

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA TOMSIČ

**UGOTAVLJANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE SVEŽIH IN
STARANIH KOKOŠJIH JAJC IZ RAZLIČNIH VIROV Z UPORABO
PLINSKE KROMATOGRAFIJE**

DIPLOMSKO DELO

LJUBLJANA, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA TOMSIČ

**UGOTAVLJANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE SVEŽIH IN STARANIH
KOKOŠJIH JAJC IZ RAZLIČNIH VIROV Z UPORABO PLINSKE
KROMATOGRAFIJE**

**DETERMINATION OF FATTY ACID COMPOSITION OF FRESH AND AGED
CHICKEN EGGS FROM DIFFERENT SOURCES USING GAS
CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za nasvete in vsestransko pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se Katji Stojilkovski, mag. farm. za pomoč pri delu v laboratoriju in praktične nasvete. Za vso pomoč se prav tako zahvaljujem prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Seveda vsega tega ne bi bilo brez vas, dragi straši, ki ste me tekom študija na vse načine podpirali in spodbujali ter mi vedno stali ob strani.

Hvala tudi Mateju, Niki, Ani in Tanji ter vsem sošolcem in prijateljem za nesebično pomoč in leta, ki ne bodo nikoli pozabljena!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Predsednik komisije: prof. dr. Uroš Urleb, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
1 UVOD	1
1.1 KOKOŠJE JAJCE – visoko hranljivo živilo	1
1.1.1 Prehranska vrednost jajc.....	1
1.1.2 Kakovost jajc	4
1.1.2.1 Spremembe sestave jajc med shranjevanjem.....	4
1.1.2.2 Shranjevanje jajc in ohranjanje njihove kakovosti.....	6
1.2 MAŠČOBNE KISLINE	8
1.2.1 Pomen maščobnih kislin za organizem	9
1.2.2 Omega-3 obogatena jajca	13
1.3 PLINSKA KROMATOGRFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS).....	15
2 NAMEN DELA	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1. MATERIALI	19
3.1.1 Vzorci	19
3.1.1.1 Vzorci kupljenih jajc iz dveh farm in Mercatorja ter domačih jajc.....	19
3.1.1.2 Vzorci jajc kokoši, ki so jih hranili s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo (vzorci rumenjakov smo prejeli iz Biotehniške fakultete v Ljubljani).....	20
3.1.1.3 Vzorci kupljenih jajc, obogatenih z omega-3 maščobnimi kislinami, in svežih domačih jajc.....	21
3.1.2. Reagenti	21
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema	22
3.2 METODE.....	23
3.2.1 Izračun Haughovih enot	23
3.2.2 Ugotavljanje sestave maščobnih kislin jajc z modificirano farmakopejsko metodo A	23
3.2.2.1 Priprava pentanskega ekstrakta	23

3.2.2.2 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin s modificirano farmakopejsko metodo A.....	23
3.2.2.3 Plinska kromatografija z masno spektroskopijo.....	25
3.2.2.4 Izračun vsebnosti maščobnih kislin na gram jajca.....	26
3.2.3 Ugotavljanje sestave maščobnih kislin jajc z metodo »in situ« preestrenja.....	28
3.2.3.1 Tvorba pripadajočih estrov maščobnih kislin »in situ«	28
3.2.3.2 Plinska kromatografija z masnim detektorjem	28
3.2.3.3 Izračun vsebnosti maščobnih kislin na gram jajca.....	29
3.2.4 Priprava standardov	30
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	31
4.1 UGOTOVITEV HAUGHОВИH ENOT	31
4.2 RAZVOJ KLASIČNE METODE UGOTAVLJANJA MAŠČOBNIH KISLIN	33
4.3 RAZVOJ METODE »IN SITU« PREESTRENJA MAŠČOBNIH KISLIN	34
4.4 ANALIZA JAJC.....	36
4.4.1 Rezultati analize jajc s klasično metodo.....	36
4.4.2 Rezultati analize jajc z direktno metodo	41
4.4.2.1 Analiza maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov, staranih pri različnih temperaturah okolja	41
4.4.2.2 Vpliv hranjenja kokoši s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo na sestavo in vsebnost maščobnih kislin v rumenjakih	51
4.4.2.3 Sestava in vsebnost maščobnih kislin v omega-3 obogatenih in svežih domačih jajcih	57
5 SKLEP	59
6 LITERATURA	60
7 PRILOGA	64

POVZETEK

Kokošje jajce je skupek hranil, ki je sposobno ustvariti in ohranjati življenje piščanca. Je tudi eden najbogatejših virov hranil, potrebnih za rast in razvoj človeškega organizma. Vsebnost teh hranil pa je odvisna tako od starosti in pasme kokoši kot tudi od letnega časa ter sestave krme kokoši. S slednjo je mogoče vplivati predvsem na sestavo maščobnih kislin v jajčnih lipidih, kar rejci prida izkoriščajo. Tako je tudi na slovenskem tržišču prisotnih več blagovnih znamk jajc, ki so med drugim obogatena tudi z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami. Nekatera hranila v jajcu se s časom in temperaturo shranjevanja jajc spreminjajo. Tako se kakovost jajc, shranjenih pri sobni temperaturi, v enem dnevu poslabša bolj kot hlajenim jajcem v petih dneh.

Namen diplomskega dela je bila ugotovitev vpliva staranja jajc pri različnih temperaturah in spremenjene krme kokoši na sestavo in vsebnost maščobnih kislin. Najprej smo preverili kakovost jajčne vsebine pri različnih temperaturah staranih jajc in sicer s pomočjo Haughovih enot, katerih število naj bi se s staranjem jajc manjšalo.

Nato pa smo se lotili analize maščobnih kislin v različnih jajcih. Pri ekstrakciji in pretvorbi maščobnih kislin v pripadajoče metilne estre smo za prvo od treh serij jajc iz različnih virov (farma Budin, farma Colja, Mercator® in domača jajca) uporabili farmakopejsko metodo, pri drugih dveh serijah teh jajc pa smo uporabili »*in situ*« preestrenje maščobnih kislin, ki se je potem tudi izkazala za bolj uporabno metodo. Prav tako smo direktno metodo uporabili tudi za pripravo vzorcev z omega-3 obogatenih, svežih domačih jajc in rumenjakov kokoši, ki so jih krmili s piro, navadno in tatarsko ajdo. Vsebnost nastalih metilnih estrov maščobnih kislin smo potem ugotovili z uporabo plinskega kromatografa, povezanega z masnim spektrometrom. Koncentracije estrov maščobnih kislin v vzorcih smo kvantificirali s pomočjo njihovih standardov in jih nato preračunali v mg maščobnih kislin na gram jajca. Zaradi lažje obravnave rezultatov smo maščobne kisline razdelili v nasičene, enkrat nenasičene, omega-6 in omega-3 maščobne kisline.

Vsebnost vseh štirih skupin maščobnih kislin je odvisna tako od vira, kjer smo jajca kupili in od temperature okolja, kjer smo jajca starali, kot tudi od krmljenja kokoši s piro, navadno in tatarsko ajdo.

Pri ugotavljanju vsebnosti maščobnih kislin v svežih domačih in z omega-3 obogatenih jajcih smo ugotovili, da so sveža domača jajca bogatejša z vsemi štirimi skupinami maščobnih kislin, zanimivo tudi z omega-3 maščobnimi kislinami.

ABSTRACT

Hen egg is a combination of nutrients capable of developing and maintaining chicken's life. It is also one of the richest sources of nutrients needed for growth and development of the human organism. The content of these nutrients depends on the age and breed of chickens as well as on the season and the composition of chicken feed. The latter can influence in particular the composition of fatty acids in egg lipids, which is fairly exploited by breeders. Several egg brands, enriched also in polyunsaturated fatty acids, are therefore presented on the Slovenian market. Some of the nutrients in the egg vary with time and temperature of egg storage. Thus, the quality of eggs stored at room temperature deteriorates more in one day than the quality of the chilled eggs in five days.

The purpose of the thesis was to establish the impact of aging eggs at different temperatures and modified chicken feed on the composition and content of fatty acids. Firstly, we tested the quality of egg content at different temperatures of old eggs by means of Haugh units whose number was expected to diminish by eggs aging.

Then we started the analysis of fatty acids in different eggs. In the extraction and conversion of fatty acids into the corresponding methyl esters, the method described in the Pharmacopoeia was used for the first of the three batches of eggs from different sources (farms Budin and Colja, Mercator[®] and domestic eggs). For the other two batches of eggs, the »*in situ*« transesterification of fatty acids was used, which was subsequently proved to be a more useful method. The direct method was also used for the sample preparation of fresh domestic hen eggs and yolks, enriched with omega-3 fatty acids, hen being fed by spelt, common and tartary buckwheat. The content of the generated fatty acid methyl esters was then determined using a gas chromatograph connected to a mass spectrometer. Concentrations of fatty acids in the samples were quantified by the reference compounds and then converted into mg of fatty acids per gram of eggs. In order to facilitate reading of the results, the fatty acids were divided into saturated, monounsaturated, omega-6 and omega-3 fatty acids.

The content of all four groups of fatty acids depends on the source, where the eggs were bought, and the temperature of the environment in which the eggs aged, as well as on feeding chickens with spelt, common and tartary buckwheat. In determining the fatty acid content in fresh domestic and omega-3 enriched eggs, it was found that fresh domestic eggs are richer with all four types of fatty acids and even with omega-3 acids.

SEZNAM OKRAJŠAV

AK – arahidonska kislina

ALK – alfa-linolenska kislina

BF₃ – borov trifluorid

CI – (angl.: *chemical ionization*) kemijska ionizacija

DGLK – dihomogama-linolenska kislina

DHK – dokozaheksaenojska kislina

EI – (angl.: *electron ionization*) ionizacija z zajetjem elektronov

EPK – eikozapentaenojska kislina

F.A.M.E. Mix C4-C24 – (angl.: *Fatty Acid Methyl Esters*) metilni estri maščobnih kislin C4-C24

GC – (angl.: *Gas chromatography*) plinska kromatografija

GC-MS – (angl.: *Gas chromatography-mass spectrometry*) plinska kromatografija z masno spektrometrijo

GLK – gama-linolenska kislina

HDL – (angl.: *high-density lipoproteins*) lipoproteini velike gostote

H.E. – (angl.: *Haugh units*) Haughove enote

IE – (angl.: *international units*) internacionalne enote

LDL – (angl.: *low-density lipoproteins*) lipoproteini majhne gostote

LK – linolna kislina

M – molarna koncentracija (mol/l)

MEMK – metilni estri maščobnih kislin

min - minuta

MK – maščobna kislina

m/z – (angl.: *mass-to-charge value*) razmerje mase z nabojem

n-6/n-3 – razmerje omega-6 in omega-3 maščobnih kislin

RPM – (angl.: *rotations per minute*) obrati na minuto

RT – retencijski čas

S/N – (angl.: *signal-to-noise ratio*) razmerje med signalom in šumom

T – temperatura

TIC – (angl.: *Total ion current*) celokupni ionski tok

TMK – *trans* maščobna kislina

UV – ultravijolična svetloba

VNМК – večkrat nenasičena maščobna kislina

1 UVOD

1.1 KOKOŠJE JAJCE – visoko hranljivo živilo

Kokošja jajca so ena izmed hranil, ki so široko zastopana po celem svetu in se v prehrani ljudi uporabljajo že od antičnih časov (1). So skoraj popolna naravna beljakovinska hrana s številnimi drugimi visoko kakovostnimi hranili. Jajca so hitro prebavljiva in zagotavljajo pomemben del dnevnih hranil za rast in ohranjanje telesnih tkiv. Uporabljajo se tako v prehrambeni industriji kot tudi v domače namene. Najpomembnejša so kokošja jajca, medtem, ko imajo jajca ostalih ptic (gosi, race, galebi, prepelice) manjši pomen. Beseda jajca, brez pridevnika, se splošno nanaša na kokošja jajca (2).

1.1.1 Prehranska vrednost jajc

Jajce je oplojena ali neoplojena jajčna celica z rezervnimi hranilnimi snovmi (3). Jajce je v prvi vrsti narejeno za razvoj piščanca, saj vsebuje vsa potrebna hranila za njegov razvoj (1). Sestavljeno je iz 11 % lupine, 58 % beljaka in 31 % rumenjaka. Energijska vrednost jajca je približno 350 kJ (75 kcal), od tega skoraj 80 % pripada rumenjaku (58 kcal) (4). Na vsebnost hranil v jajcu vplivajo tako starost in pasma kokoši kot tudi letni čas in sestava krme, s katero se kokoši hranijo. Medtem ko vsi dejavniki povzročijo majhne razlike, pa se lahko sestava maščobnih kislin v jajčnih lipidih slikovito spremeni s spremenjenim krmljenjem kokoši (5).

Ogljikohidrati

Jajca vsebujejo malo ogljikohidratov (manj kot 1 %), od tega jih je polovica vezanih v glikoproteine, ostalo pa je prosta glukoza (5).

Beljakovine

Čeprav jajca vsebujejo 74 % vode, so bogat vir kakovostnih beljakovin (12,6 %) s tako popolno aminokislinsko sestavo, da so jajčne beljakovine uporabne kot standard za merjenje prehranske kakovosti drugih beljakovinskih živil (6,7,8). Jajčne beljakovine vsebuje tako beljak kot rumenjak, v katerem je večina prisotna v nizkomolekularnem

lipoproteinu (LDL), visokomolekularnem lipoproteinu (HDL), fosfitinu in livetinu. Beljak je sestavljen iz približno 40 različnih vrst proteinov. Najbolj zastopan je ovalbumin (54 %), ki mu sledita ovotransferin (12 %) in ovomucoid (11 %) (5).

Lipidi

Lipidi (9,9 %) so zbrani v rumenjaku in so lahko prebavljivi (6). Kot prikazuje preglednica 1, je v jajčnem rumenjaku največ trigliceridov (66 %), ki jim sledijo fosfolipidi (28 %) in holesterol (6 %). Med fosfolipidi je največ fosfatidilholina (73 %) (2,5).

Povprečno 60 g težko jajce vsebuje približno 6 g lipidov, ki so v povprečno 17 g težkem rumenjaku. V njem je približno 2,1 g nasičenih, 2,7 g enkrat nenasičenih in 1,2 g večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Nasičene in nenasičene maščobne kisline v jajčnem rumenjaku so v razmerju 1 : 1,8. Jajca so bogat vir nenasičenih maščobnih kislin, predvsem oleinske in linolne kisline (6).

Preglednica 1: Lipidi v jajčnem rumenjaku (2)

Vrsta maščobe	% vseh lipidov	% fosfolipidne frakcije
Trigliceridi	66	
Fosfolipidi	28	
Fosfatidilholin		73
Fosfatidiletanolamin		15,5
Lisofosfatidilholin		5,8
Sfingomielin		2,5
Lisofosfatidiletanolamin		2,1
Plazmalogen		0,9
Fosfatidilinozitol		0,6
Holesterol in holesterolni estri ter ostale komponente	6	

Jajčni rumenjak vsebuje tudi dva ksantofila (karotena z alkoholno skupino), ki so zdravju koristna. To sta lutein in zeaksantin (186 µg/jajce). Indikator vsebnosti luteina in ksantofilina v jajcu je barva jajčnega rumenjaka. Bolj kot je rumenjak temno rumenooranžen, večja je vsebnost ksantofilov. Jajčni ksantofili imajo večjo

biorazpoložljivost kot ksantofili iz rastlin, saj jajčne maščobe olajšajo njihovo absorpcijo (5).

Vitamini

Kot prikazuje preglednica 2, jajca vsebujejo vse v Preglednica 2: Vsebnost vitaminov v celim jajcu (5) maščobi topne vitamine (A, D, E, K) in glavnino vodotopnih vitaminov. Odsoten je vitamin C, saj ga piščanec za svoj razvoj ne potrebuje. Jajca so eden izmed naravnih virov vitaminov D in B₁₂ (5).

Vitamin	Celo jajce
Tiamin (mg)	0,04
Riboflavin (mg)	0,24
Niacin (mg)	0,04
Pantotenska kislina (mg)	0,72
Vitamin B ₆ (mg)	0,07
Folat (µg)	23,5
Vitamin B ₁₂ (µg)	0,65
Vitamin A (IE)	243,5
Holin (mg)	125,5
Retinol (µg)	70
Vitamin E (mg)	0,49
Vitamin D (IE)	17,3
Vitamin K (µg)	0,15

Minerali

Minerali so v jajcu prisotni v majhnih količinah (0,6 %) Preglednica 3: Vsebnost mineralov v celim jajcu (5) (2). Pomembni so predvsem železo, ki ga najdemo v jajčnem rumenjaku, kalcij, fosfor, natrij, kalij, magnezij, cink, baker in mangan (preglednica 3). Poleg tega vsebuje rumenjak tudi jod (25 µg/jajce), katero količino lahko dvakrat do trikrat povečamo z dodatkom joda v krmo kokoši (5).

Mineral	Celo jajce
Fosfor (mg)	95,5
Natrij (mg)	70,0
Kalij (mg)	67,0
Kalcij (mg)	26,5
Magnezij (mg)	6,0
Železo (mg)	0,92
Cink (mg)	0,56
Baker (mg)	0,05
Mangan (mg)	0,02
Selen (µg)	15,85

1.1.2 Kakovost jajc

Za večino porabnikov pojem kakovosti jajc vključuje predvsem fizikalno-kemijske lastnosti rumenjaka, beljaka in lupine. Kakovost jajc določajo tiste lastnosti, ki vplivajo na njihovo sprejemljivost za porabnika. To so predvsem vonj, svežost, barva lupine in rumenjaka. V Sloveniji lahko porabniki kupujemo le jajca v lupini, ki predstavlja po eni strani naravno ovojnino, po drugi strani pa ostane jajčna vsebina uporabniku neznana do trenutka uporabe (6).

Kakovost beljaka: Haughove enote (H.E.)

Splošno uporabljeno merilo kakovosti beljaka so Haughove enote (H.E.), ki so izračunane po formuli, osnovani na višini gostega beljaka in masi jajca, pri čemer sta V – višina beljaka in M – masa jajca (6):

$$H.E. = 100 \log (V + 7,57 - 1,7 M^{0,37})$$

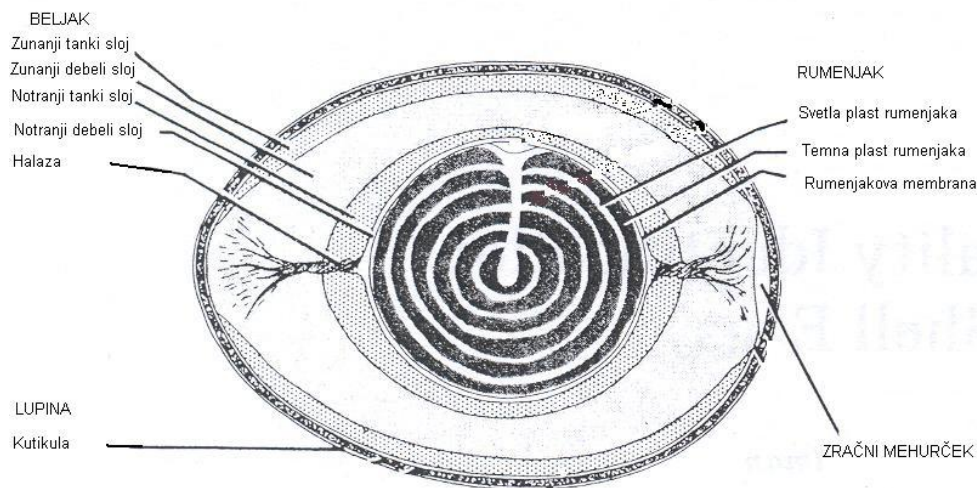
Večja kot je vrednost, boljša je kakovost beljaka. Obstajajo lestvice razvrščanj jajc v kakovostne razrede po številu Haughovih enot. Tako na primer H. E. pod 55 pomenijo za porabnika nesprejemljivo kakovost in nad 90 odlično kakovost (6).

1.1.2.1 Spremembe sestave jajc med shranjevanjem

V gospodinjstvu je poznano ugotavljanje starosti jajc s potapljanjem v vodo. Sveže jajce potone na dno posode, starejše se nekoliko potopi, medtem ko zelo staro jajce plava na vodni površini. S staranjem jajca voda izhlapeva skozi pore lupine, v jajčno vsebino pa vdira zrak. Tako se velikost zračnega mehurčka s starostjo povečuje. Spremembe so opazne tudi na beljaku in rumenjaku (6).

