed., Volume 2, Council of Europe, Strasbourg 2007, Alcoholomeric tables: 613.
28. Tang Z, Guo S, Rao L, Qui J, Xu X, Liang Y: Optimization of the technology of extracting water-soluble polysaccharides from *Morus alba L.* leaves, African Journal of Biotechnology Vol. 10 (59), 2011: 12714-12720.
29. The International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) – ICH guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

## 7. PRILOGA

### 7.1 % SLUZI V DROGAH

Glede na podatke o sirupu in člankih (13, 15) lahko teoretično predpostavimo, koliko sluzi se nahaja v posameznih drogah in kolikšna je teoretična vsebnost sluzi, ki bi jih lahko določili z izbrano metodo (Preglednica XXII). Točne sestave sluzi v analiziranih drogah nismo poznali.

Preglednica XXII: teoretična masa (dobljena glede na literaturne podatke (13, 15) sluzi v preiskovanih drogah)

| VZOREC               | KOLIČINA DROGE, KI JO VSEBUJE     | % SLUZI V DROGI                        | TEORETIČNA KOLIČINA SLUZI V DROGI |
|----------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| <b>5 ml sirupa</b>   | 250 mg lista ozkolistnega trpotca | 0,8 %                                  | 2,0 mg                            |
|                      | 250 mg cveta gozdnega slezenovca  | 3,8 – 7,3 %<br>srednja vrednost = 5,5% | 14,0 mg                           |
| <b>2,5 ml sirupa</b> | 125 mg lista ozkolistnega trpotca | 0,8 %                                  | 1,0 mg                            |
|                      | 125 mg cveta gozdnega slezenovca  | 3,8 – 7,3 %<br>srednja vrednost = 5,5% | 7,0 mg                            |
| <b>2,0 ml sirupa</b> | 100 mg lista ozkolistnega trpotca | 0,8 %                                  | 0,8 mg                            |
|                      | 100 mg cveta gozdnega slezenovca  | 3,8 – 7,3 %<br>srednja vrednost = 5,5% | 5,6 mg                            |
| <b>1,0 ml sirupa</b> | 50 mg lista ozkolistnega trpotca  | 0,8 %                                  | 0,4 mg                            |
|                      | 50 mg cveta gozdnega slezenovca   | 3,8 – 7,3 %<br>srednja vrednost = 5,5% | 2,8 mg                            |
| <b>0,5 ml sirupa</b> | 25 mg lista ozkolistnega trpotca  | 0,8 %                                  | 0,2 mg                            |
|                      | 25 mg cveta gozdnega slezenovca   | 3,8 – 7,3 %<br>srednja vrednost = 5,5% | 1,4 mg                            |

