

‘MED KOT ZDRAVILO, NE SLADILO!’ STANDARDIZACIJA MEDU Z (BIO)KEMIJSKIMI OZNAČEVALCI ZA PREVERJANJE BOTANIČNE IN GEOGRAFSKE PRISTNOSTI TER UGOTAVLJANJE UČINKA NA ZDRAVJE

*Matjaž DEŽELAK¹, Domen JAKLIČ¹, Adriana PEREYRA¹, Sonča RAČKI¹, Jana POTOKAR¹,
Slavko BERNIK¹, Ažbeta GOSAK¹, Bratko FILIPIČ², Nataša LILEK³, Andreja KANDOLF³,
Mitja KOLAR⁴, Drago KOČAR⁴, Rok KOPINČ¹*

Izvleček

Hrana in živilski izdelki so lahko varni in kakovostni le, če so po sestavi kvalitativno in kvantitativno natančno definirani ter standardizirani s specifičnimi (bio)kemijskimi označevalci. Standardizacija medu je potrebna (i.) za njegovo verodostojno deklariranje, (ii.) pri prehranskih dopolnilih in funkcionalnih živilih na bazi medu je osnova za postavitve priporočenega dnevnega vnosa, zagotavljanje kakovosti in navajanje morebitnih zdravstvenih trditve, (iii.) za določanje izvora medu, (iv.) ključna pa je pri ugotavljanju poneverb medu – jasnejša kot je definicija medu, lažje je odkriti ponaredke. Pri raziskovalnem delu se osredotočamo na slovenski med različnih letnikov, botaničnih tipov in geografskega porekla, za primerjavo pa uporabljamo tudi med iz drugih držav in celin. Uporabljamo uveljavljene in napredne analitske tehnike, kot so tekočinska kromatografija (HPLC) [sklopljena z detektorjem absorbance ultravijolične in vidne svetlobe (DAD), fluorescentnim detektorjem (FLD), elektrokemijskim detektorjem (ECD) in tandemskim masnim spektrometrom (IT-TOF)], poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) ter analitske metode za ugotavljanje antioksidativnega potenciala (FRAP, FC, HRP-H₂O₂) in antimikrobnega učinka (mikrodilucijski in agar-diffusion testi). Naše raziskovalno delo je zastavljeno dolgoročno in je še vedno v teku, zato v nadaljevanju predstavljamo le izhodiščno delo s preliminarnimi rezultati, kateri so osnova za naše nadaljnje usmeritve. HPLC-DAD in HPLC-ECD presejalne analize so pokazale, da se slovenski kostanjev med bistveno loči od ostalih botaničnih tipov glede na vsebnost nekaterih antioksidantov in spojin, ki absorbirajo ultravijolično svetlobo. Nadaljnje raziskave bodo usmerjene v identifikacijo teh biomarkerjev slovenskega kostanjevega medu.

Ključne besede: Med; ponarejanje; poreklo; zdravstvene trditve; HPLC; poliakrilamidna gelska elektroforeza; masna spektrometrija

‘HONEY – FROM SWEETENER TO REMEDY’ STANDARDIZATION OF HONEY USING (BIO)CHEMICAL MARKERS FOR ITS AUTHENTICATION, DETERMINATION OF ORIGIN, AND ASSESSMENT OF HEALTH-RELATED EFFECTS

Abstract

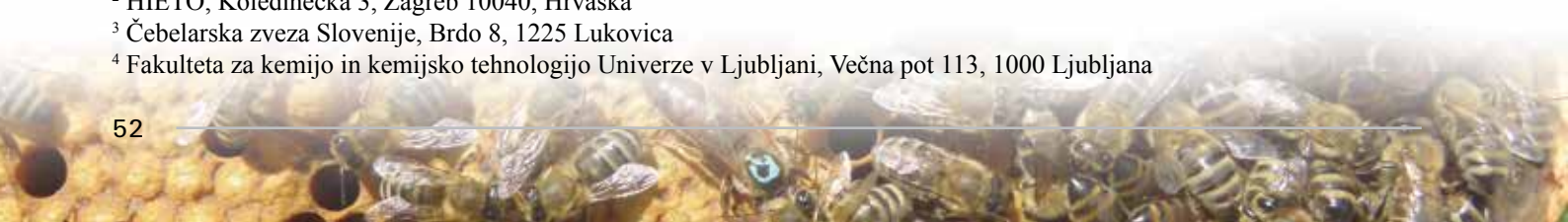
Food and food products can be safe and quality only if they are qualitatively and quantitatively precisely defined and standardized by specific (bio)chemical markers according to their composition. Standardization of honey is necessary

¹ Medex, d.o.o., Linhartova ulica 49A, 1000 Ljubljana

² HIETO, Koledinečka 3, Zagreb 10040, Hrvaška

³ Čebelarska zveza Slovenije, Brdo 8, 1225 Lukovica

⁴ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, Večna pot 113, 1000 Ljubljana



(i.) for its authentic declaration, (ii.) for honey-based food supplements and functional food it is the basis for setting the recommended daily intake, assure quality, and claim possible health effect, (iii.) to determine the origin of honey (iv.) and it is especially crucial in identifying adulteration of honey - the clearer the definition of honey, the easier the detection of falsification. In our research work, we focus on Slovene honey of different age, botanical type and geographical origin, whereas for comparison we analyze also honey from other countries and continents. We use state of the art analytical techniques such as liquid chromatography (HPLC) [coupled with ultraviolet and visible light absorption detector (DAD), fluorescent detector (FLD), electrochemical detector (ECD) and tandem mass spectrometer (IT-TOF)], polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and analytical methods for detecting antioxidative potential (FRAP, FC, HRP-H₂O₂) and antimicrobial effect (microdilution and agar-diffusion tests). Our research work is long term oriented and is still in progress, so in the continuation we present only the preliminary results, which are the basis for our further research orientations. HPLC-DAD and HPLC-ECD screening analyzes have shown that the Slovenian chestnut honey is essentially different from other botanical types regarding the content of some antioxidants and compounds that absorb ultraviolet light. Further research will focus on identifying these biomarkers of Slovenian chestnut honey.