Beljak je sestavljen iz štirih slojev, in sicer iz zunanega tankega in zunanega debelega sloja beljaka ter iz notranjega tankega, ki mu sledi notranja debela plast beljaka (slika 1) (1). V slednjem, notranjem debelem sloju beljaka, sta tudi beljakovinski vrvici, imenovani halazi, ki sta na eni strani pritrjeni na notranjo opno rumenjaka, na drugi pa na keratinski opni. Njuna vloga je zadrževanje rumenjaka oz. kasneje embrija v sredini jajca (3). Delež posameznih plasti beljaka se spreminja. Odvisen je tako od pasme in starosti kokoši, kot

tudi od starosti jajca. S staranjem postane beljak manj čvrst, njegova viskoznost se zmanjšuje. Debel, gelu podoben del beljaka se razlikuje od tankega sloja beljaka samo v približno štirikratni vrednosti ovomucina, ki je tudi vzrok večje viskoznosti debelega sloja beljaka. Ovomucin je toplotno obstojen, v vodi tvori netopen kompleks z lizocimom. Disociacija kompleksa je odvisna od pH, zato naj bi bil ovomucin povezan z tanjšanjem debelega sloja beljaka med shranjevanjem jajc. pH beljaka svežega jajca je 7,6 – 7,9 in s časom shranjevanja lahko naraste tudi do 9,7. Vzrok za povečanje pH beljaka je difuzija raztopljenega CO₂ skozi jajčno lupino navzven. Dvig pH je odvisen tako od časa kot tudi od temperature shranjevanja jajc (2).



Slika 1: Vzdolžni prerez jajca, na kateremu lahko vidimo vse štiri sloje beljaka (1)

Ovalbumin je najbolj zastopan protein v beljaku, ki pa se s časom shranjevanja jajc spremeni v bolj temperaturno obstojno obliko S-ovalbumin. Vsebnost S-ovalbumina v šestih mesecih hladnega skladiščenja jajc naraste iz 5 % na 81 % (2).

S staranjem popuščajo tudi halaze, zato se rumenjak pomakne proti lupini. Voda prehaja iz beljaka skozi rumenjakovo membrano v rumenjak, povečuje se prostornina rumenjaka, dokler membrana ne popusti (6). Stopnja prenosa vode je odvisna od temperature zraka zunaj lupine in sicer prehod vode je hitrejši čim višja je temperatura okolja. Rumenjakova membrana postane šibka in takoj počí, ko jajce razbijemo (1).

Premik vode iz beljaka v rumenjak med 1-2 tedenskim shranjevanjem jajc povzroči 2-4 % izgubo trdnih snovi v rumenjaku. Vrednost pH rumenjaka je 6,0. pH rumenjaka s časom

shranjevanja jajc narašča veliko bolj počasi, kot pH beljaka, in tudi po daljšem času shranjevanja ne preseže vrednosti 6,9 (2).

Med shranjevanjem jajc naj ne bi prišlo do sprememb v sestavi in količini maščobnih kislin. To je leta 1967 pokazal Evans s sodelavci (1), ko so raziskovali vsebnost maščobnih kislin v svežih jajcih in v jajcih, shranjenih šest oz. dvanajst mesecev pri 0 °C. Ugotovili so, da se količina maščobnih kislin v jajcih s časom shranjevanja ne spreminja (1). Enako je leta 1994 dokazal tudi Marshall s sodelavci (9), saj je ugotovil, da ostaja med shranjevanjem jajc pri 5°C količina večkrat nenasičenih maščobnih kislin v rumenjaku konstantna (9). Tudi, če so jajca 40 dni shranjena pri 12,8 °C, se vrednost maščobnih kislin ne spremeni (1).

1.1.2.2 Shranjevanje jajc in ohranjanje njihove kakovosti

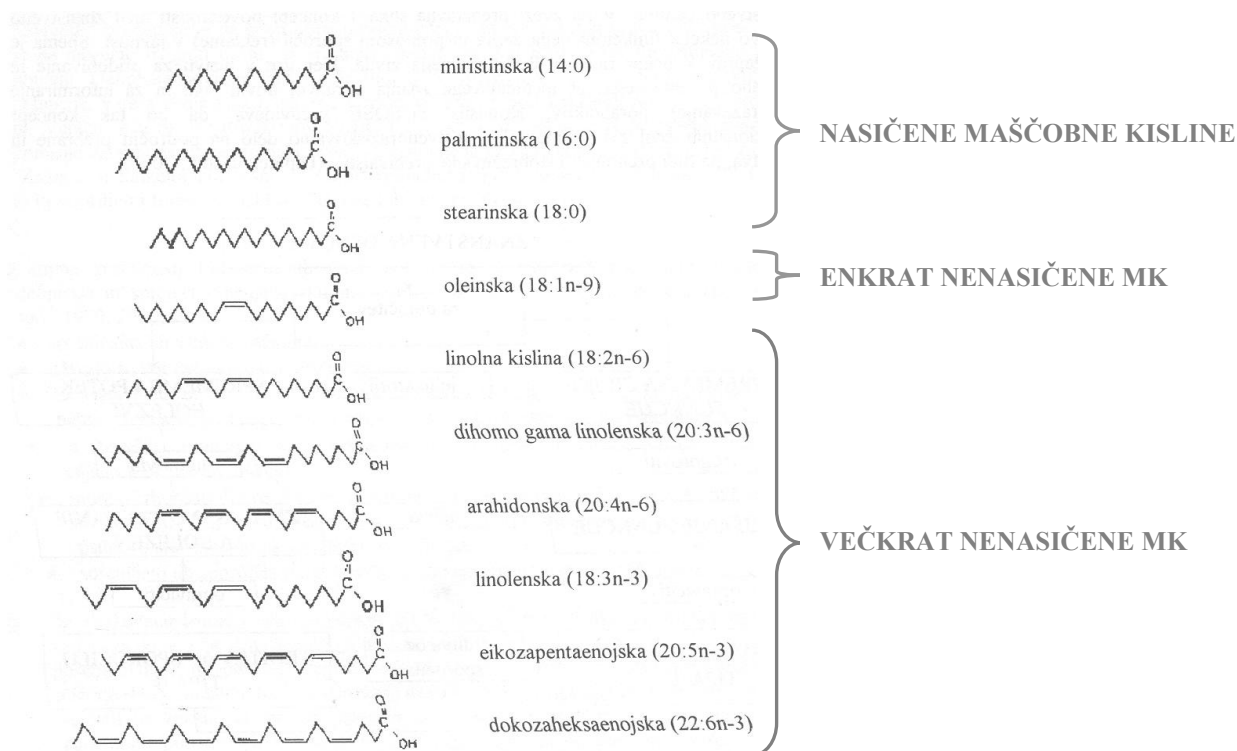
Jajce je pokvarljivo živilo, zato je treba takoj po znesenju minimizirati izgubo kakovosti. Pri tem igra pomembno vlogo čas od znesenja jajca do kupca oz. uporabe. Po znesenju je potrebno jajca takoj ohladiti, saj izpostavljenost visokim temperaturam vodi do fizikalnih in kemijskih sprememb (1). Zato je treba jajca pobirati iz gnezd najmanj dvakrat dnevno v hladnem vremenu in trikrat v toplejših mesecih (4). Tudi, če je shranjevanje jajc pri temperaturah ledišča najbolj učinkovito za ohranjanje kakovosti, jajca navadno shranjujemo pri 10°C. Problem nizkih temperatur shranjevanja je kondenzacija vlage na ohlajenem jajcu po vzetju iz hladilnika. »Potenje«, kot ta pojav imenujemo, zmanjšamo s shranjevanjem jajc pri višjih temperaturah. Po drugi strani pa je v prostoru, kjer jajca shranjujemo, zaželena relativno visoka vlažnost (75 - 80 %), saj s tem zmanjšamo izgubo vode skozi jajčno lupino, posledično pa je tudi manjša izguba mase jajca. Po drugi strani pa vlažnost nima vpliva na kakovost beljaka in rumenjaka (1).

Stadelman s sodelavci (1) je leta 1954 v raziskavi primerjal jajca, shranjena od 10 do 27°C (s povprečno temperaturo 16°C) in jajca, shranjena od 8 do 13°C (s povprečno temperaturo 10°C). Na začetku poskusa so imela vsa jajca 80 Haughovih enot. Šestnajst dni pozneje so jajcem, ki so bila shranjena pri 16°C, izmerili v povprečju 49, jajcem shranjenim pri 10°C pa 69 Haughovih enot. Splošno navodilo je torej shranjevanje svežih jajc pri temperaturi do 10°C (1).

Za ohranjanje kakovosti nekateri proizvajalci uporabljajo oljno obdelavo lupine, pri kateri z oljem zamašijo pore v jajčni lupini (1,2). Pri procesu uporabljajo visoko rafiniran tekoči parafin nizke viskoznosti, brez vonja in okusa. S tem ne zmanjšajo samo izgubo vode, temveč tudi izgubo ogljikovega dioksida iz jajca. Posledično pH beljaka narašča počasneje. Manjši dvig pH-ja beljaka pa upočasni proces tanjšanja debele plasti beljaka in razgradnjo rumenjakove membrane. Heath (1) je leta 1977 ugotovil, da je pH beljaka naoljenih jajc v enem tednu shranjevanja pri 22°C ostal konstanten in sicer 8,3, pri shranjevanju pri 7°C pa se je pH beljaka v sedmih dneh znižal iz 8,3 na 8,1. Vendar morajo biti jajca naoljena še isti dan, in sicer eno uro po znesenju, saj je takrat vsebnost ogljikovega dioksida največja (1).

1.2 MAŠČOBNE KISLINE

Značilna komponenta mnogih lipidov so maščobne kisline, ki so sestavljene iz ogljikovodikove verige z metilno skupino na enem koncu in karboksilno skupino na drugem koncu (10,11). Metilni konec molekule imenujemo omega konec, karboksilna skupina pa je na delta koncu. Dolžina ogljikove verige in število ter mesto dvojnih vezi določajo lastnosti različnih MK (12).

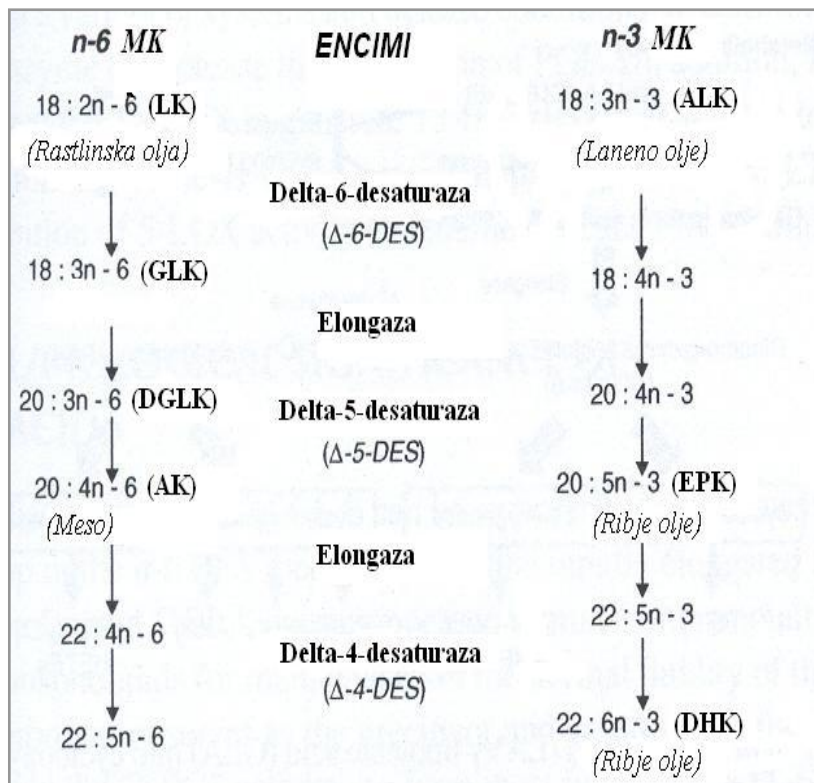


Slika 2: Strukturne formule nekaterih nasičenih, enkrat in večkrat nenasičenih maščobnih kislin, ki so prisotne tudi v jajcih (13)

Na podlagi kemijske strukture razdelimo maščobne kisline na nasičene, enkrat nenasičene (ena dvojna vez) in večkrat nenasičene (dve ali več dvojnih vezi) (slika 2) (12,13). Maščobne kisline v celicah niso v prosti obliki, ampak so vedno vezane na glicerol v obliki estrov (10).

Večkrat nenasičene (polinenasičene) maščobne kisline (VNMK) razdelimo na dve podskupini: n-3 in n-6 VNMK (slika 3). α -Linolenska kislina (18:3n-3) in linolna kislina (18:2n-6) sta pravi esencialni MK, ki ju naše telo ne zmore sintetizirati in ju je treba zaužiti

s hrano; med esencialne MK pa pogojno uvrščamo tudi njune derivate. α -Linolenska kislina (18:3n-3) je izhodna spojina za nastanek n-3 podskupine VNMK, v katero uvrščamo eikozapentaenojsko (EPK) in dokozaheksaenojsko kislino (DHK). Linolna kislina (18:2n-6) se v telesu pretvori v VNMK podskupine n-6, kot so γ -linolenska (18:3n-6) in arahidonska kislina (20:4n-6) (14).



Slika 3: Metabolizem esencialnih maščobnih kislin (15):

MK-maščobne kisline, LK-linolna kislina, GLK-gama-linolenska kislina, DGLK-dihomo-gama-linolenska kislina, AK-arahidonska kislina, ALK-alfa-linolenska kislina, EPK-eikozapentaenojska kislina, DHK- dokozaheksaenojska kislina

1.2.1 Pomen maščobnih kislin za organizem

Čeprav so lipidi za življenje in zdravje pomembni in nepogrešljivi, se o njih v javnosti največkrat govori kot o zdravju škodljivih sestavinah hrane. Vpliv lipidov na zdravje je odvisen od njihovega izvora oziroma sestave. Lipidi neustrezne sestave in zaužiti v

prevelikem deležu vsakdanje prehrane, so pomemben prehranski dejavnik tveganja za razvoj bolezni srca in ožilja ter drugih bolezni zahodne civilizacije. Kadar v prehrani lipidov primanjkuje, pa človek težko pokrije svoje potrebe po energiji (13,16).

Vloga nasičenih MK

Najmanj zaželeni so nasičene maščobne kisline, saj zvišujejo raven holesterola v krvi (so aterogene). Med njimi izstopa miristinska kislina (14:0), ki je najbolj aterogena (13). Po drugi strani pa nasičena stearinska kislina ne povzroči zvišanja holesterola v krvi, pospešuje pa strjevanje krvi preko aktivacije faktorja VII (trombogena) (13,17).

Vloga enkrat nenasičenih MK

Enkrat nenasičene maščobne kisline, npr. oleinska in palmitoleinska, sta antiaterogeni in nimata neugodnih vplivov na zdravje. Enkrat nenasičene maščobne kisline znižujejo skupni in LDL holesterol ter zvišujejo HDL holesterol v krvi. Obe kislini sta tudi manj podvrženi peroksidaciji kot večkrat nenasičene maščobne kisline (13).

Vloga večkrat nenasičenih MK

Ko so leta 1923 VNMK odkrili kot pomembna hranila, so jih sprva poimenovali vitamin F, vendar sta leta 1930 Burr in Miller pokazala, da so boljše uvrščene med lipide kot med vitamini. Nenasičene maščobne kisline so pomemben dejavnik fizioloških in patofizioloških procesov v telesu (14). Če zaužijemo veliko večkrat nenasičenih maščobnih kislin, pride v telesu do povečanega nastajanja peroksidov teh kislin oziroma do povečanega nastajanja radikalov. Kljub temu pa so večkrat nenasičene maščobne kisline esencialne, zadovoljiva oskrba z njimi je nujna, tako s tistimi iz družine n-6, kot tudi s tistimi iz družine n-3 (13). Esencialne maščobne kisline imajo v telesu dve poglavitni vlogi. Prva je strukturna, pri kateri ohranjajo integriteto celične membrane, druga pa je funkcionalna, saj so prekurzorji eikozanoidov (15).

Ena izmed funkcij VNMK je torej vzdrževanje celovitosti celičnih membran. Na mestu, kjer je dvojna vez, se ogljikovodikova veriga nenasičenih maščobnih kislin upogne. Zato se take molekule, kadar se združujejo v lipidni dvosloj, ne morejo tako tesno urediti, kot se lahko uredijo iztegnjene verige nasičenih maščobnih kislin. Prisotnost dvojnih vezi v molekuli nenasičenih MK tako omogoča večjo fluidnost oziroma prožnost membran

(11,14). Ustrezno razmerje med nasičenimi in nenasičenimi MK v fosfolipidnem dvosloju celičnih membran določa fizikalne značilnosti teh struktur, kar je pomembno za normalen potek encimskih procesov na membranah celic, predvsem na membranah nevronov (14).

Druga pglavitna funkcija esencialnih maščobnih kislin je njihova pretvorba v eikozanoide (prostaglandine, levkotriene, tromboksane) (14). Prostanoidi in levkotrieni nastajajo iz dihomo- γ -linolenske kisline (DGLK, 20:3n-6), arahidonske kisline (AK, 20:4n-6) in eikozapentaenojske kisline (EPK, 20:5n-3) preko ciklooksigenazne in lipooksigenazne poti (18). Koncentracije različnih eikozanoidov morajo biti med seboj uravnotežene. Ker nastajajo po delovanju istih encimov, imajo pa različno biološko vlogo, je medsebojna uravnoteženost njihove sinteze odvisna od ravnotežja v oskrbi organizma z n-6 in n-3 maščobnimi kislinami. To pomeni, da je mogoče s količino in razmerjem n-6 in n-3 vplivati na razmerje eikozanoidov, oziroma na fiziološke procese, ki jih regulirajo.

Eikozanoidi, ki nastanejo iz arahidonske kisline (n-6) močno pospešijo zlepljenje trombocitov in s tem koagulacijo krvi, povečujejo krvni tlak s stimulacijo krčenja gladkih mišičnih vlaken v stenah žil, močno stimulirajo imunski odziv organizma in vnetne procese (13).

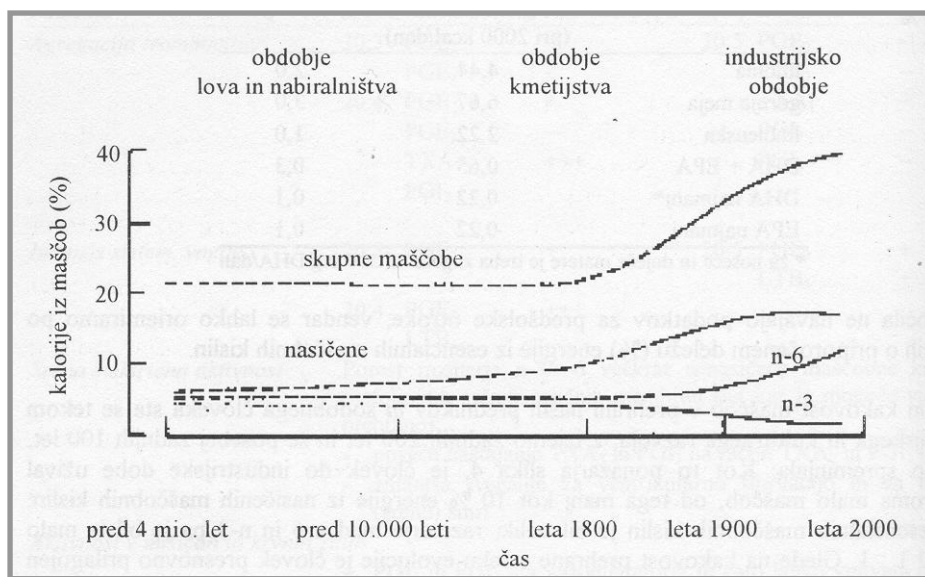
Eikozanoidi iz n-3 maščobnih kislin imajo na iste procese veliko manjši učinek (13). Tako je na primer tromboksan A₃, ki nastane iz EPK, manj nevaren kot tromboksan A₂ (močan vazokonstriktor in agregator trombocitov), ki nastane iz arahidonske kisline. Iz tega je razvidno, da z EPK bogata hrana zmanjša možnost tromboze (18).

Vloga trans MK (TMK)

Maščobne kisline, ki jih najdemo v naravi, imajo večinoma *cis* konfiguracijo dvojnih vezi. Tekom procesov predelave hrane (hidrogeniranje, cvrenje in toplotna obdelava živil) lahko nastajajo *trans* maščobne kisline, ki imajo potencial za tesno zvijanje verige ogljikovih atomov, kar ima za posledico zmanjšanje mobilnosti celičnih membran (16). Dokazana je tudi močna povezava med uživanjem TMK in povečanjem tveganja za nastanek srčno žilnih bolezni, saj so ugotovili, da pri uživanju hrane zamenjava TMK z naravno obliko *cis* maščobnimi kislinami močno (za več kot 50 %) zmanjša tveganje za nastanek srčno žilnih bolezni (16). TMK vplivajo na koncentracije serumskih lipoproteinov na podoben način kot nasičene maščobne kisline. Povečajo koncentracijo LDL holesterola in hkrati zmanjšajo koncentracijo HDL holesterola (19).