### 7.2 NUMERIČNI PRIKAZ REZULTATOV RAZDELKA 4.3.1.2

Legenda oznak za preglednice v prilogi

| oznaka   | Kaj pomeni?  |
|--|--|
| redčitve   | kolikokrat smo razredčili osnovne raztopine  |
| vzorci   | slepa, sirup ali placebo   |
| $A_{\text{povprečni}}$                                   | Iz izmerjenih absorbance $A_1, A_2, A_3, \dots, A_x$ smo izračunali povprečje x vrednosti.   |
| $A_{\text{končna}}$                                      | $A_{\text{končna}} = A_{\text{povprečni}} - A_{\text{povprečni od slepe}}$   |
| $C_1 (\text{mg/ml})$                                     | $c_1 = \frac{A_{\text{končna}} \times 0,5 \text{ mg/ml}}{1,63648}$<br>Iz $A_{\text{končna}}$ smo dobili koncentracije raztopine glede na umeritveno premico standardne raztopine saharoze.   |
| $C_2 (\text{mg/ml})$                                     | $c_2 = (c_1 \times V_1) / (V_2)$<br><b>Upoštevanje redčenja</b><br>$c_2$ predstavlja koncentracijo raztopine v končnem volumenu, torej tistem volumnu, do katerega smo raztopino koncentrirali v nastavku v epruveti za ultrafiltracijo. |
| $V_{\text{končni}} (\text{ml})$                          | končni volumen - v, do katerega smo raztopino koncentrirali v nastavku epruvete za ultrafiltracijo po zadnjem spiranju   |
| $m_{(\text{saharidov})} v V_{\text{končni}} (\text{mg})$ | masa $_{(\text{saharidov})} v V_{\text{končni}}$   |
| $m_{(\text{saharidov})} v 0,5 \text{ ml vzorca (mg)}$    | masa $_{(\text{saharidov})} v$ volumnu odpipetiranega vzorca za analizo  |
| $m_{(\text{saharidov})} v 2,5 \text{ ml vzorca (mg)}$    | masa $_{(\text{saharidov})} v$ volumnu odpipetiranega vzorca za analizo  |
| $m_{(\text{saharidov})} v 2,0 \text{ ml vzorca (mg)}$    | masa $_{(\text{saharidov})} v$ volumnu odpipetiranega vzorca za analizo  |
| $C_3 (\text{mg/ml}) v 2 \text{ ml vzorca}$               | koncentracija $_{(\text{saharidov})} v 2 \text{ ml}$   |
| $c$ (raztopin) (mg/ml)                                   | koncentracija pripravljenih raztopin polisaharidov za analizo  |
| % saharidov v sirupu glede na teoretične vrednosti       | % saharidov = $\frac{\text{dobljena vrednost saharidov v določenem volumnu analiziranega sirupa}}{\text{teoretična vrednost saharidov v določenem volumnu analiziranega sirupa}}$<br>Glej tabelo XXII!                                   |
| $m_2 (\text{mg}) v 100 \mu\text{l}$                      | masa $_{(\text{saharidov})} v 100 \mu\text{l}$   |
| masa, ki predstavlja $100 \mu\text{l}$ (mg)              | masa $100 \mu\text{l}$   |
| $m_{(\text{saharidov})} v m_{\text{končni}} (\text{mg})$ | masa $_{(\text{saharidov})} v$ končni masi   |
| $m_{\text{končna}} (\text{mg})$                          | končna masa - m, do katere smo raztopino koncentrirali v nastavku epruvete za ultrafiltracijo po zadnjem spiranju  |
| $m_{\text{celega vzorca}} (\text{mg})$                   | masa vzorca, ki smo ga odpipetirali za analizo   |
| $m_{(\text{saharidov})} / 1 \text{ g vzorca (mg)}$       | masa $_{(\text{saharidov})}$ preračunana na 1 g vzorca   |

### 7.2.1.1 1. POSKUS

Po 7× spiranju:

| REDČITVE | VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V končni (ml) | m (saharidov) V V končni (mg) | m (saharidov) v 0,5 ml vzorcu (mg) | % saharidov v sirupu glede na teoretične vrednosti |
|----------|---------|-------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
|          | slepa   | 0,05646     | 0        |                        |                        |               |                               |                                    |  |
| 10×      | sirup   | 0,11606     | 0,0596   | 0,018209               | 0,20030                | 0,5           | 0,10015 mg                    | <b>0,10015 mg</b>                  | <b>6,26%</b>                                       |
|          | placebo | 0,05906     | 0,0026   | 0,000794               | 0,00873                | 0,5           | 0,00437 mg                    | <b>0,00437 mg</b>                  |  |
| 50×      | sirup   | 0,07284     | 0,01638  | 0,005000               | 0,25500                | 0,5           | 0,12750 mg                    | <b>0,12750 mg</b>                  | <b>7,97%</b>                                       |
|          | placebo | 0,05356     | -0,0029  | 0,0                    | 0,0                    | 0,5           | 0 mg                          | <b>0 mg</b>                        |  |
| 100×     | sirup   | 0,05836     | 0,0019   | 0,000581               | 0,05860                | 0,5           | 0,02930 mg                    | <b>0,02930 mg</b>                  | <b>1,83%</b>                                       |
|          | placebo | 0,05198     | -0,0045  | 0,0                    | 0,0                    | 0,5           | 0 mg                          | <b>0 mg</b>                        |  |

Po 10× spiranju:

| REDČITVE | VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V končni (ml) | m (saharidov) V V končni (mg) | m (saharidov) v 0,5 ml vzorcu (mg) | % saharidov v sirupu glede na teoretične vrednosti |
|----------|---------|-------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
|          | slepa   | 0,0454      | 0        |                        |                        |               |                               |                                    |  |
| 2×       | sirup   | 0,2323      | 0,18697  | 0,057125               | 0,11425                | 0,52          | 0,059410 mg                   | <b>0,059410 mg</b>                 | <b>3,71%</b>                                       |
|          | placebo | 0,0522      | 0,00680  | 0,002078               | 0,004156               | 0,5           | 0,002078 mg                   | <b>0,002078 mg</b>                 |  |