Key words: Honey; adulteration; origin; health claims; HPLC; polyacrylamide gel electrophoresis; mass spectrometry



UVOD

Hrana in živilski izdelki so lahko varni in kakovostni le, če so po sestavi kvalitativno in kvantitativno natančno definirani ter standardizirani s specifičnimi označevalci. Le takšne izdelke (i.) lahko ustrezno deklariramo, (ii.) jim pripišemo določeno hranilno vrednost oz. vpliv na zdravje in postavimo priporočen dnevni vnos (funkcionalna živila, nutraceutiki), (iii.) jim določimo izvor (npr. geografski, botanični, glede na čebelo nabiralko, letnik pridelave) ter učinkovito identificiramo ponaredke.

Evropska agencija za varno hrano (EFSA) določa, katere prehranske in zdravstvene trditve je dovoljeno uporabljati (Uredba (ES) št. 1924/2006). Za med do sedaj še ni uspelo znanstveno nedvoumno dokazati, da prispeva k preprečevanju/zdravljenju bolezni, čeprav je to splošno sprejeto dejstvo z več tisočletno tradicijo. Glavni razlog za takšno stanje je, da med (bio)kemijsko ni zadovoljivo definiran saj je izredno kompleksna mešanica stotine kemijskih spojin, ki so prisotne v nestalnih razmerjih in količinah, zagotavljanje konstantnih proizvodov v fazi pridelave pa je praktično nemogoče zaradi samega principa čebelarjenja (otežen nadzor, kje in kaj posamezne čebele nabirajo ter sezonske variacije v rastlinski sestavi). Vse naštetu ima še eno negativno posledico, in sicer ponarejanje medu. Če je namreč med težko definirati, je tudi ponaredke težko odkriti.

V Republiki Sloveniji je pridelava, predelava in trženje medu regulatorno urejeno na nivoju pravilnika (Uradni list RS, št. 4/11, 26/14 – ZKme-1B in 9/15). Osnovna definicija medu v 1. odstavku 2. člena,

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

ne vključuje niti enega biokemijskega označevalca. 6. člen in “Priloga: parametri in merila sestave medu” sicer fizikalno-kemijsko natančneje definirata med kot tak, pri čemer se za botanično klasifikacijo medu navajajo le zgornje ali spodnje meje (i.) vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze, (ii.) vsebnosti vode, (iii.) vrednosti električne prevodnosti ter (iv.) subjektivne senzorične ocene. Kot razločevalni parameter botaničnih tipov medov v pravilniku ni naveden pelodni profil (ti. cvetna slika), čeprav v praksi pogosto služi kot izkustveni kriterij pri kategorizaciji medu.

Razumljivo je, da je biokemijsko standardizacijo medu bistveno lažje doseči pri enovrstnih medovih, tj. pri tistih, ki izvirajo pretežno iz ene rastlinske vrste (hoja, lipa, kostanj, akacija, ajda, itn.), kot pri večvrstnih oz. mešanih medovih (npr. gozdni in cvetlični), pri čemer pa je potreb-

no poudariti, da povsem enovrstni med v praksi zelo težko dobiti, razen na strogo kontroliranih območjih (npr. manuka med na monokulturnih rastiščih *Leptospermum scoparium*, ajdov med na obsežnih poljih ajde). Pri enovrstnih medovih je standardizacijo moč doseči z identifikacijo oz. kvantifikacijo ene ali več specifičnih spojin, pri večvrstnih pa bo verjetno potrebno uporabiti kakšne bolj splošne in robustne parametre (npr. antioksidativni potencial, spektroskopske meritve, aminokislinski/proteinski profil, genetska tipizacija, anorganski elementi v sledovih) (Bogdanov s sod., 2004).

Naša prva izbira pri iskanju biomarkerjev za posamezne botanične tipe medov je slovenski kostanjev med. Glavni razlog za to izbiro je, da kostanjev med že zdaj dosega relativno visoko ceno zaradi česar je bolj podvržen ponaribanju, poleg tega pa ima izmed vseh enovrstnih slovenskih medov verjetno največji zdravstveni potencial. S standardizacijo bi postavili pogoje za klinično testiranje zdravstvenih učinkov, za postavitev priporočenega dnevnega vnosa, za ugotavljanje izvora in za ugotavljanje avtentičnosti slovenskega kostanjevega medu.

MATERIALI IN METODE

Izbira in priprava vzorcev

Naključno smo izbrali 7 kostanjevih medov (K1 – K7) in 4 ostale medove – 1 cvetlični (C), 1 akacijev (A), 1 smrekov (S) in 1 lipov (L) (Tabela 1).

Medove za HPLC analizo smo pripravili na 2 načina. Najprej smo pripravili 10 mL 50% (w/v) raztopine medu v ultraprečiščeni vodi (ddH₂O). 1 mL te raztopine smo filtrirali skozi 0,45 µm membranski filter in ta filtrat je predstavljal ti. ‘direktni vzorec’.