Razmerje n-6/n-3 MK

Do industrijske dobe (približno do leta 1800) je človek užival razmeroma malo lipidov, delež esencialnih maščobnih kislin je bil velik, poleg tega pa je bilo razmerje med n-6 in n-3 le malo širše od 1:1. V industrijskem obdobju pa so se povečali tako delež lipidov v prehrani, kot tudi delež nasičenih in n-6 maščobnih kislin, zmanjšal pa se je delež n-3 maščobnih kislin (slika 4) (13). Priporočeno razmerje med n-3 in n-6 VNМК je od 1:5 do 1:10, razmerje v povprečni prehrani Evropejcev pa je precej širše, tudi do 20–25 v korist n-6 VNМК (14,20).



Slika 4: Delež različnih skupin maščobnih kislin in predpostavljene spremembe zaradi industrijske predelave hrane (13)

V človeškem organizmu je pomembno ohranjanje ravnotežja med n-3 in n-6 kislinami (7). Do pomanjkanja n-6 VNМК praktično ne pride, saj je linolna kislina, ki je prekursor n-6, bistveno bolj zastopana v običajni prehrani kot n-3 VNМК. Poleg tega, obe esencialni MK, linolna in α -linolenska, tekmujeta v telesu za enake encimske sisteme. To pomeni, da linolna kislina, ki jo je v prehrani več, bolje izrabi skupne encimske procese kot nujno potrebna α -linolenska kislina (14).

EPK, ki lahko nastane iz α -linolenske kisline (ALK), je biološko bolj učinkovita kot sama α -linolenska kislina. Velike količine linolne kisline zmanjšajo pretvorbo ALK v EPK, zato je optimalno razmerje linolne in α -linolenske kisline za podaljšanje 11 g α -linolenske kisline v 1 g eikozapentaenojske kisline (EPK) 4:1 ali manj. To je pomembno predvsem pri

vegetarijancih, pri katerih edini vnos omega-3 maščobnih kislin predstavlja α -linolenska kislina (20).

Vnos esencialnih MK

Pravilna oskrba organizma z zadostno količino in s pravilnim razmerjem esencialnih n-6 in n-3 maščobnih kislin, je pomembna v teku celega življenja, najbolj pomembna pa je v teku razvoja pred rojstvom, po rojstvu in v zgodnjem otroštvu, ko se možgani, živčevje in psihomotorične sposobnosti otrok intenzivno razvijajo (13).

Med **nosečnostjo in dojenjem** je priporočljivo dnevno uživanje od 100 do 200 mg DHK. S tem bi se kompenzirala materina izguba DHK, saj se ta akumulira v telesni maščobi zarodka (21). Predvsem v zadnjem trimesečju nosečnosti in v prvih letih otrokovega življenja potekata intenzivna izgradnja in razvoj možganskega tkiva, ki vsebuje približno 60 % lipidov, in razvoj očesne mrežnice, zato so v tem obdobju močno povečane potrebe po VNMK, predvsem DHK (14). Zato naj bi **otroci, stari od 6 do 24 mesecev**, dnevno zaužili 100 mg DHK. Priporočljiva količina zaužitih EPK in DHK za **otroke, stare od 2 do 18 let**, je enaka kot za **odraslo populacijo**, in sicer 1 do 2 obroka mastnih rib na teden ali 250 mg EPK plus DHK na dan (21).

Viri esencialnih MK

Bogat živalski vir so mastne globokomorske ribe mrzlih severnih morij (losos, skuša, sardela, tuna). Med rastlinskimi viri najbolj izstopa laneno seme in njegovo olje, saj je razmerje med n-3 in n-6 VNMK v lanenem olju 3,5:1 v korist n-3 MK. Izmed omega-3 maščobnih kislin laneno seme vsebuje le α -linolensko kislino. Edini vir DHK in EPK so morski organizmi, ki pa jih sami ne morejo sintetizirati, pač pa jih dobijo z uživanjem svoje primarne hrane, planktona (14,15). Za boljšo oskrbo otrok in odraslih z n-3 maščobnimi kislinami, so na trgu dostopna tudi omega-3 obogatena jajca, ki lahko uspešno in okusno nadomeščajo morske ribe (7,13).

1.2.2 Omega-3 obogatena jajca

Visoka vsebnost holesterola v jajcih (213 mg/jajce) je predstavljala velik problem za perutninarstvo. Številni neuspešni poskusi zniževanja holesterola v jajcih so vodili v drugo smer, in sicer v obogatitev jajc z esencialnimi maščobnimi kislinami (4). V jajčnem

rumenjaku so predvsem tiste n-3 in n-6 maščobne kisline, ki jih žival zaužije s krmo. Že dolgo je znano, da lahko s spreminjanjem krmnih obrokov kokoši vplivamo na sestavo in količino maščobnih kislin v rumenjaku (6,5).

Pri izbiri omega-3 obogatenih jajc ni ključnega pomena le količina omega-3 maščobnih kislin, ki naj bi jih jajca vsebovala, temveč tudi njihova kombinacija. Obogatena jajca namreč lahko vsebujejo tri vrste omega-3 maščobnih kislin. Prva je α -linolenska kislina, ki jo lahko najdemo v nekaterih rastlinskih oljih in jo organizem ne more uporabiti, dokler se v telesu ne pretvori v aktivno obliko, eikozapentaenojsko (EPK) ali dokozaheksaenojsko kislino (DHK). Ta pretvorba poteka počasi pri zdravih ljudeh, medtem ko se pri otrocih in starejših ljudeh sploh ne izvrši. Zato je pomembno, da med n-3 maščobnimi kislinami v obogatenih jajcih prevladujejo predvsem eikozapentaenojska in dokozaheksaenojska kislina (EPK in DHK) (7).

Krma kokoši

Eden izmed načinov, kako obogatiti jajca z omega-3 maščobnimi kislinami, je dodatek 10 % **lanenega semena** (~2 % α -linolenske kisline) v krmo kokoši. Kokoši imajo nenavadno sposobnost, da hitro transformirajo zaužito α -linolensko kislino v veliko količino DHK in v manjšo količino EPK. Tudi dodatek **olja in semen oljne repice** v krmo kokoši povzroči povečanje količine n-3 maščobnih kislin, vendar v manjši količini (8). Tudi z vključitvijo **ekstraktov iz rib severnih morij in alg** v krmo kokoši obogatimo jajca z omega-3 maščobnimi kislinami (6). Vendar v prevelikih količinah dobijo jajca okus po ribah (8).

Če krmi dodajamo ribje olje, se bodo omega-3 maščobne kisline (20:5, 22:6) iz ribjega olja pojavile v jajčnih lipidih, vendar ne v takšni količini kot so zastopane v krmi (2). Vpliv dodatka ribjega olja h krmi kokoši je proučeval tudi Marshall s sodelavci leta 1994 (9). Ugotovili so, da ribje olje spremeni sestavo maščobnih kislin v rumenjaku, saj se je vsebnost linolenske kisline povečala dvakrat, narasle pa so tudi vrednosti eikozapentaenojske kisline (EPK, 20:5n-3) in dokozaheksaenojske kisline (DHK, 22:6n-3). Vrednost slednje se je šestkrat povečala. Medtem, ko so se vrednosti n-3 maščobnih kislin povečale, se je z dodatkom ribjega olja znižala vsebnost arahidonske kisline (20:4n-6). Zasledili so tudi pomembno znižanje vrednosti nasičenih maščobnih kislin v rumenjaku, npr. palmitinske (16:0) in stearinske kisline (18:0) (9).

1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS)

Plinska kromatografija (GC) se že pol stoletja uporablja kot metoda izbora za analizo maščobnih kislin (22). GC-MS je kombinacija dveh analiznih tehnik, ki skupaj tvorijo eno metodo za analizo mešanice različnih hlapnih spojin. Plinska kromatografija loči komponente mešanice, medtem ko masna spektroskopija posebej vsako komponento identificira (23). Masni spektrometer molekule ionizira, povzroči njihov razpad na fragmente in slednje nato detektira na podlagi razmerja mase z nabojem (m/z). Na osnovi specifične fragmentacije sklepamo na posamezne fragmente molekule, iz tega pa na njeno strukturo (24). Analitik lahko s kombinacijo teh dveh tehnik kvalitativno, z uporabo referenčnih spojin pa še kvantitativno vrednoti posamezne spojine v zmesi (23).



Slika 5: GC-MS na Katedri za farmacevtsko biologijo (FFA)

Plinska kromatografija je primerna za ločbo in kvantitativno vrednotenje spojin, ki imajo ustrezen parni tlak (hlapnost) in so termično stabilne do 300–350°C (23). Stacionarna faza je običajno nehlapna organska tekočina, s katero je prevlečen nosilec (polnjena kolona) ali notranja stena kapilarne kolone. Mobilna faza je inerten plin, najpogosteje helij, pa tudi argon, dušik in vodik. V primerjavi z ostalimi kromatografskimi tehnikami, pri plinski

kromatografiji mobilna faza (plin) služi samo za transport analita skozi kolono in ne interagira s preiskovanim analitom (26).

Potek GC-MS analize

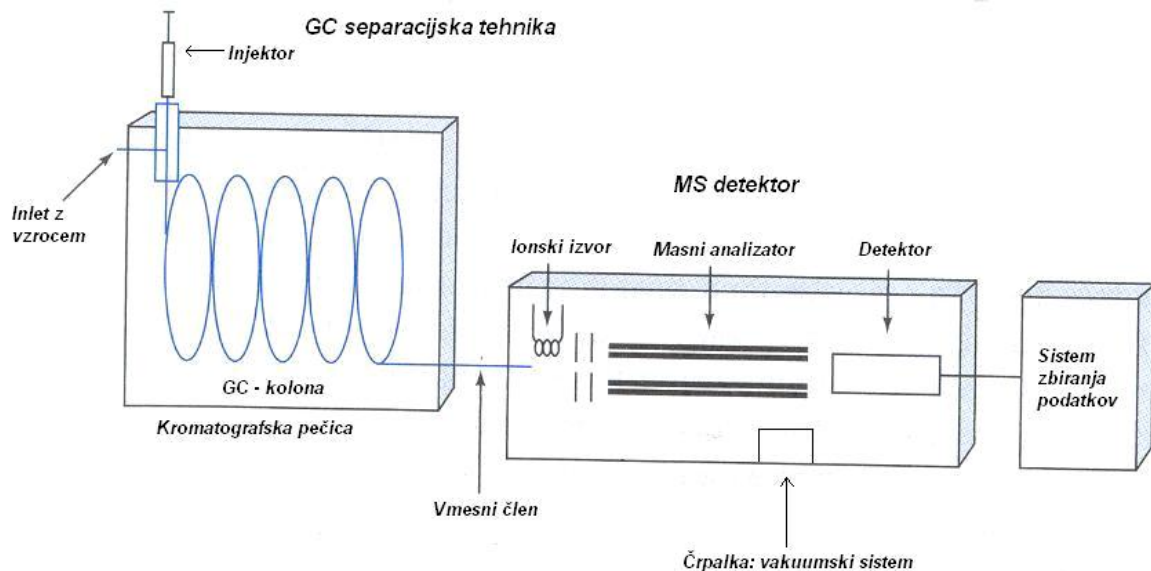
Kot pri vseh kromatografskih tehnikah, se tudi pri plinski ločba začne, ko vzorec **injiciramo** v mobilno fazo (23). Komponente vzorca v mobilni fazi interagirajo s stacionarno fazo z različno hitrostjo. Tiste, ki interagirajo hitreje ali krajši čas, bodo prve zapustile kolono. Tiste, ki interagirajo počasneje ali daljši čas, bodo zapustile kolono zadnje. Kolona je speljana v pečici, ki jo lahko nastavimo na postopno dvigovanje temperature. To nam pomaga pri ločevanju komponent vzorca, saj se z naraščanjem temperature komponente z nizkimi temperaturami vrelišča (visoko hlapne) eluirajo prej kot težko hlapne komponente vzorca (26).

Za detekcijo posameznih komponent vzorca uporabljamo različne detektorje. V našem primeru je plinski kromatograf povezan s **masnim spektrometrom** (slika 6). Tak sistem ne samo, da zaznava spojine, ki prihajajo iz kolone, ampak jih tudi identificira. Ločene komponente se torej eluirajo iz kolone in potujejo v vakuumsko komoro, kjer se molekule ionizirajo. Najbolj uporabljena ionska izvora v GC-MS sta ionizacija z zajetjem elektronov (EI) in kemijska ionizacija (CI) (25).

Pri našem delu smo uporabljali EI, kjer ionizacija poteka s pomočjo elektronov, ki jih emitira volframova nitka. Ko elektron zadane molekulo vzorca, izbije elektron in pri tem pride do nastanka molekulskih in fragmentnih ionov. Nastane molekularni ion z dodatno energijo, katera povzroči nastanek fragmentov oz. cepitev molekule. Ionizacijo izvajamo z energijo elektronov 70 eV. Nižja energija ionizacije bi privedla do neučinkovite ionizacije, medtem ko bi bila pri višji energiji fragmentacija molekulskega iona prevelika, kar bi vplivalo na kakovost informacij v spektru (25).

Nastale ionizirane fragmente z različnimi razmerji mase z nabojem (m/z) vodimo v analizator, katerih je več vrst (kvadropolni analizator, elektrostatsko-magnetni analizator). Najpogosteje uporabljamo **kvadropolni masni analizator**, sestavljen iz štirih cilindričnih palic, ki služijo kot elektrode. Spreminjajoče se elektromagnetno polje na podlagi razmerja m/z selektivno usmerja ionizirane fragmente na elektronsko pomnoževalko, ki zazna posamezne ione in sorazmerno glede na število zaznanih ionov beleži velikost signala.

Ojačan signal pošlje na **računalnik**. Rezultat tega je kromatogram celokupnega ionskega toka (angl. *Total ion current*, TIC), ki je sestavljen iz abscisne osi, na kateri odčitamo retencijski čas, ter ordinate, ki nam kaže vsoto intenzitete ionskih tokov pri vseh m/z . Računalniški program lahko na TIC kromatogramu pri poljubno izbranem retencijskem času (RT) konstruira masni spekter (24).



Slika 6: Shema plinskega kromatografa povezanega z masnim detektorjem (26)

Masni spekter prikazuje intenziteto ionskih tokov kot funkcijo razmerja m/z in je za določeno spojino vedno enak. Identifikacijo posamezne molekule ugotovimo s primerjavo masnega spektra analizirane komponente z masnim spektrom čiste komponente, shranjene v knjižnici masnih spektrov, in v naslednjem koraku potrdimo s primerjanjem rezultatov, dobljenih z analizo referenčnih spojin (23).

2 NAMEN DELA

Kokošja jajca zavzemajo pomembno vlogo v prehrani, saj vsebujejo esencialna hranila – lipide, beljakovine in vitamine. Pomemben gradnik večine lipidov so maščobne kisline. Med neugodne lastnosti jajc prištevamo vsebnost skupnega holesterola in drugih lipidov s približno 30 % nasičenih maščobnih kislin.

V diplomskem delu bomo z uporabo plinske kromatografije najprej proučevali vsebnost maščobnih kislin v kokošjih jajcih iz različnih virov ter vpliv časa in temperature shranjevanja jajc na vsebnost maščobnih kislin. Nato bomo raziskali tudi vpliv hranjenja kokoši s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo na sestavo in vsebnost maščobnih kislin. V zadnji raziskavi pa bomo preverili sestavo in vsebnost maščobnih kislin v omega-3 obogatenih in svežih domačih jajcih. Zanimala nas bo predvsem sestava nenasičenih maščobnih kislin, ki so pomemben dejavnik fizioloških in patofizioloških procesov v telesu, njihova vsebnost v jajcih pa se lahko zaradi kemijske reaktivnosti s časom spreminja.

Najprej bomo poskušali ugotoviti sestavo in vsebnost maščobnih kislin v eni seriji jajc s farmakopejsko metodo A, ki jo bomo modificirali. Pri tej metodi bo ekstrakciji lipidov sledila pretvorba maščobnih kislin v pripadajoče metilne estre s brezvodnim metanolom v alkalnem mediju.

Ne glede na ustreznost klasične metode bomo za vsa ostala jajca uporabili metodo derivatizacije maščobnih kislin, brez predhodne ekstrakcije lipidov. »*In situ*« preestrenje maščobnih kislin bomo izvedli s segrevanjem jajčne vsebine pri 90°C po dodatku 0,5 M NaOH v metanolu in z nadaljnjim segrevanjem pri 90°C po dodatku 14 % BF₃ v metanolu. Po uspešni tvorbi metilnih estrov maščobnih kislin bo pri obeh metodah sledila ekstrakcija estrov v organsko topilo. Organske faze bomo nato aplicirali na GC-MS.

Naš cilj bo torej s pomočjo plinske kromatografije ugotoviti sestavo in vsebnost maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov, pa tudi primerjava dveh metod priprave vzorcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

V prvi raziskavi smo uporabili kokošja jajca, kupljena v dveh različnih farmah (farma Budin Bilje, farma Colja Bilje) in Mercatorju[®], ter domača kokošja jajca. Nadaljevali smo z raziskavo jajc kokoši, ki so se hranile s piro, navadno ajdo oz. tatarsko ajdo. Zadnja raziskava pa je vključevala omega-3 obogatena in sveža domača jajca.

3.1.1.1 Vzorci kupljenih jajc iz dveh farm in Mercatorja ter domačih jajc

Jajca smo označili in jih starali pri različnih temperaturah. Jajca, ki so bila shranjena v hladilniku in pri sobni temperaturi, so bila starana v jajčni lupini, medtem, ko smo jajca pred postavitvijo v zamrzovalnik, razbili, zmešali in vlili v plastično epruveto volumna 50 ml.

Preglednica 4: Oznake vzorcev jajc iz različnih virov in starih pri različnih temperaturah

Prostor shranjevanja / temperatura	Farma Budin Bilje	Farma Colja Bilje	Mercator [®] jajca	Jajca iz domače reje
Zamrzovalnik (T = -20°C)	B1, <u>B2</u>, B3	C1, <u>C2</u>, C3	M1, <u>M2</u>, M3	D1, <u>D2</u>, D3
Hladilnik (T = 5 °C)	<u>B4</u>, B5, B6	C4, <u>C5</u>, C6	M4, <u>M5</u>, M6	D4, D5, <u>D6</u>
Omarica v laboratoriju (T = 25°C)	B7, <u>B8</u>, B9	C7, <u>C8</u>, C9	M7, <u>M8</u>, M9	D7, D8, <u>D9</u>

Jajca, shranjena v hladilniku in v omarici, smo starali tri tedne (21 dni), nato pa smo jih stehali in razbili na trdo površino ter jim s kljunastim merilom izmerili višino beljaka 1 cm od rumenjaka. Vsa razbita jajca smo nato zmešali in prelili v 50 ml plastične epruvete ter

jih postavili v zamrzovalnik do nadaljnjih raziskav. Oznake jajc v okrepljenem tisku (preglednica 4) označujejo jajca 1. serije, v podčrtane oznake spadajo vzorci 2. serije, oznake v navadni pisavi pa označujejo 3. serijo jajc.

3.1.1.2 Vzorci jajc kokoši, ki so jih hranili s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo (vzorci rumenjakov smo prejeli iz Biotehniške fakultete v Ljubljani)

Preglednica 5: Oznake vzorcev rumenjakov kokoši, krmljenih s piro, navadno oz. s tatarsko ajdo

	Pira	Navadna ajda	Tatarska ajda
Starana jajca	P5, P6, P7, P8	N3, N4	T3, T4
Nestarana jajca	P1, P2, P3, P4	N1, N2	T1, T2

V raziskavi, ki so jo spomladi 2011 izvedli na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, so kokoši sprva krmili z otrobi pire (10 dni). Po piri je sledila krma z otrobi navadne ajde (15 dni). Nato so kokoši 15 dni krmili z otrobi tatarske ajde, kateri je ponovno sledila krma z otrobi pire (15 dni). Dvakratno krmljenje s piro so uvedli zato, ker so želeli ugotoviti, če temperatura okolja vpliva na sestavo in svežost jajc, saj je marca bilo vreme hladnejše, kakor meseca aprila, ko je bilo vreme že toplejše. Jajca so pobirali na 5 dni. Pet od enajstih pobranih jajc so še isti dan razbili, ločeno beljak in rumenjak vložili v Eppendorf epruvete (1,5 ml) ter spravili v zamrzovalnik (-20°C). Ta jajca smo uvrstili pod kategorijo nestarana jajca. Ostalih šest jajc pa so shranili v klet na stalno temperaturo (10 °C). Ko so vsa jajca dosegla starost 88 dni, so starana jajca vložili v Eppendorf epruvete ter spravili v zamrzovalnik skupaj z nestaranami jajci. Vsa jajca so morala ob razbitju doseči starost 88 dni zato, da so lahko primerjali enako stara jajca glede na različno krmo med seboj. Vzorce so shranjevali v Eppendorf epruvete z namenom, da bi jih v prihodnje uporabili še v kakšnem poskusu (27). Tako so prispele tudi na našo katedro, kjer smo rumenjake odmrznili in ugotavljali vpliv krme kokoši na sestavo in vsebnost maščobnih kislin.