### 7.2.1.2 2. POSKUS

| 2× redčitev                  | VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V končni (ml) | m (saharidov) V V končni (mg) | m (saharidov) v 0,5 ml vzorcu (mg) | % saharidov v sirupu glede na teoretične vrednosti |
|------------------------------|---------|-------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
|                              | slepa   | 0,0454      | 0        |                        |                        |               |                               |                                    |  |
| 7 × spiranje nova epruveta   | sirup   | 0,3274      | 0,28203  | 0,086171               | 0,172342               | 0,5           | 0,086171 mg                   | <b>0,086171 mg</b>                 | <b>5,39%</b>                                       |
|                              | placebo | 0,0892      | 0,04378  | 0,013377               | 0,026754               | 0,25          | 0,006689 mg                   | <b>0,006689 mg</b>                 |  |
| 10 × spiranje nova epruveta  | sirup   | 0,3706      | 0,3252   | 0,099360               | 0,19926                | 0,5           | 0,099630 mg                   | <b>0,099630 mg</b>                 | <b>6,23%</b>                                       |
|                              | placebo | 0,0885      | 0,04317  | 0,013189               | 0,026378               | 0,25          | 0,006595 mg                   | <b>0,006595 mg</b>                 |  |
| 7 × spiranje stara epruveta  | sirup   | 0,2356      | 0,19023  | 0,058123               | 0,116246               | 0,5           | 0,058123 mg                   | <b>0,058123 mg</b>                 | <b>3,63%</b>                                       |
|                              | placebo | 0,0831      | 0,03773  | 0,011529               | 0,023052               | 0,25          | 0,005763 mg                   | <b>0,005763 mg</b>                 |  |
| 10 × spiranje stara epruveta | sirup   | 0,1684      | 0,12303  | 0,037591               | 0,075182               | 0,5           | 0,037591 mg                   | <b>0,037591 mg</b>                 | <b>2,35%</b>                                       |
|                              | placebo | 0,0846      | 0,03927  | 0,011997               | 0,023994               | 0,25          | 0,005999 mg                   | <b>0,005999 mg</b>                 |  |

### 7.2.1.3 3. POSKUS

Po 7× spiranju:

| REDČITVE | VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V končni (ml) | m (saharidov) V V končni (mg) | m (saharidov) v 2,5 ml vzorcu (mg) | % saharidov v sirupu glede na teoretične vrednosti |
|----------|---------|-------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
|          | slepa   | 0,0573      | 0        |                        |                        |               |                               |                                    |  |
| 10×      | sirup   | 0,25704     | 0,19974  | 0,061027               | 0,67130                | 0,5           | 0,33565 mg                    | <b>0,33565 mg</b>                  | <b>4,20%</b>                                       |
|          | placebo | 0,06096     | 0,00366  | 0,001118               | 0,01230                | 0,5           | 0,00615 mg                    | <b>0,00615 mg</b>                  |  |
| 30×      | sirup   | 0,11602     | 0,05872  | 0,017940               | 0,55614                | 0,5           | 0,27807 mg                    | <b>0,27807 mg</b>                  | <b>3,48%</b>                                       |
|          | placebo | 0,0566      | -0,0007  | 0                      | 0                      | 0,5           | 0 mg                          | <b>0 mg</b>                        |  |

Po 10× spiranju:

| REDČITVE | VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V končni (ml) | m (saharidov) V V končni (mg) | m (saharidov) v 2,5 ml vzorcu (mg) | % saharidov v sirupu glede na teoretične vrednosti |
|----------|---------|-------------|----------|------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
|          | slepa   | 0,06044     | 0        |                        |                        |               |                               |                                    |  |
| 10×      | sirup   | 0,224       | 0,16356  | 0,049970               | 0,54967                | 0,5           | 0,27484 mg                    | <b>0,27484 mg</b>                  | <b>3,44%</b>                                       |
|          | placebo | 0,05972     | -0,0007  | 0                      | 0                      | 0,5           | 0 mg                          | <b>0 mg</b>                        |  |
| 30×      | sirup   | 0,12608     | 0,06564  | 0,020055               | 0,62170                | 0,5           | 0,31085 mg                    | <b>0,31085 mg</b>                  | <b>3,89%</b>                                       |
|          | placebo | 0,08384     | 0,0234   | 0,007150               | 0,22160                | 0,25          | 0,05540 mg                    | <b>0,05540 mg</b>                  |  |