Preostalih 9 mL raztopine smo porabili za ekstrakcijo na trdni fazi (angl. ‘solid-phase extraction, SPE), in sicer po sledečem postopku: SPE kolono (Sep-Pak® Vac C18 3cc 500 mg, Waters, ZDA) smo kondicionirali s 3 mL metanola in 3 mL ddH₂O. Sledilo je postopno dodajanje raztopine medu na kolono, pri čemer smo eluat na koncu zavrgli. Sledilo je spiranje neželenih na kolono vezanih komponent, kot so ogljikovi hidrati, organske kisline in razne nečistoče, najprej s 5 mL ddH₂O z dodatkom HCl (pH 2,0) in nato s 15 mL ddH₂O. Sledila je popolna izsušitev kolone s 3-5 min pretokom zraka. Preostale vezane komponente smo eluirali s 3-krat po 1 mL mešanice metanola in acetonitrila v volumskem razmerju 2:1 (3-kratno koncentriranje začetne raztopine). Eluat smo filtrirali skozi 0,45 µm membranski filter in ta filtrat je predstavljal ti. ‘SPE vzorec’. Vse elucije skozi kolono so potekale pri tlaku prib. – 200 mbar oz. s pretokom prib. 1 mL/min.

Tabela 1: Osnovne značilnosti uporabljenih medov.

oznaka	botanični tip medu	leto pridelave	regija pridelave	pelodni profil (cvetna slika)
K1	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (95%), macesen, lipa, podrastje
K2	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (93%), macesen, sončnica, mirtnice, vrba, akacija
K3	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (90%), lipa, aromati, spore, podrastje, ajda
K4	kostanjev	2014	03 - CE	kostanj (95%), podrastje, spore
K5	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (95%), podrastje, lipa, spore
K6	kostanjev	2016	02 - MB	kostanj (80%), javor, sadno drevje, oljna repica, hrast, lipa, bukev, vrba, vrbovec, omela
K7	kostanjev	2016	02 - MB	kostanj (90%), macesen, lipa, bukev
C	cvetlični	2015	03 - CE	sadno drevje, javor, detelja, akacija, koriander, vrba, oljna repica, jeglič
A	akacijev	2016	08 - NM	javor, sadno drevje, akacija, kostanj, kačja dresen, jeglič, detelja, bukev, vrba, sončnica, slez, vrbovec
S	smrekov	2016	02 - MB	kostanj, spore, podrastje, kobulnice, trpotec, macesen, detelja, aromati
L	lipov	2016	02 - MB	lipa (3%), kostanj, detelja, sadno drevje, slez, bukev, izop, jeglič, sončnica

HPLC-DAD in HPLC-ECD analiza

Za separacijo komponent medu smo uporabili HPLC instrument DIONEX Ultimate 3000 (Thermo Scientific, ZDA) s 4-kanalno črpalko, na 15°C termostatiranim samodejnim vzorčevalnikom, na 25°C termostatirano kolo-no Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) Sorbent LiChroCART® (150×4,6) (Merck KGaA, Nemčija) in DAD oz. ECD detektorjem. Volumen injiciranje je bil 5, 10 ali 15 µL, odvisno od intenzitete najmočnejšega kromatografskega vrha. Tabela 2 prikazuje sestavo mobilne faze. Zajem podatkov z DAD je potekal s frekvenco 5 Hz pri štirih valovnih dolžinah v ultravijoličnem območju elektromagnetnega valovanja (250, 280, 310 in 340 nm), zajem podatkov z ECD pa je potekal pri električnem po-

tencialu 400 in 800 mV. Za vsak med smo dobili torej 12 kromatogramov.

Obdelava in prikaz podatkov

Za obdelavo in urejanje in prikaz podatkov smo uporabili Excel 2016 (Microsoft, ZDA), za statistične analize pa SPSS v.23.0 (IBM, ZDA). Povprečne vrednosti in standardne deviacije smo predstavili tabelarično ter v obliki stolpčnih grafov. Statistična analiza je v poglavju 3.1 vključevala izračun statistično značilnih korelacij med kromatografskimi profili medov (Pearsonov r v primeru normalne razporeditve obeh primerjanih spremenljivk in Spearmanov rho v nasprotnem primeru) ter v poglavju 3.2 izračun statistično značilnih razlik v intenziteti posame-

Tabela 2: Režim mobilne faze HPLC analize.

čas [min]	pretok [mL/min]	1% metanojska kislina [%]	acetonitril [%]
0	0,7	90	10
3	0,7	90	10
12	0,7	75	25
20	0,7	30	70
25	0,7	30	70
30	0,7	90	10
35	0,7	90	10

znih kromatografskih vrhov med kostanjevimi in ostalimi medovi (t-test v primeru normalne razporeditve spremenljivke v obeh primerjanih kategorijah in Mann-Whitney U test v nasprotnem primeru).

REZULTATI Z RAZPRAVO

Upoštevali smo kromatografske vrhove, prisotne vsaj pri enem vzorcu. Tako smo za vsak med iz 12 kromatogramov dobili skupno 266 kvantitativnih podatkov (Tabela 3).

SPE ekstrakcija v primerjavi z direktno pripravo vzorca sicer predstavlja dodaten strošek in je časovno zamudna, a je smiselna. Iz rezultatov je razvidno, da imata oba načina priprave vzorca v povprečju $15,0 \pm 2,7\%$ istih DAD in $7,5 \pm 2,2\%$ istih ECD kromatografskih vrhov. Velika večina spojin v SPE ekstraktu je torej takšnih, ki jih z direktno pripravo vzorca ne zaznamo, zaradi česar so podatki po SPE ekstrakciji visoko informativni.