3.1.1.3 Vzorci kupljenih jajc, obogatenih z omega-3 maščobnimi kislinami, in svežih domačih jajc

Preglednica 6: Oznake vzorcev omega-3 obogatenih in domačih jajc

Omega-3 obogatena jajca		Sveža domača jajca	
1. jajce	2. jajce	1. jajce	2. jajce
O1	O3	J1	J3

Za analizo omega-3 obogatenih jajc smo izbrali dve jajci. Prav tako smo analizirali dve sveži domači jajci (preglednica 6).

3.1.2 Reagenti

Topila

- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- pentan, p.a. (Carlo Erba, Milano, Italija)
- heptan, p.a. (Carlo Erba, Milano, Italija)
- heksan, p.a. (Fluka, Buchs, Švica)

Reagenti za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin

- metanol, p.a. (Panreac, Barcelona, Španija)
- kalijev hidroksid, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- natrijev klorid, p.a. (Scharlau, Barcelona, Španija)
- natrijev hidroksid, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 14 % borov trifluorid v metanolu, pro synthesis (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- diklorometan, p.a. (Panreac, Španija)
- dušik (Messer, Ljubljana, Slovenija)

Standard

- F.A.M.E. Mix C4-C24 (Supelco, Bellefonte, PA, ZDA)

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

Ekstrakcija

Avtomatske pipete Proline 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Biohit, Helsinki, Finska)

Plastične epruvete, 50 ml, TPP (TPP, Trasadingen, Švica)

Centrifugiranje

Centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Rotavapiranje

Rotavapor R-215 (Büchi, Flawil, Švica)

Tehtanje

Analizna tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija)

Analizna tehtnica PC 2000 (Mettler, Zürich, Švica)

Raztapljanje

Ultrazvočna kadička SONIS 2GT (Iskra PIO, d. o. o., Šentjernej, Slovenija)

Ekstrakcija

Plastične epruvete, 14 ml (TPP, Trasadingen, Švica)

Vodna kopel 1013 Water bath (GFL, Burgwedel, Nemčija)

Plinska kromatografija z masnim detektorjem (GC-MS)

Sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)

Kolona:

- kapilarna kolona Rtx-1 F&F, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm dimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, PA, ZDA)
- kapilarna kolona Rxi-5 Sil MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm 5 % difenil/95 % dimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, PA, ZDA)

Računalniški program GCMS Solution 2.3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)

3.2 METODE

3.2.1 Izračun Haughovih enot

Iz izmerjenih rezultatov mase jajca in višine beljaka 1 cm od rumenjaka, smo za jajca, ki so smo jih starali pri sobni temperaturi in v hladilniku, lahko izračunali število Haughovih enot. Korelacija med višino gostega beljaka (V) in težo jajca (M) je definirana s matematično enačbo:

$$H. E. = 100 \log (V + 7,57 - 1,7 M^{0.37})$$

Večja, kot je vrednost H.E., boljša je kakovost beljaka (6).

3.2.2 Ugotavljanje sestave maščobnih kislin jajc z modificirano farmakopejsko metodo A

3.2.2.1 Priprava pentanskega ekstrakta

Jajce smo premešali in razdelili na dva enaka dela (po 20 ml) v dve 50 ml plastični epruveti. Dolili smo 20 ml pentana (razmerje 1:1) in močno stresali 5 min. Vsebino smo nato centrifugirali 10 min pri 4000 RPM. Supernatanta iz obeh epruvet smo odpipetirali in združili v 100 ml bučko. Ostanek smo zavrgli. Vzorce M1, B1, C1, D1, M7, B7, C7, D8, M4, B5, C4 in D5 smo ekstrahirali na ta način.

3.2.2.2 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin s modificirano farmakopejsko metodo A

Na rotavaporju smo sprva pentan odparevali v 100 ml bučki, dokler ga je ostalo približno 20 ml. Nato smo preostalo vsebino prelili v stehtano 25 ml bučko, v kateri smo pentan odparili do suhega (temperatura vodne kopeli je znašala 40 °C). Za analizo sestave maščobnih kislin jajc smo uporabili farmakopejsko metodo A, ki smo jo modificirali (28). Farmakopejska metoda predpisuje količino reagentov za 1 g olja. Glede na dobljeno maso suhega ostanka smo izračunali potrebno količino reagentov za tvorbo metilnih estrov. V 25

ml bučko z lipidnim ostankom smo dodali preračunano količino brezvodnega metanola in maščobne kisline raztopili s pomočjo UV–kadičke. Vsebino smo prenesli v vialo za GC-MS in dodali potrebno količino 60 g/l raztopine kalijevega hidroksida v metanolu ter vialo prenesli na ultrazvok za 15 min pri 60 °C. Nato smo v vialo dodali preračunano farmakopejsko vrednost heptana za vzorec D1, za vse ostale vzorce pa smo uporabili dvakratno preračunano količino heptana. Po močnem petminutnem stresanju smo vsebini dodali preračunano količino 200 g/l raztopine natrijevega klorida in ponovno pet minut močno stresali. Ko sta se fazi ločili, smo organsko fazo (zgornjo) odpipetirali v novo vialo in aplicirali v GC-MS.

Preglednica 7: Preračunane vrednosti reagentov na maso suhega ostanka

Vzorec (jajce)	količina pentana oz. jajca (ml)	masa suhega ostanka (mg)	količina brezvodnega metanola (μL)	količina KOH v metanolu (μL)	količina heptana (μL)	količina raztopine NaCl (μL)	Posebnosti pri postopku
D1	40	35	350	7	175	350	Preračunana farmakopejska količina heptana, ostalo je 10 ml jajca.
D4	40	57	570	11,4	570 (2 X 285)	570	Preračunana dvakratna farmakopejska količina heptana, vzorec se nam je izgubil na ultrazvoku.
D5	40	31	310	6,2	310 (2 X 155)	310	Ostalo je 10 ml jajca.
D7	40	/	/	/	/	/	Napačno stehtana bučka, vzorcu nismo mogli ugotoviti mase po rotavapiranju.

D8	30	64	640	12,8	640 (2 X 320)	640	Majhna količina jajca, zato smo uporabili le 30 ml, ostalo je 7,5 ml jajca.
B1	40	74	740	14,8	740 (2 X 370)	740	Ostalo je 9 ml jajca.
B5	40	71	710	14,2	710 (2 X 355)	710	Ostalo je 7,5 ml jajca.
B7	40	61	610	12,2	610 (2 X 305)	610	Ostalo je 8 ml jajca.
M1	40	66	660	13,2	660 (2 X 330)	660	Ostalo je 13 ml jajca.
M4	40	69	690	13,8	690 (2 X 345)	690	Ostalo je 10 ml jajca.
M7	40	67	670	13,4	670 (2 X 335)	670	Ostalo je 10 ml jajca.
C1	40	35	350	7	350 (2 X 175)	350	Ostalo je 6 ml jajca.
C4	40	32	320	6,4	320 (2 X 160)	320	Ostalo je 7,5 ml jajca.
C7	40	20	200	4	200 (2 X 100)	200	Za ekstrakcijo s pentanom smo porabili celo jajce.

3.2.2.3 Plinska kromatografija z masno spektroskopijo

Kromatografske razmere:

- kapilarna polidimetilsiloksanska kolona, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm debela stacionarna faza (v farmakopeji je stacionarna faza makrogolna)
- nosilni plin: helij s pretokom 1 ml/min (v farmakopeji je pretok večji, 1,3 ml/min)
- način injiciranja: split (1 : 100)
- temperaturni program: začetna temperatura kolone smo nastavili na 160°C, potem je temperatura naraščala 5°C/min in dosegla 300°C
- temperatura injektorja: 250°C
- temperatura ionskega izvora: 200°C
- temperatura vmesnika: 300°C

- volumen injiciranja: 1 µL
- napetost na detektorju: 1 kV
- celokupen čas analize: 28 minut

Meja detekcije in kvantifikacije

Mejo detekcije in kvantifikacije smo izračunali iz koncentracije, površine in signala S/N za γ-linolensko kislino v vzorcu C1:

c(A) koncentracija γ-linolenske kisline v vzorcu C1 (60,863 mg/ml)

p(A) površina pod signalom γ-linolenske kisline v vzorcu C1 (1675021)

S/N razmerje signal s šumom (1,01)

$$\begin{aligned}\text{Mejna koncentracija za detekcijo: } c(A) \cdot 3 \cdot (S/N) / p(A) &= \\ &= 60,863 \cdot 3 \cdot 1,01 / 1675021 = \\ &= 0,00011 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Mejna koncentracija za kvantifikacijo: } c(A) \cdot 10 \cdot (S/N) / p(A) &= \\ &= 60,863 \cdot 10 \cdot 1,01 / 1675021 = \\ &= 0,000367 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

3.2.2.4 Izračun vsebnosti maščobnih kislin na gram jajca

Analizo vzorcev jajc, pripravljenih s klasično metodo, smo izvedli na polidimetilsiloksanski koloni (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm debela stacionarna faza). Po optimizaciji kromatografskih razmer za drugo uporabljeno metodo priprave metilnih estrov maščobnih kislin pa se je kolona prenasičila in treba jo je bilo zamenjati. Raztopine standardov smo aplicirali samo na novo, difenildimetilsiloksansko kolono (5 % difenil/95 % dimetilpolisiloksan, Restek, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm debela stacionarna faza), na kateri smo potem izvedli tudi vse ostale analize jajc. Podatke iz stare kolone smo potem obdelali tako, da smo vzeli površine estrov maščobnih kislin v jajčnih vzorcih, pridobljene s staro kolono, in površine ter koncentracije estrov maščobnih kislin v raztopini standarda (RS1: 20 mg/ml), pridobljene z novo kolono.

Račun:

$$c_{vz} = c_{st}/p_{st} * p_{vz}$$

c_{vz} koncentracija maščobne kisline v vzorcu (mg/ml)

c_{st} koncentracija maščobne kisline v standardu (mg/ml)

p_{st} površina pod signalom maščobne kisline v standardu

p_{vz} površina pod signalom maščobne kisline v vzorcu

Izračunana koncentracija estrov maščobnih kislin je podana v mg/ml (c_{vz}). Odločili smo se, da bomo rezultate izrazili v mg maščobne kisline/g jajca, zato smo morali dobljene vrednosti preračunati. Ker smo za analizo vzeli le določeno količino jajca (ne celo jajce) (V_a/V_c) in ker smo nastale estre ekstrahirali v različnih volumnih heptana (V_h), smo morali pri izračunu vsebnosti to upoštevati. Z molskimi masami estrov (M_e) in kislin (M_k) smo preračunali estre v pripadajoče kisline. Na koncu pa smo dobljeno vrednost še delili z maso jajca (m_j), pri čemer smo upoštevali, da je jajce sestavljeno iz 11 % lupine.

Račun:

$$\text{mg maščobne kisline/g jajca} = c_{vz} * V_h * V_a/V_c * M_k/M_e / (0,89 * m_j)$$

c_{vz} izračunana koncentracija (mg/ml)

V_h volumen heptana (ml)

V_a analizirani volumen jajca (ml)

V_c volumen celega jajca (ml)

M_k molska masa kisline (g/mol)

M_e molska masa estra (g/mol)

m_j masa jajca z lupino (g)

3.2.3 Ugotavljanje sestave maščobnih kislin jajc z metodo »in situ« preestrenja

3.2.3.1 Tvorba pripadajočih estrov maščobnih kislin »in situ«

Sestavo in vsebnost maščobnih kislin v ostalih dveh serijah jajc, v jajcih, obogatenih z *n*-3 maščobnimi kislinami in v rumenjakih kokoši, ki so se hranile s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo, smo ugotavljali z metodo po Parku in Goinsu (29). Najprej smo natehtali približno 1 g jajčne vsebine v 10 ml čašo, si zapisali točno maso natehtanega vzorca, in dodali 4 ml prečiščene vode ter zmešali. 300 μ L alikvot smo odpipetirali v plastično epruveto volumna 14 ml, dodali 200 μ L diklorometana in 2 ml 0,5 M NaOH v metanolu. Vsebino smo eno minuto preprihovali s dušikom, epruveto zamašili in segrevali na vodni kopeli pri 90°C. Po desetih minutah smo epruveto vzeli iz kopeli in ohladili na sobno temperaturo. Nato smo dodali 2 ml 14 % BF_3 v metanolu, ponovno minuto preprihovali z dušikom, privili zamašek in segrevali deset minut na vodni kopeli pri 90°C. Epruveto smo vzeli iz vodne kopeli in ohladili na sobno temperaturo. Nato smo vsebini dodali 2 ml destilirane vode in 0,5 ml heksana ter eno minuto močno stresali. Sledilo je desetminutno centrifugiranje pri 3000 RPM (22°C). Po ločitvi plasti smo zgornjo, organsko fazo odpipetirali v označeno vialo ter aplicirali na GC-MS. Ostanek smo zavrgli.

Vsebnost nekaterih estrov maščobnih kislin je bila v vzorcih zelo velika, zato smo morali za kvantifikacijo teh estrov vse vzorce 10-krat redčiti, vzorca B8-10 in D9-10 pa še dodatno 2-krat redčiti. 10-kratno redčitev smo izvedli tako, da smo odpipetirali 30 μ L vzorca v novo vialo in dodali 270 μ L heksana. Iz vzorcev B8-10 in D9-10 smo potem nadaljnje odpipetirali 100 μ L vzorca v novo vialo in dodali 100 μ L heksana ter tako dobili 20-kratno redčitev.

3.2.3.2 Plinska kromatografija z masnim detektorjem

Kromatografske razmere:

- kapilarna polidimetilsiloksanska kolona, 30 m X 0,25 mm, 0,25 μ m debela stacionarna faza

- kapilarna fenildimetilsiloksanska kolona (5 % difenil/95 % dimetilpolisiloksan), 30 m X 0,25 mm, 0,25 µm debela stacionarna faza
- nosilni plin: helij s pretokom 1 ml/min
- način injiciranja: split (1 : 100)
- temperaturni program: začetna temperatura kolone smo nastavili na 160°C, potem je temperatura naraščala 5°C/min in dosegla 300°C ter 10 min ostala konstantna pri 300°C
- temperatura injektorja: 250°C
- temperatura ionskega izvora: 200°C
- temperatura vmesnika: 300°C
- volumen injiciranja: 1 µL
- napetost na detektorju: 1 kV
- celokupen čas analize: 36 min

Meja detekcija in meja kvantifikacije

Mejo detekcije in kvantifikacije smo izračunali iz koncentracije, površine in signala S/N za γ -linolensko kislino v vzorcu J3:

c(A) koncentracija γ -linolenske kisline v vzorcu J3 (0,06799 mg/ml)

p(A) površina pod signalom γ -linolenske kisline v vzorcu C1 (55537)

S/N razmerje signal s šumom (1,01)

$$\begin{aligned} \text{Mejna koncentracija za detekcijo: } c(A) \cdot 3 \cdot (S/N) / p(A) &= \\ &= 0,06799 \cdot 3 \cdot 1,01 / 55537 = \\ &= \boxed{0,0000037 \text{ mg/ml}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Mejna koncentracija za kvantifikacijo: } c(A) \cdot 10 \cdot (S/N) / p(A) &= \\ &= 0,06799 \cdot 10 \cdot 1,01 / 55537 = \\ &= \boxed{0,000012 \text{ mg/ml}} \end{aligned}$$

3.2.3.3 Izračun vsebnosti maščobnih kislin na gram jajca

Koncentracije, ki nam jih je podal računalnik, so bile v enotah mg/ml (c). Ker smo metilne estre ekstrahirali z 0,5 ml heksana in uporabili 300 µl alikvot jajca od začetnega 4000 µl,

smo maso estrov preračunali. Pri tem smo upoštevali molske mase estrov (M_e) in pripadajočih kislin (M_k) ter vrednost delili z začetno natehtano količino jajca (m). Tako smo vse rezultate izrazili kot mg maščobne kisline/g jajca.

Račun:

$$\text{mg maščobne kisline/g jajca} = c \cdot 0,5 \cdot 4000 / 300 \cdot M_k / M_e / m$$

c podana koncentracija (mg/ml)

M_k molska masa kisline (g/mol)

M_e molska masa estra (g/mol)

m masa natehtanega jajca (g)

3.2.4 Priprava standardov

Pripravili smo štiri raztopine standardov s različnimi koncentracijami. V vialo smo na analizni tehcnici natančno natehtali 10 mg standardne mešanice maščobnih kislin (F.A.M.E. Mix C4-C24). Nato smo standard raztopili s dodatkom 500 μL heksana ter dobili prvo raztopino standarda (RS1). Raztopino standarda 2 (RS2) smo pripravili tako, da smo v vialo zatehtali 5 mg standardne mešanice in ji dodali 500 μL heksana. V novo vialo smo zatehtali 2,5 mg standardne mešanice in prav tako dodali 500 μL topila (RS3). Raztopino standarda 4 (RS4) smo pripravili tako, da smo 1,25 mg standarda zatehtali v vialo in dodali 500 μL heksana.

Koncentracije raztopin so naslednje:

RS1: 20 mg/ml,

RS2: 10 mg/ml,

RS3: 5 mg/ml,

RS4: 2,5 mg/ml.

Pripravljene raztopine standardov smo aplicirali na GC-MS pri enakih kromatografskih razmerah kot smo posneli raztopine vzorcev, pripravljenih z »in situ« metodo (točka 3.2.3.2).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 UGOTOVITEV HAUGHОВИH ENOT

Preglednica 8: Izmerjene mase jajc, višine gostega beljaka 1 cm od rumenjaka in Haughove enote

	Vzorec (jajce)	Masa jajca (g)	Višina gostega beljaka 1 cm od rumenjaka (izmerjena, mm)	Haughove enote (H. E.) (izračunane)
HLADILNIK	B4	56,309	9	95,647
	B5	56,357	7	84,781
	B6	64,390	/*	/*
	C4	59,912	8	89,602
	C5	52,747	6	79,426
	C6	56,404	5	70,256
	D4	65,747	7	81,958
	D5	58,082	8	90,086
	D6	55,418	8	90,799
	M4	59,908	5	68,763
	M5	66,425	6	74,586
	M6	66,179	5	66,097
SOBNA TEMPERATURA	B7	61,217	3	44,856
	B8	55,406	3	49,014
	B9	55,100	1	4,4017
	C7	51,257	1	11,543
	C8	52,375	1	9,5511
	C9	52,070	2	35,446
	D7	62,395	/*	/*
	D8	48,315	2	39,134
	D9	48,740	3	53,645
	M7	61,298	1	60,041
	M8	55,937	2	31,487
	M9	55,993	/*	/*

Opomba: /* Jajce se je razlilo.

Višina gostega beljaka med 8 in 10 mm kaže na dobro notranjo kakovost jajca (6). Iz preglednice 8 lahko opazimo, da imajo jajca, ki smo jih starali v hladilniku višjo višino gostega dela beljaka (povprečno 6 mm) kot jajca, ki smo jih starali pri sobni temperaturi (2 mm). Najmanjšo višino beljaka smo izmerili pri Mercator[®] jajcih, tako tistih shranjenih v hladilniku (povprečno 5 mm), kot tudi pri tistih, ki smo jih starali pri sobni temperaturi (povprečno 1 mm). To nakazuje na proces, ki se dogaja med staranjem jajc, in sicer velik delež gostega beljaka preide v redkega. Posledično se beljak bolj razlije in višina gostega beljaka je manjša. Verjetno so ta jajca kar dolgo časa ležala na Mercatorjevi polici (na ovojnini je bil zapisan samo rok uporabe in ne datum, kdaj so bila jajca znesena).

Zanimivo je, da se je en jajčni rumenjak razlil, četudi smo jajce shranjevali v hladilniku (B6). Od vseh jajc, shranjenih v laboratorijski omarici, pa sta se razlila dva rumenjaka. Med staranjem namreč voda prehaja iz beljaka skozi rumenjakovo membrano v rumenjak in prostornina rumenjaka se povečuje, vse dokler membrana ne popusti (6).

Če primerjamo mase jajc posameznih farm, ki so bila shranjena v hladilniku in pri sobni temperaturi, ugotovimo, da so povprečne mase jajc iz posamezne farme, shranjenih pri sobni temperaturi res manjše kot povprečne mase jajc iste farme, shranjenih v hladilniku. V času skladiščenja namreč skozi pore jajčne lupine izhaja vlaga in masa jajca se zmanjšuje. Izhlapenje je tem večje, če so jajca skladiščena pri sobni temperaturi (6). Naše meritve smo izvedli samo na koncu staranja. Mogoče bi bilo boljše, da bi jajca stehali pred začetkom poskusa in potem še na koncu staranja. Tako bi lahko izračunali količino vlage, ki se je izgubila skozi pore jajčne lupine.