#### 7.2.1.4 4. POSKUS

| 2x redčitev                        | VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V <sub>končni</sub> (ml) | m (saharidov) V<br>V končni (mg) | m (saharidov)<br>v 2,0 ml vzorcu<br>(mg) | % saharidov v<br>sirupu glede na<br>teoretične<br>vrednosti |
|------------------------------------|---------|-------------|----------|------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|--|---|
|                                    | slepa   | 0,05068     | 0        |                        |                        |                          |                                  |  |   |
| 7 × spiranje<br>nova<br>epruveta   | sirup   | 1,04785     | 0,99718  | 0,3046707              | 0,60934                | 0,5                      | 0,30467 mg                       | <b>0,30467 mg</b>                        | <b>4,76%</b>  |
|                                    | placebo | 0,1067      | 0,05603  | 0,0171175              | 0,034235               | 0,5                      | 0,01712 mg                       | <b>0,01712 mg</b>                        |   |
| 10 × spiranje<br>nova<br>epruveta  | sirup   | 0,88127     | 0,83060  | 0,2537739              | 0,507548               | 0,5                      | 0,25377 mg                       | <b>0,25377 mg</b>                        | <b>3,97%</b>  |
|                                    | placebo | 0,0831      | 0,03243  | 0,0099069              | 0,019814               | 0,5                      | 0,00991 mg                       | <b>0,00991 mg</b>                        |   |
| 7 × spiranje<br>stara<br>epruveta  | sirup   | 1,27925     | 1,22858  | 0,3753712              | 0,750742               | 0,5                      | 0,37537 mg                       | <b>0,37537 mg</b>                        | <b>5,87%</b>  |
|                                    | placebo | 0,09205     | 0,04138  | 0,0126415              | 0,025283               | 0,5                      | 0,01264 mg                       | <b>0,01264 mg</b>                        |   |
| 10 × spiranje<br>stara<br>epruveta | sirup   | 0,85387     | 0,80320  | 0,2454022              | 0,490804               | 0,5                      | 0,24540 mg                       | <b>0,24540 mg</b>                        | <b>3,83%</b>  |
|                                    | placebo | 0,07338     | 0,02270  | 0,0069356              | 0,01387                | 0,5                      | 0,00694 mg                       | <b>0,00694 mg</b>                        |   |