Primerjava kromatografskih profilov med medovi

Tabela 5 prikazuje bivariatne korelacijske koeficiente (R) in vrednosti njihove statistične značilnosti (p) za vse pare primerjanih medov na osnovi njihovih HPLC-DAD in -ECD kromatografskih profilov. Z upoštevanjem priporočil o vrednotenju korelacijskih koeficientov v biomedicinskih raziskavah (Mukaka, 2012) lahko iz naših rezultatov zaključimo, da so si kostanjevi medovi statistično značilno ($p = 3,2 \times 10^{-20} \pm 1,3 \times 10^{-19}$) visoko podobni med sabo

($\bar{R} = 0,699 \pm 0,116$), nasprotno pa so si ostali medovi statistično značilno ($\bar{p} = 3,6 \times 10^{-06} \pm 5,1 \times 10^{-06}$) zanemarljivo podobni med sabo ($\bar{R} = 0,360 \pm 0,206$). Statistično značilna ($\bar{p} = 9,9 \times 10^{-04} \pm 2,8 \times 10^{-03}$) zanemarljiva podobnost obstaja tudi med kostanjevimi in ostalimi medovi ($\bar{R} = 0,348 \pm 0,233$). Iz teh rezultatov smo sklepali, da so HPLC-DAD in -ECD kromatografski profili primeren razločitveni dejavnik med kostanjevim in ostalimi tipi medov. Sledila je identifikacija tistih kromatografskih vrhov, katerih pojavnost in jakost se statistično značilno razlikujeta med kostanjevimi in ostalimi medovi.

Primerjava kromatografskih vrhov med kostanjevimi in ostalimi medovi

Kromatografske vrhove smo ročno integrirali in intenzitete tistih z enakimi retencijskimi časi (RT) primerjali med sabo pri različni medovih. Slika 1 prikazuje primerjavo HPLC-DAD kromatogramov direktnih vzorcev pri 280 nm, Slika 2 in Slika 3 pa primerjavo HPLC-ECD kromatogramov direktnih vzorcev pri 400 in 800 eV.

Intenzitete posameznih kromatografskih vrhov smo primerjali med kostanjevimi in ostalimi medovi. Iskali smo tiste, ki so bodisi pri eni skupini prisotni, pri drugi pa ne, bodisi je njihova intenziteta pri eni skupini statistično značilno drugačna kot pri drugi. Le spojine, ki takšne kromatografske vrhove tvorijo, imajo potencial kot biomarker slovenskega kostanjevega medu. Slika 4 predstavlja kromatografske vrhove, ki se statistično značilno razlikujejo med kostanjevimi in ostalimi medovi. V izogib lažno

Tabela 3: Število kromatografskih vrhov posameznega tipa analize.

tip detektorja	DAD								ECD				vsota
tip vzorca	direktni				SPE				direktni		SPE		
valovna dolžina oz. električni potencial	250 nm	280 nm	310 nm	340 nm	250 nm	280 nm	310 nm	340 nm	400 mV	800 mV	400 mV	800 mV	
število kromatografskih vrhov	32	29	28	17	30	30	30	18	8	11	9	24	266

DAD – detektor z nizom diod; ECD – elektrokemijski detektor; SPE – vzorec po ekstrakciji na trdni fazi.

Tabela 4: Število in delež kromatografskih vrhov, ki smo jih detektirali ne glede na način priprave vzorca.

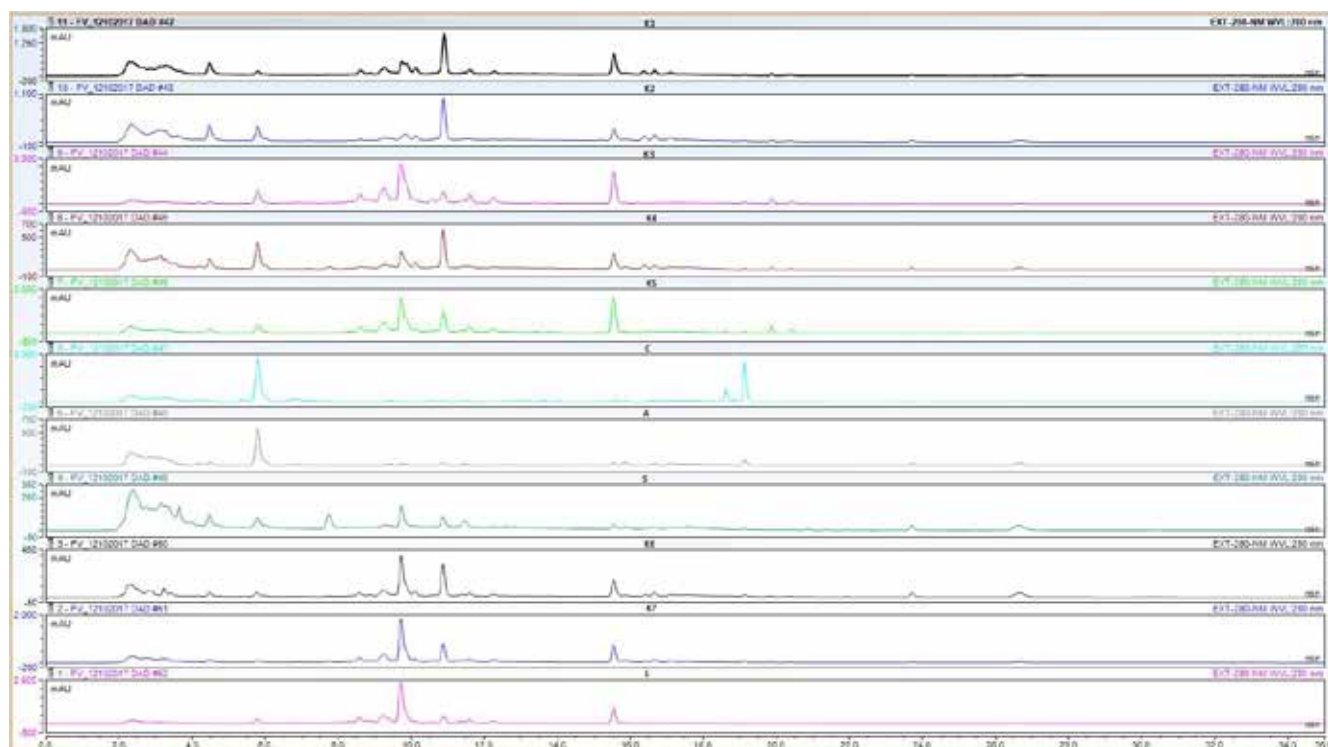
tip detektorja	DAD				ECD		
valovna dolžina [nm] oz. električni potencial [mV]	250 nm	280 nm	310 nm	340 nm	400 mV	800 mV	
število istih kromatografskih vrhov (direktni vs. SPE vzorec)	10	11	8	4	2	4	
odstotek istih kromatografskih vrhov (direktni vs. SPE vzorec)	16,1%	18,6%	13,8%	11,4%	5,3%	9,8%	

DAD – detektor z nizom diod; ECD – elektrokemijski detektor; SPE – vzorec po ekstrakciji na trdni fazi.