Najbolj pogost kvantitativen parameter, ki ga uporabljamo za ugotavljanje svežosti jajc (beljaka), so Haughove enote (30). Iz preglednice 8 lahko razberemo, da imajo vsa jajca, starana v hladilniku, več Haughovih enot kot jajca iste farme, starana pri sobni temperaturi. Če upoštevamo, da število H.E. pod 55 pomeni za uporabnika nesprejemljivo kakovost, nad 90 pa odlično kakovost, lahko zaključimo, da so vsa jajca, shranjena pri sobni temperaturi, za uporabnika nesprejemljiva (gledane povprečne vrednosti Haughovih enot za posamezno farmo) (6). Tudi jajc, shranjenih v hladilniku, povprečno ne moremo uvrstiti v kategorijo odlične kakovosti, kamor bi pa spadali le posamezni primeri (B4, D5, D6).

4.2 RAZVOJ KLASIČNE METODE UGOTAVLJANJA MAŠČOBNIH KISLIN

Izbrali smo metodo priprave in ugotavljanja metilnih estrov maščobnih kislin po farmakopeji, in sicer metodo A, ki pa smo jo modificirali (28).

Ker farmakopejska metoda zahteva suhi oljni ekstrakt, smo naprej vzorec jajca D1 ekstrahirali s pentanom ter nato pentan odparili na rotavaporju (opisano v poglavju 3.2.2). Nato smo oljnemu ostanku dodali preračunane reagente po postopku, ki je opisan zgoraj. Supernatanta D1 je bilo zelo malo, bil pa je tudi močno koncentriran, zato smo ga tik pred aplikacijo na GC-MS razredčili s heptanom v razmerju 1:2 na končni volumen 200 μ L. Vsem ostalim vzorcem smo že pri postopku tvorbe metilnih estrov maščobnih kislin dodali dvakratno preračunano količino heptana in se s tem izognili preveliki koncentraciji maščobnih kislin v vzorcu. Kromatografske razmere smo priredili in sicer v farmakopeji je predvidena končna temperatura kolone 230°C, vendar smo jo povečali na 300°C z namenom, da bi detektirali sterole in da bi kolono očistili težko hlapnih spojin.

Heptan je zelo hlapen, zato prvi zapusti kolono (že po 2 minutah). Snemati smo začeli po 3 minutah, ko se je že ves heptan eluiral na detektor, ter zaključili po 28 minutah.

Želeli smo še ugotoviti, ali obstaja še kakšen ester maščobne kisline z manjšo molekulsko maso, kot jo ima metilmiristat, zato smo začetno temperaturo kolone znižali iz 160 °C na 100 °C. Ugotovili smo, da se pred metilmiristatom ne eluira noben drug metilni ester maščobne kisline. To je res veljalo za ta preiskovani vzorec D1, ne pa za vse vzorce, saj so nekateri vsebovali tudi metilmiristoleat. Ta se je iz kolone eluiral prvi, pred metilmiristatom. Začetno temperaturo smo vseeno obdržali na 160 °C, saj signala metilmiristoleata tako nismo izgubili.

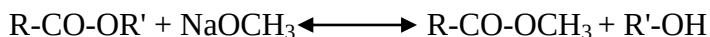
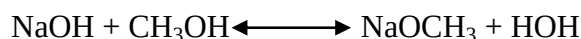
4.3 RAZVOJ METODE »IN SITU« PREESTRENJA MAŠČOBNIH KISLIN

Navadna metoda priprave metilnih estrov maščobnih kislin (MEMK) vključuje ekstrakcijo lipidov iz biološkega materiala in nadaljnjo preestrenje izoliranih lipidov. Proces je dolgotrajen in kompleksen. Da bi se izognili tem težavam, so avtorji opisali alternativni postopek, ki združuje ekstrakcijo in transmetilacijo v eni stopnji (31). Razvoja t.i. »in situ« preestrenja maščobnih kislin pa smo se lotili tudi zato, ker smo želeli ugotoviti ustreznost klasične metode.

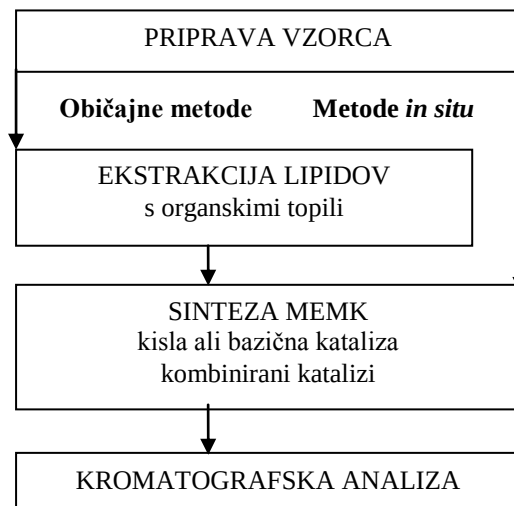
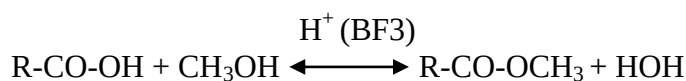
Maščobne kisline navadno pretvorimo v pripadajoče metilne estre predvsem za to, da povečamo hlapnost in zmanjšamo tvorbo repov pri vrhovih v plinskem kromatogramu (33).

Najbolj priljubljena metoda direktne priprave MEMK je z raztopino BF_3 v metanolu ali njegova kombinacija z natrijevim hidroksidom v metanolu. Po pregledu literature smo izbrali metodo, ki sta jo uporabila Park in Goins. Raziskala sta »in situ« preestrenje z alkoholizo z natrijevim hidroksidom v metanolu in z nadaljnjo metilacijo z BF_3 v metanolu (29).

S hitrimi reakcijami v bazičnem mediju smo preestriili maščobne kisline iz trigliceridov:



Proste maščobne kisline pa smo zaestriili z reakcijo v kislem mediju:



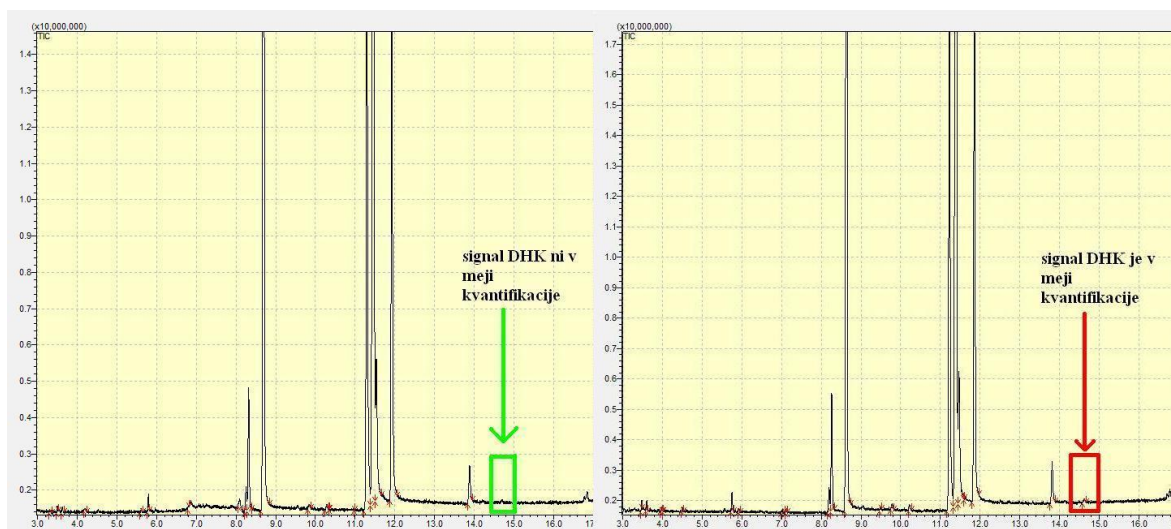
Slika 7: Primerjava postopkov

določanja maščobnih kislin v vzorcu s klasično in z direktno metodo (32):

MEMK metilni estri maščobnih kislin

Prvo stopnjo je torej zavzemalo preestrenje z NaOH v metanolu, naknadno kislo katalizo pa smo izvedli z BF_3 v metanolu (32). Reakcije potečejo hitro na polarnih lipidih, kot so proste maščobne kisline in fosfolipidi, saj se le-ti dobro raztopijo v metanolu. Po drugi strani pa so nepolarni lipidi, predvsem trigliceridi, slabo topni v metanolu, zato je bilo treba v reakcijsko mešanico dodati diklorometan (29,31).

Metodo smo optimizirali tako, da smo vzeli dvakratni alikvot z vodo razredčenega vzorca jajca in posledično tudi dvakratno količino reagentov, navedenih v članku (29). Na vzorcu jajca D5 smo izvedli dva poskusa. Pri prvem poskusu smo za ekstrakcijo nastalih metilnih estrov maščobnih kislin uporabili 1 ml heksana in tako vzorec preveč razredčili, saj ni bil dosežen prag kvantifikacije DHK (slika 8). Zato smo izvedli še en poskus, pri katerem smo volumen organske faze (heksana) zmanjšali na 0,5 ml in s tem dosegli prag kvantifikacije DHK. Potek poskusa je ostal enak, prav tako smo ohranili enake kromatografske razmere.



Slika 8: Kromatograma vzorca D5 prikazujeta vpliv volumna heksana na intenziteto signalov. Levo je prikazan kromatogram po ekstrakciji metilnih estrov v 1 ml heksana, desno pa kromatogram po ekstrakciji s 0,5 ml heksana. Ker je računalnik pik DHK pri koncentriranem vzorcu lahko integriral, smo vse nadaljnje jajčne vzorce ekstrahirali z 0,5 ml heksana. Vse ostale količine reagentov in način izvedbe poskusa pa smo ohranili.

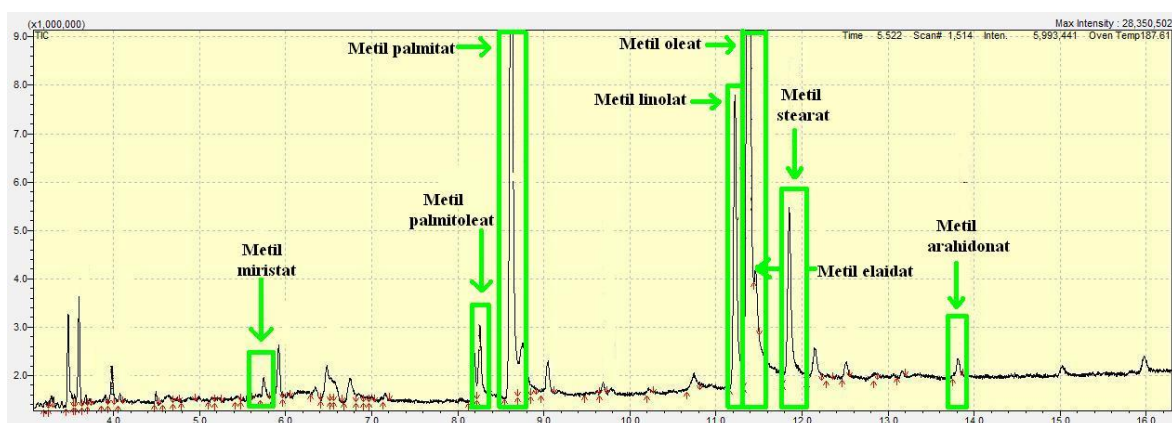
4.4 ANALIZA JAJC

Jajca smo starali 21 dni pri različnih temperaturah, nato smo vse shranili v zamrzovalnik (proces staranja naj bi s tem ustavili). Prvo serijo jajc farme Budin, farme Colja, iz Mercatorja in domače reje smo analizirali s klasično metodo. V ta namen smo po 65 dneh shranjevanja v zamrzovalniku izbrana jajca odmrznili tako, da smo jih vzeli en dan pred analizo iz zamrzovalnika. Nadaljevali smo z razvojem direktne metode, pri kateri smo ravno tako analizirali jajca iz dveh farm, Mercatorja in domača jajca (to so jajca 2. in 3. serije, ki bila shranjena v zamrzovalniku 78 oz. 84 dni). Ravno tako kot jajca iz 1. serije, smo tudi jajca iz 2. in 3. serije dan pred analizo vzeli iz zamrzovalnika in odtalili. Direktno metodo pa smo uporabili tudi za ugotavljanje sestave in vsebnosti maščobnih kislin v omega-3-obogatenih jajcih in rumenjakihi kokoši, ki so se hranile z navadno oz. tatarsko ajdo in s piro. Prav te rumenjake smo morali pred analizo odtaliti (celoten seznam pod 3.1.1 Vzorci).

4.4.1 Rezultati analize jajc s klasično metodo

S klasično metodo smo pripravili samo vzorce devetih jajc, ki smo jih starali pri različnih temperaturah okolja (1. serija pri različnih temperaturah starih jajc).

Vse vzorce smo samo enkrat injicirali in podatke zbrali v preglednici 9.



Slika 9: Kromatogram vzorca D1, ki vsebuje metilne estre maščobnih kislin, pripravljen s klasično metodo

V preglednici 9 so zbrane količine maščobnih kislin v jajcih (mg maščobne kisline/g jajca), ki smo jih pripravili in izolirali s klasično metodo. Iz rezultatov lahko razberemo, da temperatura okolja, kjer smo jajca starali nima pri vseh jajcih enakega vpliva na vsebnost in sestavo maščobnih kislin. Tako ni razvidno ali se vsebnost maščobnih kislin z višanjem temperature shranjevanja manjša oziroma večja. Vsebnosti γ -linolenske in cis-10-heptadecenojske kisline, ki sta v mejah kvantifikacije prisotni le v jajcih iz farme Colja, se s temperaturo shranjevanja jajc zmanjšujeta. Po drugi strani pa količina palmitinske kisline s temperaturo shranjevanja niha, saj je v domačem jajcu, staranem v zamrzovalniku, prisotna v količini 0,473 mg/g jajca, njena vrednost pa sploh ne doseže meje kvantifikacije v domačem jajcu, staranem v hladilniku. Medtem, ko jo lahko ponovno kvantificiramo v domačem jajcu, shranjenim pri sobni temperaturi, in sicer v vrednosti 2,23 mg/g jajca. Zanimivo je tudi, da je palmitinska kislina prisotna v mejah kvantifikacije samo pri domačih jajcih. To je v nasprotju z nekaterimi študijami, v katerih je bila palmitinska kislina v jajcih določena v znatnih količinah (1,34). Tudi v naših nadaljnjih raziskavah, v katerih smo za pripravo vzorcev jajc namesto klasične metode uporabili »in situ« preestrenje (točka 4.3), smo palmitinsko kislino potrdili v vseh jajčnih vzorcih, in sicer v povprečni vrednosti 27,0 mg/g jajca.

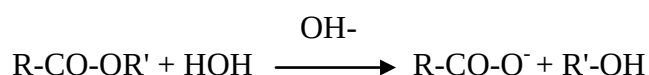
Poleg tega pa smo s klasično metodo v vzorcih ugotovili največ 14 maščobnih kislin, izostale so vse omega-3 maščobne kisline, tako eikozapentaenojska (EPK) kot dokozaheksaenojska kislina (DHK). Odsotnost EPK je sprejemljiva, saj smo tudi z direktno metodo ugotovili, da je ta kislina v jajcih le redko zastopana v mejah kvantifikacije (točka 4.4.2). Medtem, ko smo vsebnost DHK ugotovili v vseh jajčnih vzorcih, pripravljenih z »in situ« metodo, in sicer v povprečni vrednosti 2,71 mg/g jajca.

Vzrok vsem tem razlikam gre v veliki meri pripisati predpripravi vzorcev in manj sami GC/MS analizi. Postopek priprave metilnih estrov maščobnih kislin je vključeval več stopenj. Nepopolna ekstrakcija jajčnih lipidov v pentan je lahko vzrok za izgubo maščobnih kislin. Drugi vzrok za takšna odstopanja bi lahko bilo prekratko rotavapiranje vzorcev. Pentan naj bi odparili do suhega, pri tem pa je bilo treba za vsak vzorec ugotoviti, kdaj je dovolj suh. Namreč glede na maso suhega ostanka smo potem izračunali volumne predpisanih reagentov za metilacijo in nadaljnjo ekstrakcijo estrov maščobnih kislin. Če

vzorec ni bil dovolj posušen, je bila masa suhega ostanka večja, posledično smo uporabili večjo količino reagentov.

Del vzorca smo lahko izgubili pri raztapljanju lipidov v metanolu s pomočjo ultrazvoka (70°C, 15 minut). Pri tem smo en vzorec tudi popolnoma izgubili (D4). Tudi korak po metilaciji je lahko vzrok za manjše vsebnosti maščobnih kislin v vzorcih, saj je bilo potrebno kvantitativno prenesti nastale metilne estre v heptan. Pri tem je pomemben čas stresanja vzorca s heptanom, ki bi verjetno moral biti daljši od 5 min.

Po bazično katalizirani reakciji in dodatku organskega topila, smo reakcijski mešanici dodali raztopino NaCl, da bi zmanjšali možnost saponifikacije. Lahko, da je saponifikacija vseeno potekla in posledično smo izolirali manj estrov. V prisotnosti vode namreč pride do alkalne hidrolize (31):



Reakcija je irreverzibilna, saj nastane resonančno stabiliziran karboksilni anion, ki ima majhno tendenco za reakcijo z alkoholom. V zameno pa je lahko reagiral z Na^+ ioni, ki so bili prisotni v reakcijski mešanici, in tako tvoril stabilno sol, milo. Zato je alkalna hidroliza estrov večkrat poimenovana kot saponifikacija ali umiljenje (31):



Alkalni hidrolizi bi se lahko izognili z uporabo kislega katalizatorja.

Kljub temu, da sta se organska in metanolna faza pri vseh vzorcih jasno ločili, je lahko prišlo do izgub metilnih estrov z nepopolnim odpipetiranjem organske faze.

Najverjetneje pa se je iztekala tudi življenjska doba GC kolone, saj se je po optimizaciji »*in situ*« metode zasitila in potrebna je bila zamenjava.

Preglednica 9: Vsebnost maščobnih kislin (mg MK/g jajca) v jajčnih vzorcih, pripravljenih s klasično metodo

Maščobna kislina	ZAMRZOVALNIK				HLADILNIK				SOBNA T			
	Farma Budin	Farma Colja	Domača reja	Mercator®	Farma Budin	Farma Colja	Domača reja	Mercator®	Farma Budin	Farma Colja	Domača reja	Mercator®
Miristoleinska kislina (14:1)	-	0,249	-	-	-	0,462	-	-	-	0,448	-	-
Miristinska kislina (14:0)	0,102	0,219	0,0265	0,104	0,125	0,272	0,126	0,0935	0,0999	0,229	0,0577	0,119
Pentadekanojska kislina (15:0)	-	0,0442	-	-	-	0,0469	0,0447	-	-	0,0441	-	-
Palmitoleinska kislina (16:1)	0,868	18,8	0,505	1,80	2,95	21,2	6,28	1,72	0,855	0,125	2,24	1,545
Palmitinska kislina (16:0)	-		0,473	-	-	-	-	-	-	-	2,23	-
Cis-10-heptadecenojska kislina (17:1)	-	0,475	-	-	-	0,386	-	-	-	0,269	-	-
Heptadekanojska kislina (17:0)	-	0,0666	-	-	-	0,0352	0,0967	-	-	0,0227	-	-
γ-linolenska kislina – GLA (18:3)	-	0,485	-	-	-	0,337	-	-	-	0,323	-	-
Linolna kislina (18:2)	10,7	51,5	1,60	31,9	8,06	35,4	21,1	29,8	15,6	24,9	8,33	36,8
Oleinska kislina (18:1)	39,1	101	7,82	82,9	59,2	82,2	44,0	70,3	48,2	45,8	26,7	68,1

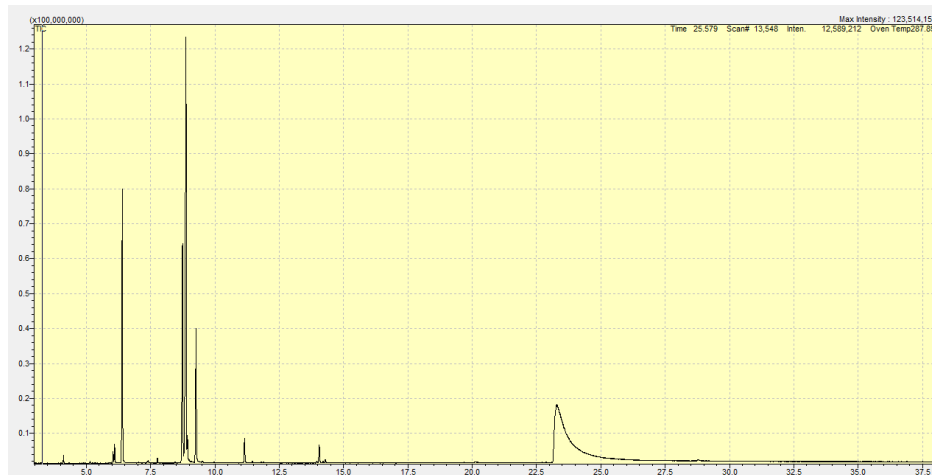
Elaidinska kislina	0,124	5,59	0,0313	3,75	0,00197	4,73	1,46	0,200	0,178	2,72	1,17	2,72
Stearinska kislina (18:0)	1,11	5,46	0,245	2,47	1,41	4,80	1,84	1,70	1,24	2,19	0,782	2,12
Arahidonska kislina (20:4)	0,486	5,99	0,206	0,817	0,783	4,61	1,44	1,04	0,531	1,63	0,310	0,861
Eikozapentaenojska kislina – EPK (20:5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dihomo-γ-linolenska kislina – DGLA (20:3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eikozadienojska kislina (20:2)	-	0,233	-	-	-	0,215	-	-	-	0,130	-	-
Dokozatrienojska kislina (22:3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arašidna kislina (20:0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heneikozaenojska kislina (21:0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	--
Dokozaheksaenojska kislina – DHK (22:6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eruka kislina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Opomba: - Odsotnost maščobne kisline v vzorcu ali pa količina maščobnih kislin v vzorcu ni dosegla praga kvantifikacije.