#### 7.2.1.5 5. POSKUS

| 2x redčitev   | c (raztopin)<br>mg/ml | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V <sub>končni</sub><br>(ml) | m (saharidov) V<br>V končni (mg) | m (saharidov)<br>v 2,0 ml<br>vzorcu (mg) | C <sub>3</sub> (mg/ml)<br>v 2 ml vzorca |
|---|-----------------------|-------------|----------|------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--|---|
|   | slepa                 | 0,04893     | 0        |                        |                        |                             |                                  |  |   |
| 7 × spiranje<br>raztopina pektina v<br>dH <sub>2</sub> O              | 0,1 mg/ml             | 0,135       | 0,086075 | 0,0263                 | 0,052598               | 0,5                         | 0,026299 mg                      | <b>0,026299 mg</b>                       | <b>0,01315 mg/ml</b>                    |
|   | 0,2 mg/ml             | 0,214       | 0,165075 | 0,0504                 | 0,100872               | 0,5                         | 0,050436 mg                      | <b>0,050436 mg</b>                       | <b>0,02522 mg/ml</b>                    |
| 10 × spiranje<br>raztopina pektina v<br>dH <sub>2</sub> O             | 0,1 mg/ml             | 0,128333    | 0,079408 | 0,0242                 | 0,048524               | 0,5                         | 0,024260 mg                      | <b>0,024260 mg</b>                       | <b>0,01213 mg/ml</b>                    |
|   | 0,2 mg/ml             | 0,2399      | 0,190975 | 0,0583                 | 0,116698               | 0,5                         | 0,046679 mg                      | <b>0,046679 mg</b>                       | <b>0,02334 mg/ml</b>                    |
| 7 × spiranje<br>raztopina<br>arabskega gumija<br>v dH <sub>2</sub> O  | 0,1 mg/ml             | 0,396       | 0,347075 | 0,1060                 | 0,212086               | 0,5                         | 0,106043 mg                      | <b>0,106043 mg</b>                       | <b>0,05300 mg/ml</b>                    |
|   | 0,2 mg/ml             | 0,72385     | 0,674925 | 0,2062                 | 0,412424               | 0,5                         | 0,206212 mg                      | <b>0,206212 mg</b>                       | <b>0,10311 mg/ml</b>                    |
| 10 × spiranje<br>raztopina<br>arabskega gumija v<br>dH <sub>2</sub> O | 0,1 mg/ml             | 0,276067    | 0,227142 | 0,06940                | 0,138799               | 0,5                         | 0,069400 mg                      | <b>0,069400 mg</b>                       | <b>0,03470 mg/ml</b>                    |
|   | 0,2 mg/ml             | 0,823       | 0,774075 | 0,2365                 | 0,473012               | 0,5                         | 0,236007 mg                      | <b>0,236007 mg</b>                       | <b>0,11825 mg/ml</b>                    |
| brez spiranja<br>raztopina pektina v<br>dH <sub>2</sub> O             | 0,1 mg/ml             | 0,10225     | 0,053325 | <b>0,0119 mg/ml</b>    |                        |                             |                                  |  |   |
| brez spiranja<br>raztopina pektina v<br>dH <sub>2</sub> O             | 0,2 mg/ml             | 0,128025    | 0,0791   | <b>0,0241 mg/ml</b>    |                        |                             |                                  |  |   |
| brez spiranja<br>raztopina<br>arabskega gumija<br>v dH <sub>2</sub> O | 0,1 mg/ml             | 0,2705      | 0,221575 | <b>0,07181 mg/ml</b>   |                        |                             |                                  |  |   |
| brez spiranja<br>raztopina<br>arabskega gumija<br>v dH <sub>2</sub> O | 0,2 mg/ml             | 0,388925    | 0,3400   | <b>0,10918 mg/ml</b>   |                        |                             |                                  |  |   |

#### 7.2.1.6 6. POSKUS

| 2x redčitev   | c (raztopin)<br>mg/ml | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub> (mg/ml) | C <sub>2</sub> (mg/ml) | V <sub>končni</sub><br>(ml) | m (saharidov) V<br>V končni (mg) | m (saharidov)<br>v 2,0 ml<br>vzorcu (mg) | C <sub>3</sub> (mg/ml)<br>v 2 ml vzorca |
|---|-----------------------|-------------|----------|------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--|---|
|   | slepa                 | 0,04303     | 0        |                        |                        |                             |                                  |  |   |
| 7 × spiranje<br>raztopina pektina<br>v dH <sub>2</sub> O              | 0,091 mg/ml           | 0,2097      | 0,166675 | 0,05093                | 0,10185                | 0,45                        | 0,045833 mg                      | 0,045833 mg                              | <b>0,022916mg/ml</b>                    |
|   | 0,167mg/ml            | 0,2055      | 0,162475 | 0,04964                | 0,09928                | 0,5                         | 0,049643 mg                      | 0,049643 mg                              | <b>0,024822mg/ml</b>                    |
| 10 × spiranje<br>raztopina pektina<br>v dH <sub>2</sub> O             | 0,091 mg/ml           | 0,13725     | 0,094225 | 0,02879                | 0,05758                | 0,5                         | 0,028789 mg                      | 0,028789 mg                              | <b>0,014395mg/ml</b>                    |
|   | 0,167 mg/ml           | 0,197       | 0,153975 | 0,04704                | 0,09409                | 0,5                         | 0,047045 mg                      | 0,047045 mg                              | <b>0,023523mg/ml</b>                    |
| 7 × spiranje<br>raztopina<br>arabskega gumija<br>v dH <sub>2</sub> O  | 0,091 mg/ml           | 0,40185     | 0,358825 | 0,10963                | 0,21927                | 0,45                        | 0,098670 mg                      | 0,098670 mg                              | <b>0,049335mg/ml</b>                    |
|   | 0,167 mg/ml           | 0,57645     | 0,533425 | 0,16298                | 0,32596                | 0,53                        | 0,172758 mg                      | 0,172758 mg                              | <b>0,086379mg/ml</b>                    |
| 10 × spiranje<br>raztopina<br>arabskega gumija<br>v dH <sub>2</sub> O | 0,091 mg/ml           | 0,28425     | 0,241225 | 0,07370                | 0,14740                | 0,45                        | 0,066332 mg                      | 0,066332 mg                              | <b>0,033166mg/ml</b>                    |
|   | 0,167 mg/ml           | 0,570375    | 0,527350 | 0,16112                | 0,32246                | 0,5                         | 0,161230 mg                      | 0,161230 mg                              | <b>0,080615mg/ml</b>                    |