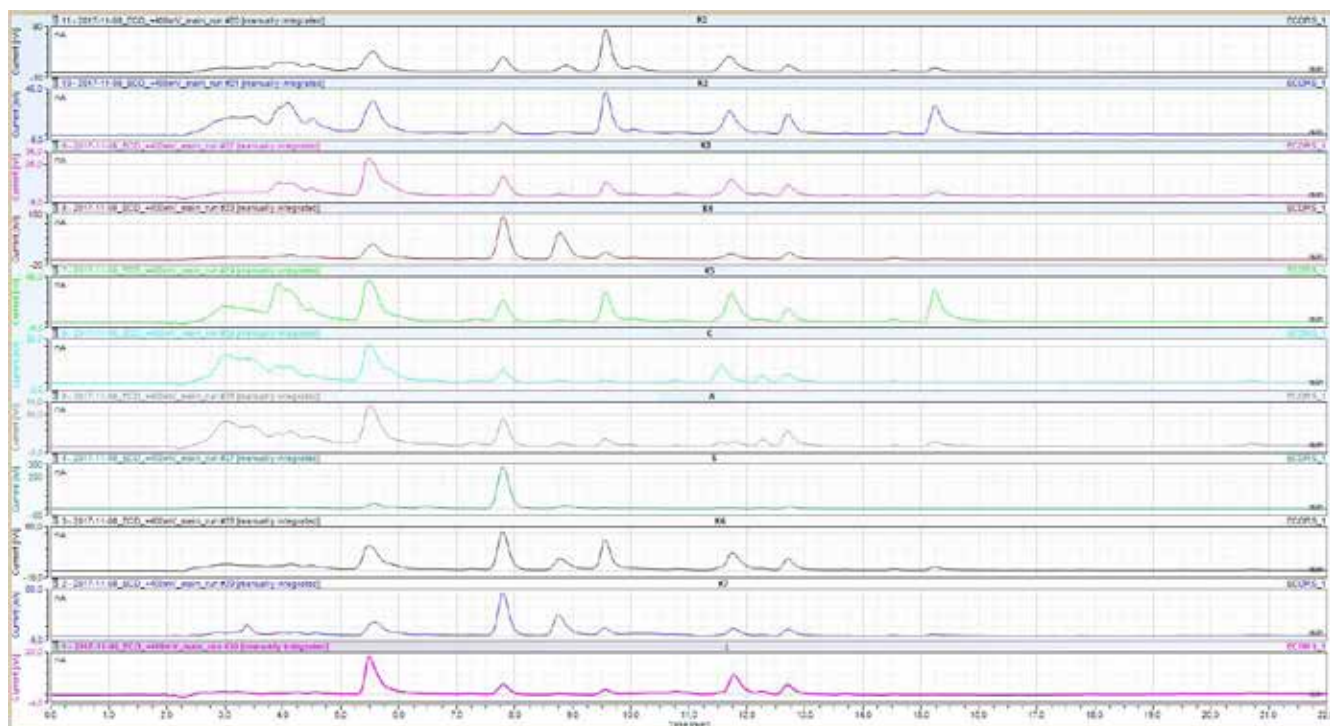
Tabela 5: Primerjava medov na osnovi njihovih kromatografskih profilov na osnovi korelacijskih koeficientov in vrednosti njihovih statističnih značilnosti. Statistično značilne p-vrednosti so napisane krepko in poševno.

med		K2	K3	K4	K5	K6	K7	C	A	S	L
med	atribut										
K1	R	0,805	0,513	0,731	0,729	0,856	0,773	-0,036	0,292	0,312	0,608
	p	<i>5,7×10⁻⁶²</i>	<i>4,7×10⁻¹²</i>	<i>8,1×10⁻⁴⁶</i>	<i>1,9×10⁻⁴⁵</i>	<i>5,6×10⁻⁷⁸</i>	<i>2,7×10⁻⁵⁴</i>	<i>5,6×10⁻⁰¹</i>	<i>1,2×10⁻⁰⁶</i>	<i>2,0×10⁻⁰⁷</i>	<i>2,3×10⁻²⁸</i>
K2	R		0,209	0,789	0,540	0,755	0,600	0,172	0,440	0,458	0,419
	p		<i>8,1×10⁻⁰³</i>	<i>5,7×10⁻⁵⁸</i>	<i>1,2×10⁻²¹</i>	<i>1,4×10⁻⁵⁰</i>	<i>1,6×10⁻²⁷</i>	<i>4,9×10⁻⁰³</i>	<i>4,4×10⁻¹⁴</i>	<i>2,9×10⁻¹⁵</i>	<i>9,4×10⁻¹³</i>
K3	R			0,277	0,790	0,529	0,615	-0,031	0,199	0,086	0,738
	p			<i>4,0×10⁻⁰⁴</i>	<i>3,7×10⁻³⁵</i>	<i>7,6×10⁻¹³</i>	<i>6,7×10⁻¹⁸</i>	<i>7,0×10⁻⁰¹</i>	<i>1,2×10⁻⁰²</i>	<i>2,8×10⁻⁰¹</i>	<i>1,3×10⁻²⁸</i>
K4	R				0,509	0,774	0,659	0,175	0,456	0,579	0,445
	p				<i>5,1×10⁻¹⁹</i>	<i>1,9×10⁻⁵⁴</i>	<i>1,2×10⁻³⁴</i>	<i>4,2×10⁻⁰³</i>	<i>4,0×10⁻¹⁵</i>	<i>2,6×10⁻²⁵</i>	<i>2,3×10⁻¹⁴</i>
K5	R					0,688	0,762	0,051	0,280	0,204	0,741
	p					<i>8,5×10⁻³⁹</i>	<i>5,9×10⁻⁵²</i>	<i>4,1×10⁻⁰¹</i>	<i>3,4×10⁻⁰⁶</i>	<i>8,0×10⁻⁰⁴</i>	<i>8,0×10⁻⁴⁸</i>
K6	R						0,861	0,102	0,389	0,430	0,667
	p						<i>5,8×10⁻⁸⁰</i>	<i>9,8×10⁻⁰²</i>	<i>4,5×10⁻¹¹</i>	<i>2,1×10⁻¹³</i>	<i>1,1×10⁻³⁵</i>
K7	R							0,060	0,363	0,380	0,769
	p							<i>3,3×10⁻⁰¹</i>	<i>9,8×10⁻¹⁰</i>	<i>1,3×10⁻¹⁰</i>	<i>2,3×10⁻⁵³</i>
C	R								0,650	0,270	0,083
	p								<i>2,2×10⁻³³</i>	<i>7,4×10⁻⁰⁶</i>	<i>1,8×10⁻⁰¹</i>
A	R									0,543	0,345
	p									<i>7,4×10⁻²²</i>	<i>7,2×10⁻⁰⁹</i>
S	R										0,266
	p										<i>1,1×10⁻⁰⁵</i>