4.4.2 Rezultati analize jajc z direktno metodo

Z direktno metodo smo pripravili vse ostale vzorce jajc (2. in 3. serijo), ki smo jih starali pri različnih temperaturah okolja. Poleg tega, pa smo s to metodo pripravili tudi vzorce jajc kokoši, ki so jih krmili s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo, vzorce omega-3 obogatenih jajc in vzorce svežih domačih jajc.

Vse vzorce smo samo enkrat injicirali in podatke zbrali v preglednicah.



Slika 10: Spekter vzorca J3, pripravljenega z »in situ« metodo

4.4.2.1 Analiza maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov, staranih pri različnih temperaturah okolja

V preglednici 10 so prikazane povprečne vrednosti maščobnih kislin (mg maščobnih kislin/g jajca) v jajcih iz različnih virov, ki so bila shranjena pri različnih temperaturah. Če primerjamo sestavo maščobnih kislin v **zamrznjenih jajcih** kokoši v kletkah (farma Colja, Budin in verjetno tudi Mercator) in kokoši, ki so se prosto pasle (domača jajca) vidimo, da v obeh primerih med nasičenimi maščobnimi kislinami prevladuje palmitinska kislina (16:0), med enkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami oleinska kislina (18:1 n -9) in med večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami pa linolna kislina (18:2 n -6). Jajca iz proste reje vsebujejo več n -3 maščobnih kislin, predvsem DHK (dokozaheksaenojska kislina). Znano je, da se delež n -3 maščobnih kislin v jajcih poveča, če so kokoši v prosti reji s travno površino, čeprav to povečanje ni tolikšno kot pri dodajanju ribjih olj v krmni obrok (6).

V zamrznjenih jajcih zaprtih kokoši je povprečno razmerje n -6/ n -3 18,8, medtem ko v zamrznjenih jajcih kokoši iz proste reje razmerje znaša 3,34. Rezultati so v pričakovanih

vrednostih zato, ker trava, s katero se kokoši v prosti reji krmijo (poleg ostale krme), vsebuje več polinenasičenih maščobnih kislin, predvsem α -linolenske kisline, katere vrednost pa je bila pod mejo kvantifikacije v vseh jajčnih vzorcih. Vzrok za povečanje količine omega-3 maščobnih kislin (DHK) in posledično zmanjšano razmerje n-6/n-3 naj bi tičal drugje, in sicer naj bi to bila sposobnost kokoši, ki se prosto hrani in zato zaužije več α -linolenske kisline, da slednjo transformira v DHK (7).

Zaradi lažjega analiziranja rezultatov smo maščobne kisline razdelili v štiri skupine: nasičene MK (miristinska, pentadekanojska, palmitinska, heptadekanojska, stearinska in arašidna kislina), enkrat nenasičene MK (miristoleinska, palmitoleinska, *cis*-10-heptadecenojska in oleinska kislina), omega-6 maščobne kisline (γ -linolenska, linolna, arahidonska, dihomo- γ -linolenska in eikozadienojska kislina) in omega-3 maščobne kisline (eikozapentaenojska in dokozaheksaenojska kislina).

Preglednica 10: Vsebnost maščobnih kislin (mg MK/g jajca) v jajčnih vzorcih, pripravljenih z »in situ« metodo

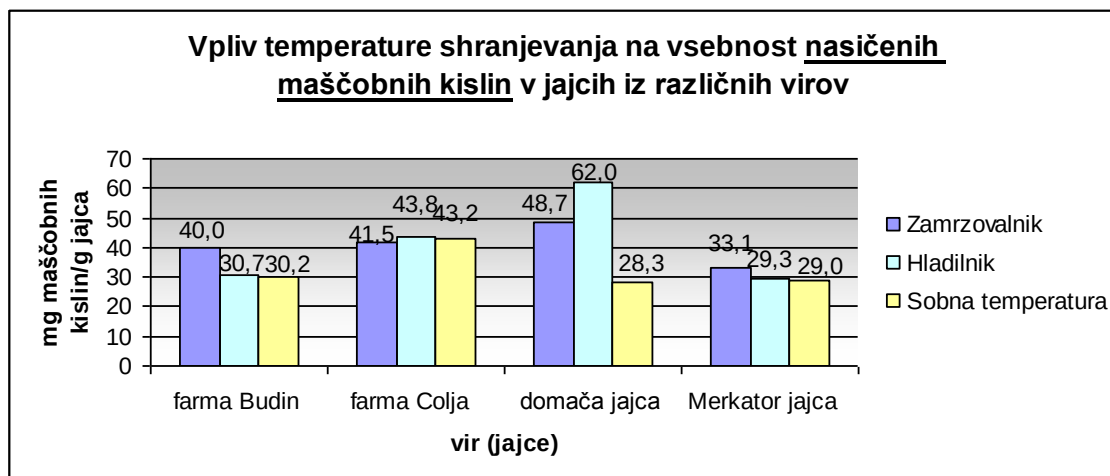
Maščobna kislina	ZAMRZOVALNIK				HLADILNIK				SOBNA T			
	Farma Budin	Farma Colja	Domača reja	Mercator®	Farma Budin	Farma Colja	Domača reja	Mercator®	Farma Budin	Farma Colja	Domača reja	Mercator®
Miristoleinska kislina (14:1)	0,0354	0,131	0,150	0,0366	0,0363	0,163	0,135	0,0165	0,0300	0,145	0,288	-
Miristinska kislina (14:0)	0,249	0,371	0,873	0,278	0,325	0,489	0,645	0,266	0,638	0,392	1,58	0,278
Pentadekanojska kislina (15:0)	0,0451	0,0544	0,218	0,0678	0,0390	0,0740	0,131	0,0579	0,103	0,0614	0,431	0,0415
Palmitoleinska kislina (16:1)	2,97	4,85	3,32	2,94	3,60	5,47	4,04	1,94	6,76	8,06	16,6	4,63
Palmitinska kislina (16:0)	25,8	27,3	33,5	23,7	21,1	32,7	45,4	16,8	22,9	35,5	19,6	20,2
Cis-10-heptadecenojska kislina (17:1)	-	0,0482	0,639	0,119	-	0,0575	0,271	-	0,111	-	1,14	-
Heptadekanojska kislina (17:0)	0,130	0,0960	0,838	0,217	0,115	0,160	0,478	0,183	0,403	0,112	1,71	0,111
γ -linolenska kislina – GLA (18:3)	0,0721	0,100	0,409	0,185	0,105	0,148	0,191	0,121	0,340	0,0859	1,13	-
Linolna kislina (18:2)	21,0	20,6	21,5	24,8	8,83	15,0	21,8	21,5	12,0	16,2	12,2	22,9
Oleinska kislina (18:1)	37,4	34,8	16,7	10,2	16,6	39,6	62,5	21,2	27,9	36,0	19,8	22,8

Elaidinska kislina	3,52	3,78	3,38	3,07	3,67	4,78	5,60	2,50	6,24	4,55	10,2	2,06
Stearinska kislina (18:0)	13,8	13,7	13,3	8,80	9,03	10,4	15,3	12,0	6,19	7,15	4,91	8,41
Arahidonska kislina (20:4)	5,28	4,65	3,78	2,45	2,90	3,31	2,89	4,01	7,03	4,33	11,5	2,74
Eikozapentaenojska kislina – EPK (20:5)	-	0,0604	-	-	0,301	-	-	-	-	-	-	-
Dihomo-γ-linolenska kislina – DGLA (20:3)	-	0,259	0,537	0,212	0,332	0,230	0,466	0,172	0,519	0,313	1,45	0,0677
Eikozadienojska kislina (20:2)	-	0,0331	0,263	0,153	-	0,0357	-	0,141	0,326	-	-	0,0409
Dokozatrienojska kislina (22:3)	-	-	0,386	0,113	0,148	-	0,252	0,105	0,376	0,121	0,512	0,0899
Arašidna kislina (20:0)	-	-	-	-	0,018	-	-	-	0,0310	-	0,0565	-
Heneikozaenojska kislina (21:0)					-	-	-	0,00710	-	-	-	-
Dokozaheksaenojska kislina – DHK (22:6)	0,993	1,22	7,90	2,80	1,33	1,55	3,40	2,35	2,66	1,54	5,40	1,35
Eruka kislina	-	-	-	-	0,00407	0,00479	-	-	-	-	-	-
Skupaj vseh maščobnih kislin	111	112	108	80,2	68,5	114	164	83,3	94,5	114	108	85,7

Skupaj nasičenih MK	40,0	41,5	48,7	33,1	30,7	43,8	62,0	29,3	30,2	43,2	28,3	29,0
Skupaj enkrat nenasičenih MK	40,4	39,8	20,8	13,3	20,2	45,3	67,0	23,1	34,8	44,2	37,8	27,4
Skupaj omega-6 MK	26,4	25,6	26,4	27,8	12,2	18,8	25,4	26,0	20,2	20,9	26,2	25,8
Skupaj omega-3 MK	0,993	1,28	7,90	2,80	1,63	1,55	3,40	2,35	2,66	1,54	3,28	1,35
Omega-6/omega-3	26,6	19,9	3,34	9,92	7,48	12,1	7,47	11,1	7,59	13,6	7,99	19,1

Opomba: - Odsotnost maščobne kisline v vzorcu ali pa količina maščobnih kislin v vzorcu ni dosegla praga kvantifikacije.

1. Analiza **nasičenih maščobnih kislin** v jajcih iz različnih virov, shranjenih v zamrzovalniku, hladilniku in pri sobni temperaturi



Slika 11: Vpliv temperature shranjevanja na vsebnost nasičenih maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov

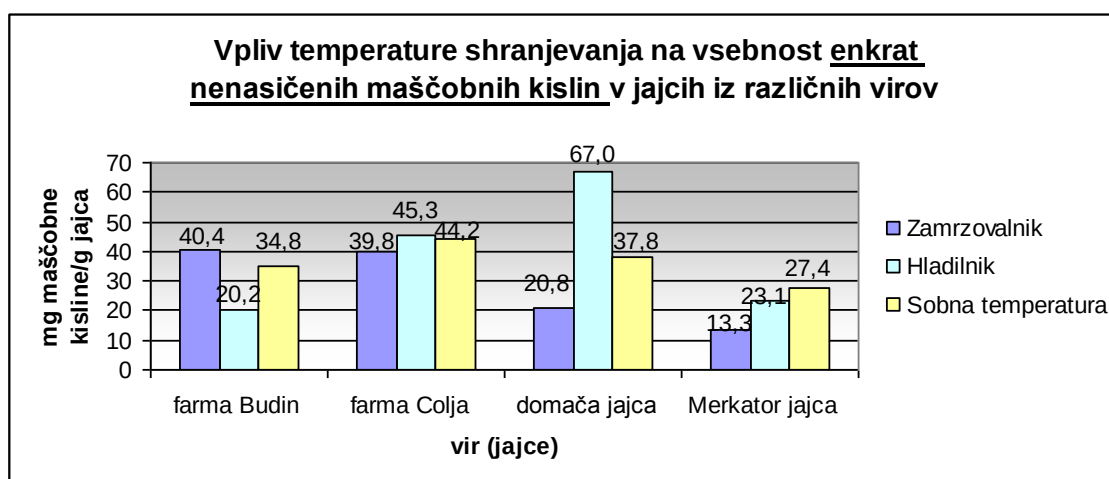
Celokupna vsebnost nasičenih maščobnih kislin naj bi bila okoli 30 mg maščobnih kislin/g jajca (1). Dobljene povprečne vrednosti se gibljejo od 28,3 (domača jajca, starana pri sobni temperaturi) do 62,0 mg nasičenih MK/g jajca (domača jajca, starana v hladilniku). Najbližje literaturni vrednosti (1) je vsebnost nasičenih maščobnih kislin v jajcih farme Budin, shranjenih pri sobni temperaturi (30,2 mg MK/g jajca). Od vseh maščobnih kislin je nasičenih približno 37,8 %. Iz preglednice 10 lahko razberemo, da vsa preiskovana jajca vsebujejo pet različnih nasičenih maščobnih kislin. Med nasičenimi maščobnimi kislinami v vseh jajcih prevladuje palmitinska kislina, ki jo je največ v domačih jajcih, shranjenih v hladilniku (povprečno 45,4 mg MK/g jajca), najmanj pa v jajcih Mercator, prav tako shranjenih v hladilniku (povprečno 16,8 mg MK/g jajca). Druga najbolj zastopana nasičena kislina je stearinska, ki je največ vsebujejo domača jajca, ki so bila starana v hladilniku (15,3 mg MK/g jajca), najmanj pa domača jajca, starana pri sobni temperaturi (4,91 mg/g jajca). Vsa jajca vsebujejo tudi miristinsko, heptadekanojsko in pentadekanojsko kislino. Pri jajcih farme Budin, ki so bila shranjena v hladilniku in pri sobni temperaturi, in enemu domačemu jajcu, shranjenemu pri sobni temperaturi, smo zasledili tudi arašidno kislino (povprečno 0,0352 mg MK/g jajca).

Iz slike 11 je razvidno, da je vsebnost nasičenih maščobnih kislin v jajcih odvisna tako od vira, kjer smo jajca kupili, kot tudi od temperature prostora, kjer smo jajca

shranjevali. Tako imajo jajca iz farme Colja, pri vseh treh razmerah shranjevanja, večjo količino nasičenih maščobnih kislin, kot jajca iz farme Budin. Vendar po drugi strani vsebnost nasičenih maščobnih kislin v jajcih farme Colja ni odvisna od temperature, saj je vrednost skoraj enaka pri vseh treh razmerah shranjevanja.

Pri jajcih iz farme Budin in Mercator jajcih je viden trend upadanja nasičenih maščobnih kislin s temperaturo shranjevanja. Torej, najmanj nasičenih maščobnih kislin je v jajcih, shranjenih pri sobni temperaturi, največ pa v jajcih shranjenih v zamrzovalniku.

2. Analiza **enkrat nenasičenih maščobnih kislin** v jajcih iz različnih virov, shranjenih v zamrzovalniku, hladilniku in pri sobni temperaturi



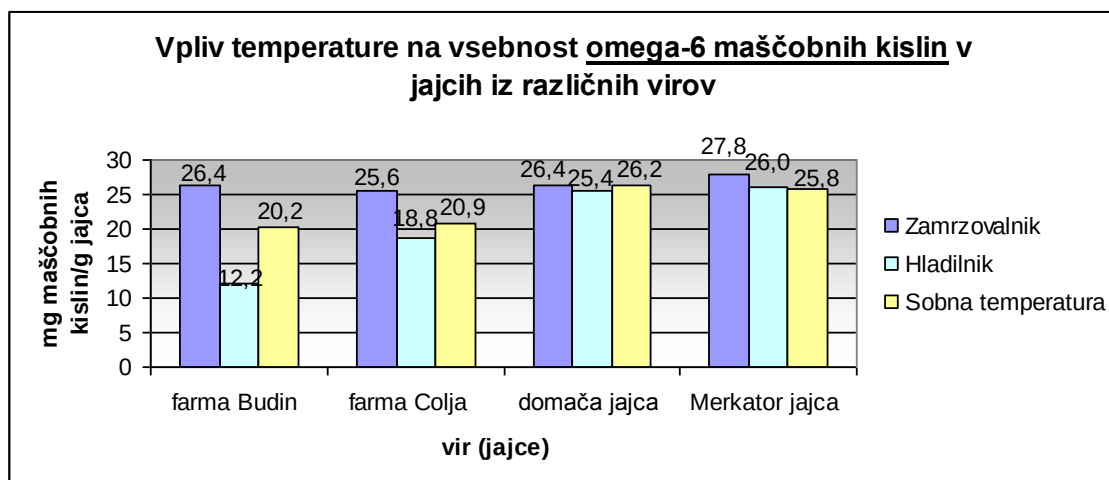
Slika 12: Vpliv temperature shranjevanja na vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov

Celokupna vrednost enkrat nenasičenih maščobnih kislin v jajcih naj bi bila 41,5 mg enkrat nenasičenih maščobnih kislin/g jajca (1). Dobljeni rezultati se gibljejo od 13,3 do 67,0 mg enkrat nenasičenih maščobnih kislin/g jajca. Najbližje literaturni vrednosti (1) je vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin v zamrznjenih jajcih farme Budin (40,4 mg/g jajca). V jajcih je med vsemi maščobnimi kislinaми enkrat nenasičenih približno 31,0 %. Iz preglednice 10 lahko razberemo, da vsa preiskovana jajca vsebujejo vsaj dve različni enkrat nenasičeni maščobni kislini, to sta palmitoleinska in oleinska kislina. Prve je največ v domačih jajcih, shranjenih pri sobni temperaturi (16,6 mg MK/g jajca), najmanj pa v Mercator jajcih, ki smo jih starali v hladilniku (1,94 mg MK/g jajca). Oleinska kislina je najbolj zastopana v domačih jajcih, shranjenih v hladilniku (62,5 mg MK/g jajca), najmanj pa v zamrznjenih jajcih iz

Mercatorja. Večina jajčnih vzorcev vsebuje v mejah kvantifikacije tudi miristoleinsko kislino, nekateri vzorci pa tudi *cis*-10-heptadecenojsko kislino.

Iz slike 12 vidimo, da je vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin odvisna tako od vira, kjer smo jajca kupili, kot tudi od temperature prostora, kjer smo jajca shranjevali. Prav slednji dejavnik pa ne vpliva na vsa jajca enako. Namreč v jajcih iz Mercatorja se količina enkrat nenasičenih maščobnih kislin povečuje z višanjem temperature shranjevanja, v jajcih iz farme Colja pa se količina neznatno spreminja. Pri domačih jajcih in jajcih iz farme Budin pa ne moremo razbrati nekega trenda povečevanja oz. zmanjševanja količine enkrat nenasičenih maščobnih kislin. Zamrznjena jajca iz farme Budin vsebujejo 40,4 mg enkrat nenasičenih MK/g jajca. Ta vrednost upade na 20,2 mg MK/g jajca, če Budinova jajca staramo v hladilniku, in se ponovno poveča v primeru, da jajca shranjujemo pri sobni temperaturi (34,8 mg MK/g jajca). Obratno velja za jajca iz farme Colja, ki imajo največjo vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin, če jih shranjujemo v hladilniku (45,3 mg MK/g jajca).

3. Analiza **omega-6-maščobnih kislin** v jajcih iz različnih virov, shranjenih v zamrzovalniku, hladilniku in pri sobni temperaturi



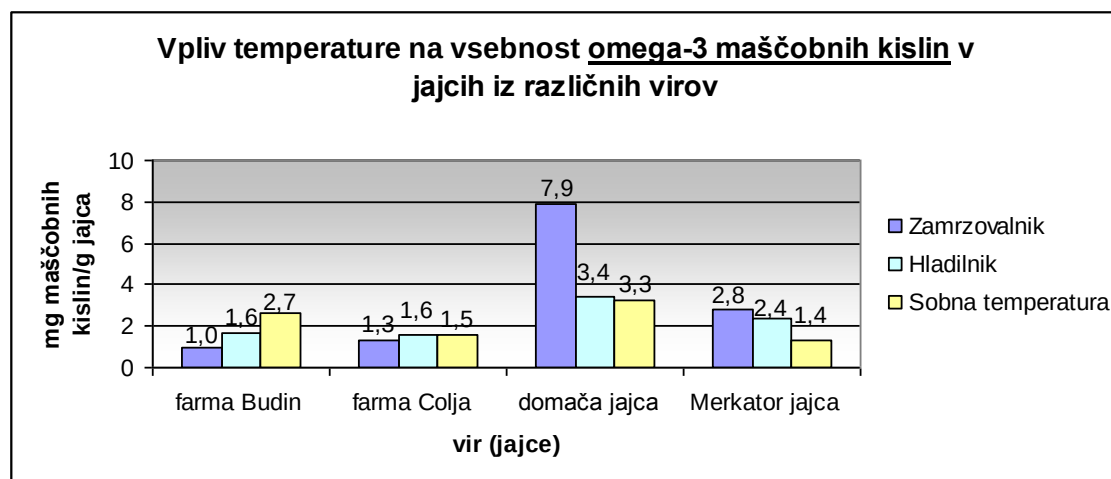
Slika 13: Vpliv temperature shranjevanja na vsebnost omega-6 maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov

Celokupna vrednost omega-6 maščobnih kislin v jajcih naj bi bila 18,8 mg maščobnih kislin/g jajca (34). Dobljeni rezultati se gibljejo od 12,2 do 27,8 mg MK/g jajca. Vsa preiskovana jajca vsebujejo vsaj dve omega-6-maščobni kislini (preglednica 10). Največ je linolne kisline (povprečno 18,2 mg MK/g jajca), ki ji sledi arahidonska kislina (povprečno 4,57 mg MK/g jajca). V nekaterih vzorcih so prisotne tudi druge

omega-6-maščobne kisline, kot so γ -linolenska (GLK), dihomom- γ -linolenska (DGLK) in eikozadienojska kislina.