!odstopanja od koncentracije pri 0,167mg/ml raztopine arabskega gumija – napaka pri delu – en del tekočine se nam je polil

## 7.2.1.7 7. POSKUS

| VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub><br>(mg/ml) | C <sub>2</sub><br>(mg/ml) | V končni<br>(ml) | m (saharidov) v<br>V končni (mg) | m (saharidov)<br>v 2,0 ml<br>vzorca (mg) | C <sub>3</sub> (mg/ml)<br>v 2 ml vzorca | % saharidov v<br>sirupu glede na<br>teoretične<br>vrednosti |
|---|-------------|----------|---------------------------|---------------------------|------------------|----------------------------------|--|---|---|
| slepa   | 0,04745     | 0        |                           |                           |                  |                                  |  |   |   |
| sirup (2 ml)  | 0,84817     | 0,80072  | 0,24465                   | 0,48929                   | 0,54             | 0,264218 mg                      | 0,264218 mg                              | 0,132108 mg/ml                          | 4,13 %  |
| sirup (1ml) in<br>dH <sub>2</sub> O (1ml)                         | 0,43457     | 0,38712  | 0,11828                   | 0,23655                   | 0,50             | 0,118277 mg                      | 0,118277 mg                              | 0,059138 mg/ml                          | 3,70 %  |
| sirup (1ml) in<br>placebo (1ml)                                   | 0,6152      | 0,56775  | 0,17347                   | 0,34693                   | 0,48             | 0,166528 mg                      | 0,166528 mg                              | 0,083264 mg/ml                          |   |
| sirup (1ml) in vodna<br>raztopina pektina s<br>c= 0,1 mg/ml (1ml) | 0,4431      | 0,39565  | 0,12088                   | 0,24177                   | 0,50             | 0,120884 mg                      | 0,120884 mg                              | 0,060442 mg/ml                          |   |

## 7.2.1.8 8. POSKUS

Vzorci: 1,0 ml dH<sub>2</sub>O + 1,0 ml vodne raztopine pektina različnih koncentracij

| VZOREC      | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub><br>(mg/ml) | C <sub>2</sub><br>(mg/ml) | m <sub>2</sub> (mg)<br>v 100µl | masa, ki<br>predstavlja<br>100µl<br>(mg) | m končna<br>(mg) | m (saharidov)<br>v m končni<br>(mg) | m (saharidov)<br>v m celega<br>vzorca ml<br>vzorca (mg) | m celega<br>vzorca (mg) | m (saharidov) / 1 g<br>vzorca (mg) |
|-------------|-------------|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|------------------|-------------------------------------|---|-------------------------|------------------------------------|
| slepa       | 0,04483     | 0        |                           |                           |                                |  |                  |                                     |   |                         |                                    |
| 1. EPRUVETA | 0,21033     | 0,1655   | 0,050566                  | 0,10113                   | 0,010113                       | 106,44                                   | 529,3            | 0,05271                             | 0,05271   | 2010,61                 | 0,026214 mg<br>saharidov / g mase  |
| 2. EPRUVETA | 0,35458     | 0,30975  | 0,094639                  | 0,18928                   | 0,018928                       | 106,84                                   | 526,32           | 0,09853                             | 0,09853   | 1992,67                 | 0,049445 mg<br>saharidov / g mase  |
| 3. EPRUVETA | 0,63023     | 0,5854   | 0,178860                  | 0,35772                   | 0,035772                       | 103,45                                   | 523,28           | 0,18462                             | 0,18462   | 2006,08                 | 0,09203 mg<br>saharidov / g mase   |