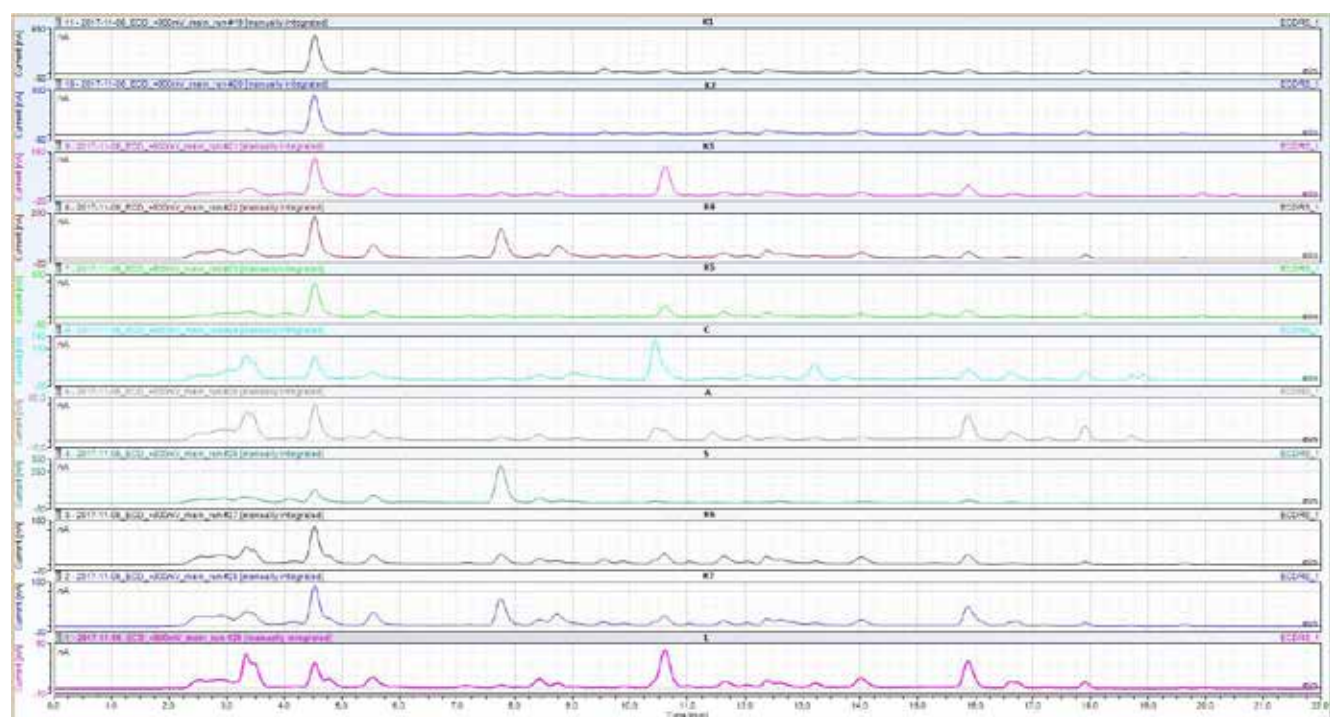
K1- K7 – kostanjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med; R – r ali rho korelacijski koeficient; p – stopnja statistične značilnosti.



Slika 1: HPLC-DAD kromatogram vseh 11 'direktnih' vzorcev pri valovni dolžini 280 nm. K1-K7 – kostanjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med.



Slika 2: HPLC-ECD kromatogram vseh 11 'direktnih' vzorcev pri električnem potencialu 400 eV. K1-K7 – kostanjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med.



Slika 3: HPLC-ECD kromatogram vseh 11 'direktnih' vzorcev pri električnem potencialu 800 eV. K1-K7 – kostanjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med.

pozitivnim rezultatom smo izbrali nižjo mejo statistične značilnosti ($p < 0,01$) kot je običajno ($p < 0,05$). Kromatografski vrhovi s še posebej visoko stopnjo statistične značilnosti ($p < 0,001$) v razlikah površine so vredni še posebne pozornosti, saj tako nizka p-vrednost kaže na majhno verjetnost, da so opažene razlike posledica naključja (Sli-

ka 4, stolpci z zvezdico *).