Iz slike 13 lahko razberemo, da na vsebnost omega-6-maščobnih kislin v jajcih vplivata tako vir, iz katerega jajca izhajajo, kot temperatura prostora, v katerem smo jajca shranjevali. Vendar povezava med temperaturo shranjevanja in vsebnostjo omega-6-maščobnih kislin ni pri vseh jajcih enaka. Pri Mercator jajcih lahko opazimo trend zmanjševanja vsebnosti omega-6 maščobnih kislin z višanjem temperature. Pri jajcih iz ostalih treh farm pa te povezave ni. Lahko pa rečemo, da je v jajcih iz teh treh virov količina omega-6 maščobnih kislin najmanjša, če so starana v hladilniku. Pri sobni temperaturi ta vrednost naraste, vendar ne do količine, ki jo vsebujejo zamrznjena jajca teh farm.

4. Analiza **omega-3-maščobnih kislin** v jajcih iz različnih virov, shranjenih v zamrzovalniku, hladilniku in pri sobni temperaturi



Slika 14: Vpliv temperature shranjevanja na vsebnost omega-3 maščobnih kislin v jajcih iz različnih virov

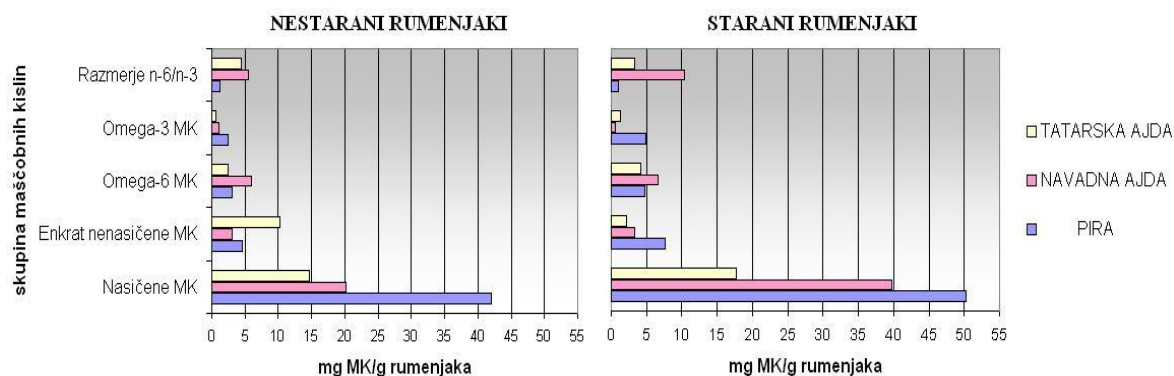
V literaturi smo zasledili, da naj bi jajce vsebovalo približno 11,3 mg omega-3 maščobnih kislin (EPK + DHK)/g jajčne vsebine (34). Najbližje podani vrednosti je vsebnost omega-3 maščobnih kislin v domačih jajcih (7,9 mg MK/g jajca). Iz preglednice 10 vidimo, da vsa preiskovana jajca vsebujejo izmed omega-3-maščobnih kislin v mejah kvantifikacije dokozaheksanojsko kislino (DHK), vzorca C2, ki je bil shranjen v zamrzovalniku, in B4, ki je bil staran v hladilniku, pa v mejah kvantifikacije vsebujeta tudi eikozapentaenojsko kislino (EPK) (0,0604 mg/g; 0,301 mg/g). Pojavi se vprašanje ali drugi vzorci vsebujejo res tako majhno količino EPK,

da je nismo uspeli kvantificirati, ali pa se nam je pri pripravi vzorcev izgubila določena količina maščobnih kislin. Namreč pri direktni pripravi metilnih estrov maščobnih kislin lahko pride do napak, ki pa jih je zagotovo manj kot pri klasični metodi priprave estrov. Prvo napako smo lahko storili pri kvantitativnem metiliranju, pri katerem se verjetno vse maščobne kisline niso pretvorile v pripadajoče metilne estre. Prekratko (1 min) ali prešibko stresanje pa bi lahko botrovalo k nekvantitativnemu prenosu estrov v organsko fazo (31).

Iz slike 14 lahko razberemo, da je vsebnost omega-3-maščobnih kislin odvisna tako od vira, kjer smo jajca kupili, kot tudi od temperature shranjevanja jajc. Vendar pa temperatura ne vpliva na vsa jajca enako. Tako lahko pri domačih in Mercator jajcih zasledimo trend zmanjševanja vsebnosti omega-3 maščobnih kislin v odvisnosti od temperature, in sicer višja kot je temperatura shranjevanja jajc, manj je omega-3 maščobnih kislin. Po drugi strani pa se v jajcih farme Budin z višanjem temperature večja količina omega-3 maščobnih kislin, medtem, ko ostaja slednja pri jajcih farme Colja bolj ali manj konstantna.

4.4.2.2 Vpliv hranjenja kokoši s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo na sestavo in vsebnost maščobnih kislin v rumenjaki

1. Primerjava maščobnokislinske sestave staranih in nestaranih rumenjakov kokoši, krmljenih s piro, navadno oz. tatarsko ajdo



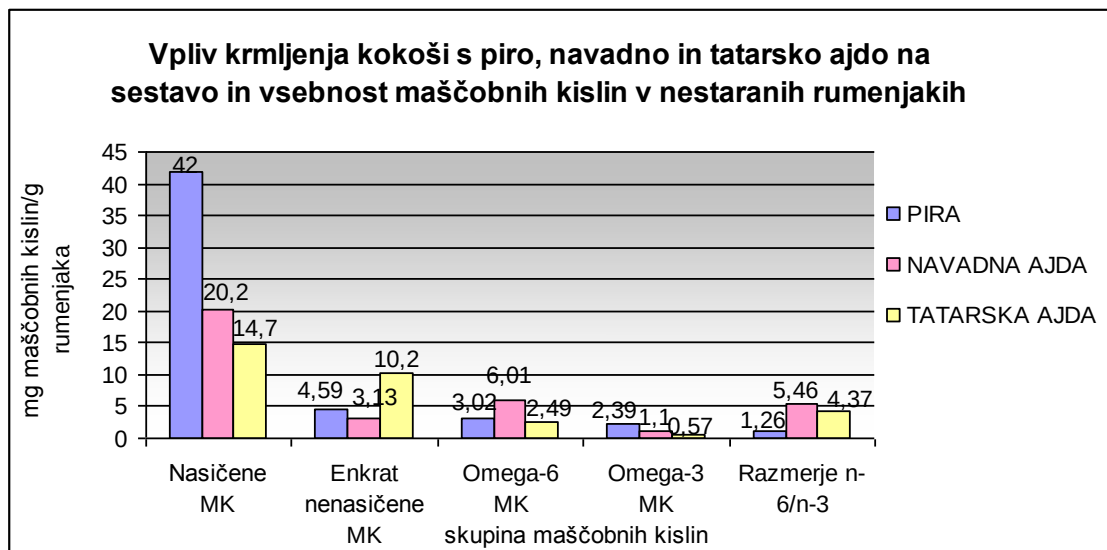
Slika 15: Vpliv krmljenja kokoši s piro, navadno in s tatarsko ajdo na sestavo in vsebnost maščobnih kislin v nestaranih in staranih rumenjaki

Vsi vzorci, ki nam jih je posredovala Biotehniška fakulteta, so obsegali samo jajčni rumenjak, zato naj bi bile te vrednosti maščobnih kislin večje od tistih, ki smo jih ugotovili v celem jajcu (točka 4.4.2.1). V beljaku ni maščob in njegova vključitev v analizo pomeni razredčeno koncentracijo maščobnih kislin v vzorcu.

Iz slike 15 lahko razberemo, da se vsebnost vseh skupin maščobnih kislin za vse tri krme s staranjem ne spreminja na enak način. Tako je na primer količina omega-3 maščobnih kislin v staranih rumenjaki kokoši, ki so jih krmili z otrobi tatarske ajde (1,23 mg MK/g rumenjaka) in pire (4,9 mg MK/g rumenjaka), večja kot v nestaranih rumenjaki (0,57 mg MK/g rumenjaka; 2,39 mg MK/g rumenjaka). Nasprotno pa je vsebnost omega-3 maščobnih kislin manjša v staranih rumenjaki kokoši, hranjenih z navadno ajdo (0,644 mg MK/g rumenjaka) kot v nestaranih rumenjaki.

Vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin je pri pirinih staranih rumenjaki večja kot v nestaranih. Po drugi strani pa je v rumenjaki kokoši, ki so se hranile s tatarsko ajdo, ta količina manjša v staranih rumenjaki. Vrednost enkrat nenasičenih maščobnih kislin pa se s staranjem ne spreminja v rumenjaki kokoši, krmljenih z navadno ajdo. Edini dve skupini maščobnih kislin, ki se jim s staranjem koncentracija enakomerno povečuje (približno 1,5x) pri vseh treh rumenjaki, to je, če izberemo za krmo piro, navadno ajdo ali tatarsko ajdo, sta omega-6 in nasičene maščobne kisline.

2. Vpliv treh vrst krmljenja kokoši na sestavo in vsebnost maščobnih kislin v nestaranih rumenjaki



Slika 16: Vpliv krmljenja s piro, navadno in tatarsko ajdo na sestavo in vsebnost maščobnih kislin v nestaranih rumenjaki

Ker bi za uživanje bili primerni le nestarani rumenjaki, nas zanima predvsem kako se sestava in vsebnost maščobnih kislin spremeni, če kokoši krmimo s piro, navadno in tatarsko ajdo. Od vseh treh vrst krmljenj kokoši, hranjenje s tatarsko ajdo povzroči največjo vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin (10,2 mg MK/g rumenjaka) in po drugi strani tudi najmanjši vsebnosti nasičenih (14,7 mg MK/g jajca) in omega-6 maščobnih kislin (2,49 mg MK/g jajca) v nestaranih rumenjaki (slika 16). To je za zdravje zelo ugodno, slabost krmljenja s tatarsko ajdo pa bi lahko predstavljala samo majhna koncentracija omega-3 maščobnih kislin v rumenjaki (0,57 mg MK/g rumenjaka).

Za razliko od tatarske ajde pa bi krmljenje z navadno ajdo povzročilo najmanjšo koncentracijo enkrat nenasičenih maščobnih kislin (3,13 mg MK/g rumenjaka) in največjo koncentracijo omega-6 maščobnih kislin v rumenjaki (6,01 mg MK/g rumenjaka). Prav ta velika količina omega-6 maščobnih kislin ima za posledico najbolj široko razmerje n-6/n-3 (5,46) od vseh treh krmljenj.

Krmljenje kokoši s piro izstopa v dveh skupinah maščobnih kislin. Povzroči tako največjo količino nasičenih maščobnih kislin izmed vseh treh otrobov (42 mg MK/g rumenjaka), kot tudi največjo količino omega-3 maščobnih kislin (2,39 mg MK/g rumenjaka). Prav slednja prinese levji delež k bolj ugodnemu razmerju n-6/n-3, ki je

izmed vseh razmerij za zdravje najbolj ugodno prav pri nestaranih pirinih jajcih (1,26).

3. Sestava maščobnih kislin otrobov navadne oz. tatarske ajde in pire ter rumenjakov

Že dolgo je znano, da lahko na sestavo maščobnih kislin jajčnega rumenjaka vplivamo s spreminjanjem sestave krmnih obrokov za kokoši (6). Zanimalo nas je, če obstaja povezava med sestavo maščobnih kislin v otrobih pire, navadne in tatarske ajde in njihovo pojavnostjo v rumenjakih kokoši, ki so se hranile s temi otrobi.

Preglednica 11: Sestava maščobnih kislin otrobov navadne, tatarske ajde in pire ter rumenjakov kokoši, ki so jih krmili s temi tremi vrstami otrobov

Maščobna kislina	NAVADNA AJDA		Maščobna kislina	TATARSKA AJDA		Maščobna kislina	PIRA	
	Otro- bi (%)	Nestarani rumenja- ki (%)		Otr- obi (%)	Nestarani rumenjaki (%)		Otrobi (%)	Nestarani rumenjaki (%)
C16:0 palmitinska	15,1	56,0	C16:0 palmitinska	19,0	40,7	C16:0 palmitinska	17,8	46,0
C18:0 stearinska	1,93	15,0	C18:0 stearinska	2,89	12,7	C18:0 stearinska	1,40	19,3
C18:1, n-9 oleinska	35,7	3,81	C18:1, n-9 oleinska	34,0	32,9	C18:1, n-9 oleinska	19,4	3,35
C18:2, n-6 linolna	37,7	17,5	C18:2, n-6 linolna	35,3	11,3	C18:2, n-6 linolna	55,0	24,3
C20:4, n-6 arahidonska	1,74	4,78	C20:4, n-6 arahidonska	1,74	2,40	C14:0 miristinska	0,530	0,499
C18:3, n-6 γ -linolenska	0,966	0,0729				C16:1 palmitoleinska	0,268	6,52

Podatke za sestavo maščobnih kislin posameznih vrst otrobov smo pridobili iz članka in pri tem predpostavljamo, da imajo tudi otrobi pire, navadne in tatarske ajde, s katerimi so na Biotehniški fakulteti krmili kokoši, enako vsebnost in sestavo maščobnih kislin (36,37).

Otrobi pire, poleg vseh naštetih maščobnih kislin (preglednica 11), vsebujejo tudi eikozaenojsko kislino in γ -linolensko kislino, ki pa v rumenjakih nista prisotni.

Otrobi tatarske ajde in navadne ajde vsebujejo, poleg vseh maščobnih kislin podanih v preglednici 11, tudi eikozaenojsko kislino, behenojsko kislino in γ -linolensko kislino.

Slednjo smo v rumenjakih potrdili le pri krmljenju kokoši z navadno ajdo. Tako eikosaenojske kot behenojske kisline pa rumenjaki tatarske in navadne ajde ne vsebujejo.

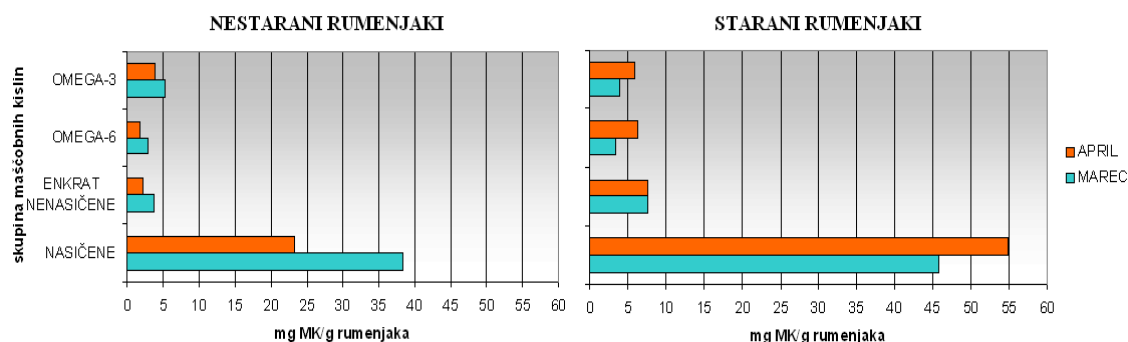
Po drugi strani pa tudi rumenjaki kokoši, ki so jih krmili s piro, navadno ajdo in tatarsko ajdo, vsebujejo več različnih maščobnih kislin, ki pa jih ni v otrobih pire in v otrobih dresnovk (*Polygonaceae*). Da bi lahko vzorce primerjali med seboj, smo preračunali deleže maščobnih kislin glede na vse maščobne kisline tako, da smo za celokupne maščobne kisline izbrali samo tiste, ki so prisotne v obeh vzorcih (tako v otrobih kot v rumenjakih).

Kot vidimo iz preglednice 11 je delež palmitinske in stearinske v vseh treh primerih krmljenja večji v rumenjakih kot v otrobih pire, navadne oz. tatarske ajde. Povečan delež stearinske kisline v rumenjakih torej ni posledica posebnega krmljenja kokoši, ampak je najverjetneje odraz proste reje kokoši, pri kateri žival zaužije tudi manjšo mero živalskih maščob (črvi, žuželke) (35).

Medtem pa deleža oleinske in linolne kisline v rumenjakih kažeta na to, da se le en del večkrat nenasičenih maščobnih kislin (linolna) in enkrat nenasičenih maščobnih kislin (oleinske) prenese iz otrobov v rumenjake. Izjema so le otrobi in rumenjaki tatarske ajde, kjer se skoraj vsa oleinska kislina prenese v rumenjak.

V otrobih navadne in tatarske ajde je prisotna arahidonska kislina, ki se v celoti prenese v rumenjake. Vendar so deleži arahidonske kisline v rumenjakih večji kot v otrobih zato sklepamo, da arahidonska kislina v rumenjakih ni samo posledica krmljenja kokoši z otrobi navadne in tatarske ajde, temveč jo mora kokoš zaužiti s kakšnim drugim virom ali pa jo sintetizira sama.

4. Vpliv meseca znesenja jajc kokoši, krmljenih s piro, na vsebnost maščobnih kislin v rumenjaki



Slika 17: Razlika v vsebnosti maščobnih kislin v nestaranih oz. staranih aprilskih in marčevskih rumenjaki kokoši, ki so jih krmili s piro

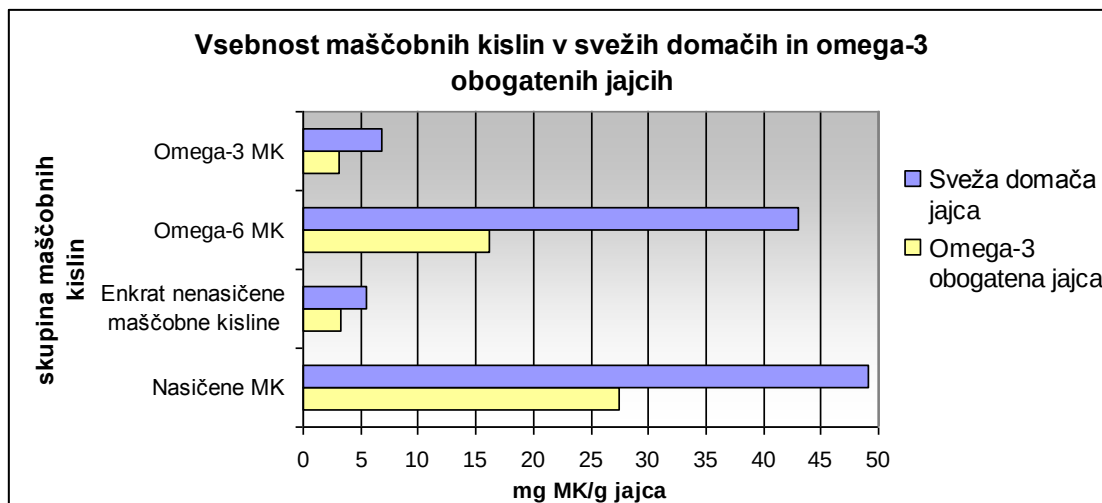
Primerjava sestave in vsebnosti **nestaranih pirinih jajc**, pobranih meseca marca, in nestaranih pirinih jajc, ki so jih pobrali konec meseca aprila (slika 17), nam pokaže, da jajca iz prve serije vsebujejo povprečno več maščobnih kislin (66,5 mg MK/g rumenjaka) kot jajca iz druge serije (44,0 mg MK/g rumenjaka). Marčevska jajca imajo povprečno več nasičenih (miristinske, palmitinske, heptadekanojske in stearinske kisline), vendar tudi več enkrat nenasičenih maščobnih kislin (predvsem palmitoleinske kisline). Ker vsebujejo marčevska jajca, v primerjavi z aprilskimi, tako več omega-6 (3,90 mg MK/g rumenjaka), kot tudi več omega-3 maščobnih kislin (2,90 mg MK/g rumenjaka), imajo obe seriji jajc podobno razmerje omega-6/omega-3. Pri obeh serijah nestaranih jajc sta razmerji v povprečju zelo ugodni, saj znašata tako pri marčevskih (1,4:1), kot pri aprilskih jajcih (1,3:1) manj kot 5.