1. EPRUVETA: 1 ml dH<sub>2</sub>O + 1 ml vodne raztopine pektina s c = 0,5 mg/ml

2. EPRUVETA: 1 ml dH<sub>2</sub>O + 1 ml vodne raztopine pektina s c = 1,0 mg/ml

3. EPRUVETA: 1 ml dH<sub>2</sub>O + 1 ml vodne raztopine pektina s c = 2,5 mg/ml

Vzorci: 1,0 ml sirupa + 1,0 ml vodne raztopine pektina različnih koncentracij

### 1. paralela

| VZOREC  | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub><br>(mg/ml) | C <sub>2</sub><br>(mg/ml) | m <sub>2</sub> (mg) v<br>100µl | masa, ki<br>predstavlja<br>100µl<br>(mg) | m končna<br>(mg) | m (saharidov) v<br>m končni<br>(mg) | m (saharidov)<br>v 2,0 ml<br>vzorca (mg) | C <sub>3</sub> (mg/ml)<br>v 2 ml vzorca |
|---|-------------|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|------------------|-------------------------------------|--|---|
| slepa   | 0,0458      | 0        |                           |                           |                                |  |                  |                                     |  |   |
| sirup (1ml) in vodna<br>raztopina pektina s<br>c= 0,5 mg/ml (1ml) | 0,5446      | 0,49885  | 0,15242                   | 0,304832                  | 0,030483                       | 100,74                                   | 513,88           | 0,15545                             | 0,15545                                  | 0,0777 mg/ml                            |
| sirup (1ml) in vodna<br>raztopina pektina s<br>c= 1,0 mg/ml (1ml) | 0,7576      | 0,71182  | 0,21748                   | 0,434968                  | 0,043497                       | 103,79                                   | 458,15           | 0,20440                             | 0,20440                                  | 0,1022 mg/ml                            |
| sirup (1ml) in vodna<br>raztopina pektina s<br>c= 2,5 mg/ml (1ml) | 0,8841      | 0,83838  | 0,25616                   | 0,512308                  | 0,051231                       | 104,11                                   | 505,14           | 0,24857                             | 0,24857                                  | 0,1243 mg/ml                            |
| sirup (1ml) in vodna<br>raztopina pektina s<br>c= 5,0 mg/ml (1ml) | 1,4088      | 1,36305  | 0,41646                   | 0,832916                  | 0,083292                       | 107,38                                   | 625,72           | 0,48535                             | 0,48535                                  | 0,2428 mg/ml                            |

### 2. paralela

| VZOREC      | A povprečni | A končna | C <sub>1</sub><br>(mg/ml) | C <sub>2</sub><br>(mg/ml) | m <sub>2</sub> (mg)<br>v 100µl | masa, ki<br>predstavlja<br>100µl<br>(mg) | m končna<br>(mg) | m (saharidov) v<br>m končni<br>(mg) | m (saharidov)<br>v m celega<br>vzorca ml<br>vzorca (mg) | m celega<br>vzorca (mg) | m (saharidov) / 1 g<br>vzorca (mg) |
|-------------|-------------|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|------------------|-------------------------------------|---|-------------------------|------------------------------------|
| slepa       | 0,04483     | 0        |                           |                           |                                |  |                  |                                     |   |                         |                                    |
| 1. EPRUVETA | 0,68685     | 0,642025 | 0,196160                  | 0,39232                   | 0,039232                       | 101,56                                   | 466,57           | 0,17197                             | 0,17197   | 2172,51                 | 0,079157 mg<br>saharidov / g mase  |
| 2. EPRUVETA | 0,68648     | 0,64165  | 0,196046                  | 0,39209                   | 0,039209                       | 101,11                                   | 572,39           | 0,21006                             | 0,21006   | 2209,87                 | 0,095055 mg<br>saharidov / g mase  |
| 3. EPRUVETA | 0,79678     | 0,75195  | 0,229746                  | 0,45949                   | 0,045949                       | 101,39                                   | 691,72           | 0,30724                             | 0,30724   | 2222,45                 | 0,138243 mg<br>saharidov / g mase  |

1. EPRUVETA: 1 ml sirupa + 1 ml vodne raztopine pektina s c = 0,5 mg/ml

2. EPRUVETA: 1 ml sirupa + 1 ml vodne raztopine pektina s c = 1,0 mg/ml

3. EPRUVETA: 1 ml sirupa + 1 ml vodne raztopine pektina s c = 2,5 mg/ml