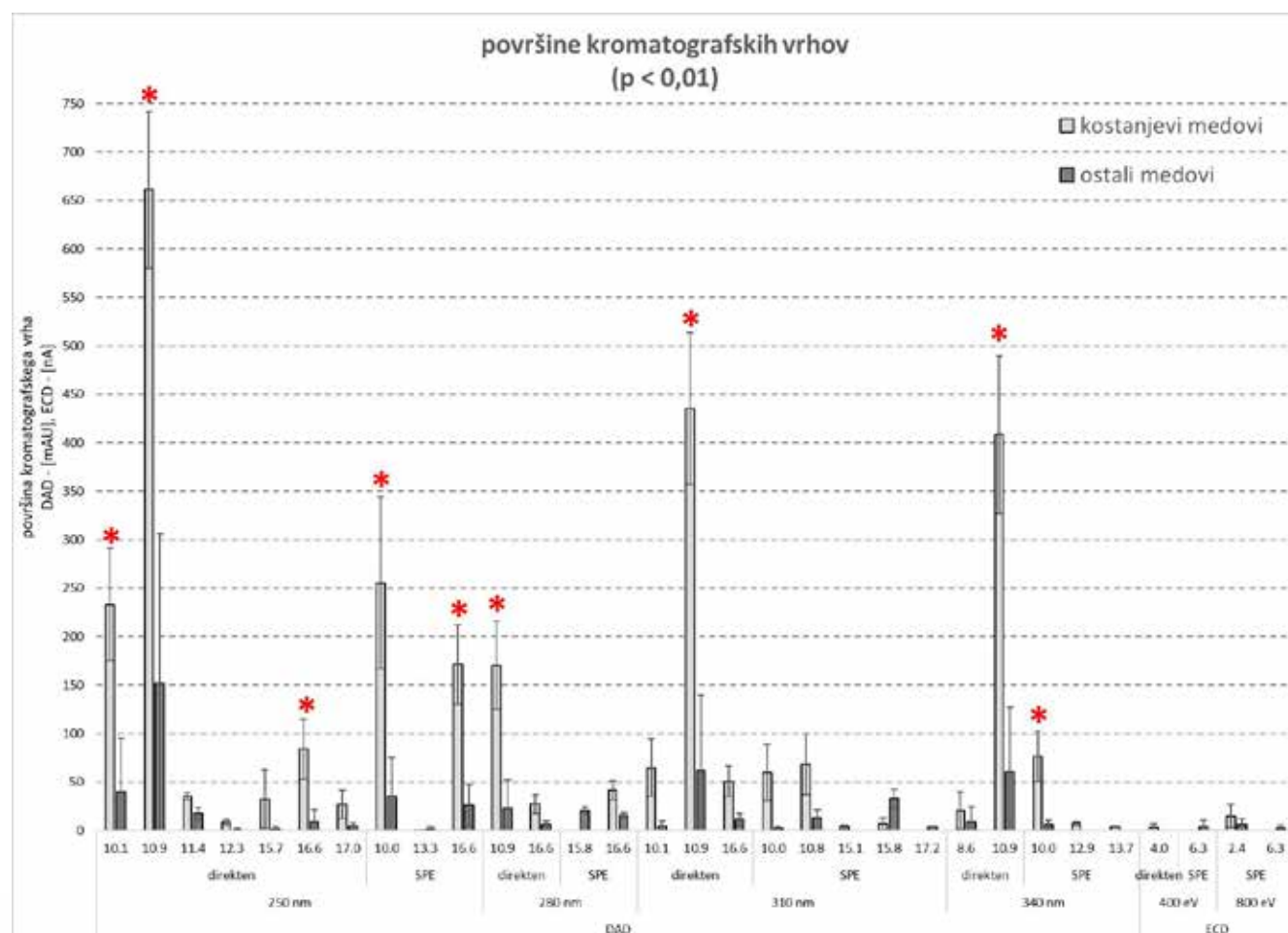
Uporaba **HPLC-ECD** se v našem primeru ni pokazala kot visoko informativna. Izmed 31 kromatografskih vrhov s $p < 0,001$ so namreč le 4 bili identificirani z ECD detektorjem (Slika 4). Poleg tega imajo vsi relativno nizke absolutne vrednosti, zaradi česar je zaupanje v opažene razlike

ustrezno manjše. HPLC-ECD tehnika se je pri analizah medu sicer že pokazala kot uporabna pri razločevanju enovrstnih medov (Zhao s sod., 2016), vendar med njimi ni bilo kostanjevega. Na tem mestu bi izpostavili le kromatografski vrh z RT 9,5 min, opažen na kromatogramu 400 mV, tako direktnega kot SPE vzorca (podatki niso prikazani). Sicer je statistična značilnost relativno nizka ($p = 0,024$ in $p = 0,027$), vendar se ta kromatografski vrh od drugih razlikuje po tem, da je bil opažen pri vseh kostanjevih medovih in pri nobenem od ostalih. Takšen biomarker, katerega 'specifika je v prisotnosti', in ne 'specifika v količini', ima lahko veliko praktično vrednost.

Večina kromatografskih vrhov, dobljenih s **HPLC-DAD**, je bilo večjih pri kostanjevih medovih kot pri ostalih, z izjemo 3 (RT = 13,3 min, RT = 15,8 min, RT = 17,2 min). Direktni vzorec je bolj informativen pri identifikaciji spojin, ki absorbirajo v UV-C območju (250 in 280 nm), SPE ekstrakti pa pri analizi spojin, ki absorbirajo UV-A

in UV-B elektromagnetno valovanje (310 in 340 nm). Vse spojine, ki jih predstavljajo kromatografski vrhovi na Sliki 4, najverjetneje niso antioksidanti, vsaj ne in vitro v naših eksperimentalnih razmerah. Če bi imele antioksidativne lastnosti, bi bile namreč opažene tudi pri ECD kromatogramih. Izmed vseh statistično značilnih rezultatov DAD kromatogramov najbolj izstopajo 3 kromatografski vrhovi, in sicer z RT približno 10,0, približno 10,9 in približno 16,6 min. Spojina z RT = 10,0 min je bila zaznana tako v direktnih kot v SPE vzorcih, kar kaže na molekulo s polarnimi in nepolarnimi funkcionalnimi spojinami. Spojina z RT = 10,9 min je kemijsko pretežno polarna, saj je prisotna samo pri direktnih vzorcih, podobno velja tudi za spojino z RT = 16,6 min.

Namen te konkretne raziskave ni bil kemijska identifikacija spojin, temu se bomo posvetili v nadaljevanju. V znanstveni literaturi že lahko zasledimo kar nekaj raziskav na to temo, tudi za kostanjev med. Identifikacijo z upo-



Slika 4: Statistično značilno (* – $p < 0,001$; brez * – $p < 0,01$) različne intenzitete kromatografskih vrhov med kostanjevimi in ostalimi medovi. Prva vrstica vodoravne osi predstavlja retencijski čas v minutah, druga vrstica tip vzorca, tretja vrstica valovno dolžino oz. električni potencial detektorja in četrta tip detektorja. Stolpci predstavljajo povprečne vrednosti s standardnim odklonom. DAD – detektor z nizom diod; ECD – elektrokemijski detektor; SPE – vzorec po ekstrakciji na trdni fazi.

rabo eksternih standardov je poskusil že Tomas-Barberan s sod. (2001), vendar precej neuspešno. Uspelo jim je namreč identificirati le za propolis značilne spojine, identiteta 9 ostalih za kostanj značilnih spojin je ostala neznana. Študija Alissandrakis s sod. (2011) je bila temeljitejša. S plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS) so analizirali ekstrakte kostanjevega medu in kostanjevih cvetov. Količina 1-feniletanola, 1-feniletanona, fenilmetanola in 2-aminoacetofenona, ter njihovo razmerje, naj bi bili najzanesljivejši botanični biomarkerji kostanjevega medu (najdeni tako v kostanjevih cvetovih kot v kostanjevem medu), medtem ko sta cis-cinamil alkohol in p-hidroksiacetofenon specifična za kostanjev med, ni pa ju najti v kostanjevem nektarju. Slabost omenjene študije

je, da so z GC-MS zajeli samo hlapne komponente. Temu se je izognil Truchado s sod. (2009) z uporabo nuklearne magnetne resonance (NMR). V kostanjevem nektarju, izoliranem iz čebeljega prebavnega trakta, so identificirali 2 kvinolonska alkaloida [4-hidroksikvinolin-2-karboksilno (kinurensko) kislino in 4-kvinolon-2-karboksilno kislino], 1 monoterpen [4-(1-hidroksi-1-etilmetil)cikloheksa-1,3-dien-1-karboksilna kislina], njegov gentiobiozidni ester ter 1 flavonol [kvercetin-3-pentozilheksozid]. Vse od naštetih so našli tudi v kostanjevem medu, vendar se le oba alkaloida zdita primerna botanična markerja, saj dosedaj nista bila najdena še v nobeni drugi vrsti medu.

ZAKLJUČEK

Zaključimo lahko, da je tehnika HPLC-DAD uporabna pri presejalnih raziskavah iskanja označevalcev medu. Tudi SPE ekstrakcija je informativna, saj večine kromatografskih vrhov pri direktnih vzorcih ni moč zaznati. Majhno število vzorcev v naši raziskavi uporabnosti HPLC-ECD pri identifikaciji kostanjevega medu še ne izključuje povsem. Potrebne so nadaljnje raziskave na več vzorcih in morda pri drugačnih električnih potencialih detektorja.

Na osnovi zgoraj predstavljenih rezultatov smo zastavili razširjen in poglobljen eksperiment, ki vključuje večje število vzorcev ($N = 52$) in analitske tehnike, primerne za absolutno identifikacijo biokemijskih spojin (LC-MS/MS). Pričakujemo vsaj potrditev že znanih kostanjevih biomarkerjev, v najboljšem primeru pa identifikacijo povsem novega biomarkerja oz. več njih, značilnih izključno za slovenski kostanjev med.



LITERATURA

- Alissandrakis E., Tarantilis P. A., Pappas C., Harizanis P. C., Polissiou M. (2011). Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compound. LWT - Food Science and Technology, 44, 1042-1051.
- URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810003464>
- Bogdanov S., Ruoff K., Persano Oddo L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. Apidologie, 35, S4-S17.
- URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2017.1411181>
- Ministrstvo RS za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (2015). Pravilnik o medu. Uradni list RS, št. 4/11, 26/14 – ZKme-1B in 9/15. EVA: 2010-2311-0017. SOP: 2011-01-0104. URL: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV9963#>
- Mukaka, M. (2012). A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. Malawi Medical Journal, 24, 69-71.
- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/>
- Tomas-Barberan F. A., Martos I., Ferreres F., Radovic B. S., Anklam E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 485-496.
- URL: <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>
- Truchado P., Martos I., Bortolotti L., Sabatini A. G., Ferreres F., Tomas-Barberan F. A. (2009). Use of Quinoline Alkaloids as Markers of the Floral Origin of Chestnut Honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 5680-5686.
- URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf900766v>
- Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 20. decembra 2006 o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/ALL/?uri=CELEX:02006R1924-20121129>
- Zhao J., Du X., Cheng N, Chen L, Xue X., Zhao J., Wu L., Cao W. (2016). Identification of mono-floral honeys using HPLC–ECD and chemometrics. Food Chemistry, 194, 167-174. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.010>.