Priporočen vnos EPK plus DHK je 250 mg na dan, ki naj bi zadostovalo za primarno preprečevanje kardiovaskularnih bolezni (21). Če predpostavimo, da so vsa jajca tehtala 60 g, bi nestarano marčevsko jajce v povprečju zagotovilo 70 % (174 mg), nestarano aprilsko jajce pa 43 % (108 mg) priporočenega dnevnega vnosa EPK plus DHK (8).

Takšna razlika v sestavi in vsebnosti maščobnih kislin med obema serijama pirinih jajc, je najverjetneje posledica dejavnikov okolja. Marca je bilo vreme hladnejše, aprilsko jajca pa so bila izležena pri višjih temperaturah. Mogoče so se kokoši meseca marca hranile s kakšno travo oziroma rastlino, ki je rasla ali cvetela samo marca, aprila pa ne, in je vsebovala veliko količino maščobnih kislin, ki so se potem prenesle v jajca.

Če pa primerjamo **starana marčevska in aprilka jajca** (slika 17), se slika povsem obrne, saj vsebujejo aprilka 88 dni starana jajca v povprečju več maščobnih kislin kot marčevska jajca, ki so bila prav tako starana 88 dni. Starana aprilka jajca vsebujejo več nasičenih maščobnih kislin (54,8 mg/g rumenjaka) kot starana marčevska jajca (45,8 mg/g rumenjaka). Vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin je približno enaka pri obeh serijah jajc, pri čemer je v staranih marčevskih jajcih več palmitoleinske kisline. Znatno razliko med serijama jajc, pa lahko opazimo v vsebnosti omega-6 in omega-3 maščobnih kislin. Starana aprilka jajca povprečno vsebujejo več omega-6 maščobnih kislin (6,3 mg/g rumenjaka) kot starana marčevska jajca (3,3 mg/g rumenjaka). Ker pa jajca iz druge serije vsebujejo tudi več omega-3 maščobnih kislin (5,9 mg/g rumenjaka) kot jajca iz prve serije (3,9 mg/g rumenjaka), sta razmerji omega-6/omega-3 pri obeh serijah jajc skoraj enaki (0,9; 1,1).

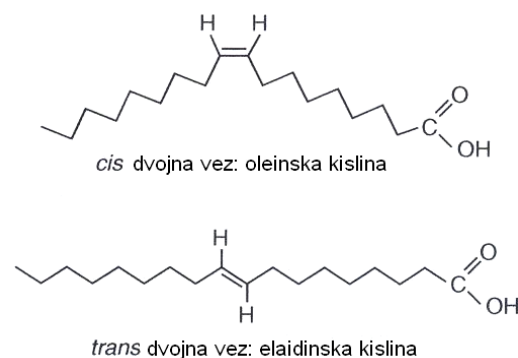
4.4.2.3 Sestava in vsebnost maščobnih kislin v omega-3 obogatenih in svežih domačih jajcih



Slika 18: Primerjava vsebnosti posameznih skupin maščobnih kislin v svežih domačih in omega-3 obogatenih jajcih

Slika 18 prikazuje sestavo maščobnih kislin svežih domačih in omega-3 obogatenih jajc. Omega-3 obogatena jajca kažejo veliko razliko v sestavi in predvsem v vsebnosti maščobnih kislin, saj imajo v primerjavi s svežimi domačimi jajci, v povprečju dvakrat manj maščobnih kislin in nižjo raven miristinske, pentadekanojske, heptadekanojske in palmitinske maščobne kisline (preglednica 15 v prilogi). Posledično vsebujejo manj celokupnih nasičenih maščobnih kislin (27,5 mg/g jajca) kot domača jajca (49,1 mg/g jajca), pa tudi 1,8-krat manj enkrat nenasičenih maščobnih kislin (miristoleinske, palmitoleinske in *cis*-10-heptadecenojske kisline).

Jajca naj bi vsebovala manj kot 0,833 mg *trans* maščobnih kislin/g jajca, kot rezultat biohidrogenacije maščobnih kislin v živalih (5,19). Tako omega-3 obogatena jajca kot sveža domača jajca vsebujejo *trans* izomer oleinske kisline, to je elaidinsko kislino, vendar v večji količini (povprečno 2,12 mg/g jajca; 2,73 mg/g jajca). Domača jajca so bila sveža (analizirali smo jih dan po znesenju), zato



Slika 19: Strukturni formuli oleinske in elaidinske kisline (19)

prisotnost elaidinske kisline v tako veliki količini ne more biti posledica staranja. Najverjetneje sam postopek priprave metilnih estrov maščobnih kislin privede do izomerizacije določene količine oleinske kisline.

Presenetljivi pa so predvsem rezultati vsebnosti omega-3 maščobnih kislin v jajcih, saj imajo omega-3 obogatena jajca približno dvakrat manj omega-3 maščobnih kislin kot sveža domača jajca (3,16 mg/g jajca; 6,89 mg/g jajca). Pri svežih domačih jajcih sta med omega-3 maščobnimi kislinami prisotni tako eikozapentaenojska kislina (EPK) s povprečno koncentracijo 0,0215 mg/g domačega jajca, kot tudi dokozaheksaenojska kislina (DHK) s povprečno vsebnostjo 6,87 mg/g jajca. Po drugi strani pa omega-3 obogatena jajca vsebujejo le DHK v povprečni količini 3,16 mg/g jajca. Vzrok za povečanje DHK v domačih jajcih je najverjetneje prosta reja kokoši. Trava, katero kokoši v prosti reji zaužijejo, vsebuje več polinenasičenih maščobnih kislin, predvsem α -linolenske kisline, kot komercialna mešanica za hranjenje. Vendar v naših jajcih količina α -linolenske kisline ni bila v mejah kvantifikacije. Zato lahko povečanje deleža DHK v jajcih iz proste reje lahko razlagamo s sposobnostjo kokoši, ki se prosto hrani in zato zaužije več α -linolenske kisline, da slednjo transformira v DHK (8). Jajca proste reje vsebujejo tudi več stearinske kisline kot omega-3 obogatena jajca, ki pa ni posledica hranjenja kokoši s travo, saj le-ta vsebuje majhne količine stearinske kisline, 2,41 % (m/m) vseh maščobnih kislin. Predvideva se, da kokoši, ki se prosto pasejo, pojedjo vsaj malo živalskih maščob oz. hrane živalskega izvora (črvi, žuželke) (35).

Pomembne vloge pa ne igra samo količina omega-3 maščobnih kislin v jajcu, ampak tudi pravilno razmerje med omega-6 in omega-3 maščobnimi kislinami. Primerno razmerje med omega-6 in omega-3 maščobnimi kislinami je 5:1 ali še manj (14). Razmerje maščobnih kislin n-6/n-3 je pri obogatenih jajcih povprečno 5,28, pri navadnih pa okrog 6,55.

Priporočen vnos EPK plus DHK je 250 mg na dan, ki naj bi zadostovalo za primarno preprečevanje kardiovaskularnih bolezni (21). Če predpostavimo, da sta obe jajci tehtali 60 g, bi sveže domače jajce zagotovilo 165 % (413 mg), omega-3 obogateno jajce pa 75,8 % (190 mg) priporočenega dnevnega vnosa EPK plus DHK.

V primerjavi z omega-3 obogatenimi jajci, vsebujejo domača jajca več omega-3 maščobnih kislin s še sprejemljivim razmerjem med n-6 in n-3 kislinami.

5 SKLEP

V raziskovalnem diplomskem delu smo poleg ugotavljanja sestave maščobnih kislin svežih in starih jajc ugotavljali tudi kakovost jajc iz štirih različnih virov. Pri tem smo uporabili oceno s Haughovimi enotami, ki so se izkazale kot dober kvantitativen parameter pri ugotavljanju kakovosti. Razlika v številu Haughovih enot je očitna, saj imajo jajca, shranjena pri sobni temperaturi manj Haughovih enot kot jajca, shranjena v hladilniku.

Naslednji korak v raziskovalnem delu pa je obsegal dve metodi priprave metilnih estrov maščobnih kislin, in sicer klasično in direktno metodo. Ugotovili smo, da je »*in situ*« metoda priprave metilnih estrov maščobnih kislin primernejša za kvantitativno analizo maščobnih kislin v jajcih.

Uspešno smo razvili in optimizirali metodo za plinski kromatograf, sklopljen z masnim spektrometrom. Optimizirano metodo smo nato uporabili za analizo metilnih estrov maščobnih kislin, pripravljenih iz jajc iz različnih virov.

Ugotovili smo, da je vsebnost nasičenih, enkrat nenasičenih, omega-6 in omega-3 maščobnih kislin odvisna tako od vira, kjer smo jajca kupili in od temperature okolja, kjer smo jajca starali, kot tudi od krmljenja kokoši s piro, navadno in tatarsko ajdo. Temperatura shranjevanja jajc pa ne vpliva na vsa jajca enako. Verjetno ima pri tem pomembno vlogo tudi sama variabilnost med jajci iz iste farme. Krmljenje kokoši s tatarsko ajdo v primerjavi s piro povzroči manjšo količino omega-3 maščobnih kislin v nestarih rumenjaki, po drugi strani pa tudi manjšo količino nasičenih maščobnih kislin. Krmljenje z navadno ajdo ima posledico v povečani količini omega-6 maščobnih kislin v rumenjaku in najmanjši količini enkrat nenasičenih maščobnih kislin, zato je od vseh rastlin, za zdravje najbolj ugodno krmljenje kokoši s tatarsko ajdo. V starih rumenjaki pa se vsebnost in sestava maščobnih kislin spremeni.

Pri analizi vsebnosti maščobnih kislin v svežih domačih in omega-3 obogatenih jajcih smo ugotovili, da so sveža domača jajca bogatejša z vsemi štirimi skupinami maščobnih kislin (nasičenimi, enkrat nenasičenimi, omega-6 in omega-3 maščobnimi kislinami). Najbolj presenetljiva pa je vsebnost omega-3 maščobnih kislin, ki je 2,2-krat večja v svežih domačih jajcih.

6 LITERATURA

1. William J. Stadelman, Owen J. Cotterill: Egg science and technology, Third edition, 1986.
2. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle: Eggs. V: Food Chemistry, 4th revised and extended edition, 2009: 546-557.
3. Vojteh Cestnik: Repetitorij fiziologije domačih živali (7), Fiziologija endokrinega sistema, sinteze mleka in nesenja jajc, Ljubljana 2004.
4. Červek Matjaž: Obogatena jajca in njihov pomen v zdravi prehrani. (<http://www.kgzs-ms.si/slike/ZED05/21Cervek.pdf>, odprto: 05.09.2012)
5. D. J. McNamara in H. S. Thesmar: Eggs. V: Encyclopedia of human nutrition. Vol. 2, 2nd edition ed. Caballero B., Allen L., Prentice A. Amsterdam, 2005: 86-92.
6. Antonija Holcman: Reja kokoši v manjših jatah, Ljubljana: Kmečki glas, 2004.
7. David J. Farrell: The Importance Of Eggs In A Healthy Diet. Poultry international, september 1997: 72-78.
8. David Farrell: The role of poultry in human nutrition. Food and Agriculture organization of the united nations. (<http://www.fao.org/docrep/013/al709e/al709e00.pdf>, odprto: 05.09.2012)
9. A.C. Marshall, A.R. Sams, M.E. Van Elswyk: Oxidative Stability and Sensory Quality of Stored Eggs From Hens Fed 1,5% Menhaden Oil. Journal of Food Science, Vol. 59, No. 3, 1994: 561-563.
10. Cveto Klofutar: Fizikalno-kemijske lastnosti triacilglicerolov. V: Lipidi. 14. Bitenčevi živilski dnevi, 4.-5. junij, Ljubljana, 1992: 11-16.
11. Boyer Rodney; prevajalci Veronika Abram in sod.: Lipidi, biološke membrane in transport. V: Temelji biokemije, Ljubljana: Študentska založba, 2005: 210-237.
12. Sean Francis O'Keefe: Nomenclature and Classification of Lipids. V: Food Lipids, ed. Casimir C. Akoh, David B. Min, Third edition, 2008: 3-35.
13. Salobir Karl: Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, nov 8.-9.; Portorož, 2001: 121-135.

14. Alenka Zvonar: Funkcionalni lipidi kot nutricevtiki in prehranska dopolnila. V: Prehranska dopolnila II, urednika Aleš Obreza, Tomaž Vovk: strokovno izobraževanje, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2010: 32-41.
15. Robert S. Chapkin: Reappraisal of the Essential Fatty Acids. V: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Ching Kuang Chow, 3th edition 2008: 675-692.
16. Sebastjan Filip: Nastanek *trans* izomerov maščobnih kislin med toplotno obdelavo živil. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana 2010.
17. Geza Bruckner: Fatty Acids and Cardiovascular Disease. V: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Ching Kuang Chow, 3th edition 2008: 1061-1084.
18. Joo Y. Lee and Daniel H. Hwang: Dietary Fatty Acids and Eicosanoids. V: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Ching Kuang Chow, 3th edition, 2008: 713-726.
19. J. Edward Hunter: Safety and Health Effects of *Trans* Fatty Acids. V: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Ching Kuang Chow, 3th edition, 2008: 757-790.
20. A. P. Simopoulos: SYMPOSIUM: Role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA. Poultry Science, 79, 2000: 961-970.
21. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies: Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. EFSA Journal 2010, Abstract.
22. T. Seppanen-Laakso, I. Laakso, R. hiltunen: Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. Analytica Chimica Acta 465, 2002: 39-62.
23. <http://www.gmu.edu/depts/SRIF/tutorial/gcd/gc-ms2.htm>, odprto: 08.05.2012.
24. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch: Principles of Instrumental Analysis, 19. poglavje: Atomic Mass Spectrometry, 6th Edition, 2007: 281-302.
25. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch: Principles of Instrumental Analysis, 20. poglavje: Molecular Mass Spectrometry, 6th Edition, 2007: 550-588.

26. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch: Principles of Instrumental Analysis, 27. poglavje: Gas Chromatography, 6th Edition, 2007: 788-815.
27. Lea Lukšič: Antioksidativni potencial pira, navadne ajde in tatarske ajde. Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, 2012.
28. European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 7.0), elektronska verzija: 2.4.22. Composition of fatty acids by GC. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francija.
29. P.W. Park and R.E. Goins: *In Situ* Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. Journal of Food Science, Vol. 59, No. 6, 1994: 1262-1266.
30. Alyssa Hidalgo, Mara Lucisano, Ellena M Cornelli, Carlo Pompet: Evolution of Chemical and Physical Yolk Characteristics during the storage of shell eggs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 44, 1996: 1447-1452.
31. Ke-Shun Liu: Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials. Journal of the American oil chemists' society, Vol. 71, No. 11, 1994: 1179-1187.
32. Ana I. Carrapiso and Carmen Garcia. Development in Lipid Analysis: Some New Extraction Techniques and *in situ* Transesterification. Lipids, Vol. 35, No. 11, 2000: 1167-1177.
33. Robert G. Ackman: Application of Gas-Liquid Chromatography to Lipid Separation and Analysis: Qualitative and Quantitative Analysis. V: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Ching Kuang Chow, 3th edition, 2008: 47-65.
34. F. Guardiola, R. Codony, M. Rafecas, J. Boatella, A. Lopez: Fatty Acid Composition and Nutritional Value of Fresh Eggs, from Large- and Small-Scale Farms. Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 7, 1994: 171-188.
35. Mojca Simčič, Vekoslava Stibilj, Antonija Holcman: Fatty acid composition of eggs produced by the Slovenian autochthonous Styrian hen. Food Chemistry, Vol. 125, 2011: 873-877.

36. Eugeniusz R Grela: Nutrient Composition and Content of Antinutritional Factors in Spelt (*Triticum spelta* L) Cultivars. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 71, 1996: 399-404.
37. G. Bonafaccia, M. Marocchini, I. Kreft: Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. Food Chemistry, Vol. 80, 2003: 9-15.

7 PRILOGA

Preglednica 12: Maščobnokislinska sestava (mg maščobnih kislin/g rumenjaka) v jajčnem rumenjaku – vpliv hranjenja kokoši s piro

Maščobna kislina	PIRA							
	Nestarana jajca				Jajca starana 88 dni			
	Marčevska jajca		Aprilska jajca		Marčevska jajca		Aprilska jajca	
	P3	P4	P1	P2	P5	P6	P7	P8
Tridekanojska kislina (13:0)	0,0028 8	/	/	/	/	/	/	/
Miristoleinska kislina (14:1)	0,0753	0,035 7	/	0,050 2	0,14 0	/	0,110	0,16 0
Miristinska kislina (14:0)	0,310	0,237	0,191	0,191	0,51 9	0,439	0,594	0,56 8
Pentadekanojska kislina (15:0)	0,0033 7	0,046 2	0,038 0	0,048 0	0,11 0	0,082 4	0,134	0,14 2
Palmitoleinska kislina (16:1)	4,28	3,10	1,86	2,90	5,45	5,42	4,86	4,57
Palmitinska kislina (16:0)	33,2	20,9	17,0	14,7	38,5	28,6	42,9	30,3
Cis-10-heptadecenojska kislina (17:1)	/	/	/	0,062 4	/	/	/	/
Heptadekanojska kislina (17:0)	0,125	0,153	0,100	0,089 2	0,37 7	0,324	0,310	0,43 1
γ -linolenska kislina – GLA (18:3)	/	/	0,079 7	/	0,28 4	/	0,258	/
Linolna kislina (18:2)	15,7	8,81	9,99	10,8	21,0	13,1	20,9	16,1
Oleinska kislina (18:1)	1,86	1,40	1,25	1,73	2,52	1,68	3,18	2,57
Elaidinska kislina	4,24	3,10	1,98	2,77	3,99	2,78	5,03	4,08
Stearinska kislina (18:0)	11,2	10,4	6,93	7,34	12,3	10,3	15,7	18,5

Arahidonska kislina (20:4)	4,33	3,19	1,89	2,33	3,47	1,76	5,38	6,00
Eikozapentaenojska kislina – EPK (20:5)	/	/	/	/	/	/	0,243	/
Dihomo- γ -linolenska kislina – DGLA (20:3)	/	0,150	/	/	0,420	0,403	0,448	0,298
Eikozadienojska kislina (20:2)	0,0636	/	0,0389	/	0,168	0,154	/	0,211
Dokozatrienojska kislina (22:3)	0,109	/	/	0,0534	0,166	0,159	0,296	0,163
Arašidna kislina (20:0)	/	/	/	/	/	0,0228	0,0338	/
Dokozaheksaenojska kislina – DHK (22:6)	2,38	3,50	1,28	2,40	3,32	4,57	5,04	6,43
Skupaj vseh maščobnih kislin	77,9	55,1	42,6	45,4	92,7	69,7	105	90,5
Povprečje	66,5		44,0		81,2		97,8	
Skupaj nasičenih MK	44,9	31,8	24,3	22,3	51,8	39,7	59,6	49,9
Povprečje	38,3		23,3		45,8		54,8	
Skupaj enkrat nenasičenih MK	6,22	4,54	3,11	4,74	8,10	7,09	8,15	7,30
Povprečje	5,38		3,93		7,60		7,73	
Skupaj omega-6 MK	4,39	3,34	2,01	2,32	4,34	2,32	6,09	6,51
Povprečje	3,87		2,17		3,33		6,30	
Skupaj omega-3 MK	2,38	3,50	1,28	2,39	3,32	4,57	5,28	6,43
Povprečje	2,94		1,84		3,95		5,86	
Omega-6 / omega-3	1,85	0,954	1,57	0,971	1,31	0,507	1,15	1,01
Povprečje	1,40		1,27		0,909		1,08	

Opomba: / Odsotnost maščobne kisline v vzorcu ali pa količina maščobnih kislin v vzorcu ni dosegla praga kvantifikacije.

Preglednica 13: Maščobnokislinska sestava (mg maščobnih kislin/g rumenjaka) v jajčnem rumenjaku – vpliv hranjenja kokoši z navadno oziroma tatarsko ajdo

Maščobna kislina	NAVADNA AJDA				TATARSKA AJDA			
	Nestarana jajca		Starana jajca		Nestarana jajca		Starana jajca	
	N1	N2	N3	N4	T1	T2	T3	T4
Tridekanojska kislina (13:0)	/	/	/	0,00190	/	/	/	/
Miristoleinska kislina (14:1)	/	0,0393	0,0654	/	/	/	/	/
Miristinska kislina (14:0)	0,207	0,119	0,167	0,192	0,166	0,112	0,174	0,177
Pentadekanojska kislina (15:0)	0,0399	0,0237	0,0402	0,0288	0,0324	/	0,0216	0,0309
Palmitoleinska kislina (16:1)	2,57	1,60	1,85	1,78	1,25	1,11	1,31	1,33
Palmitinska kislina (16:0)	18,8	11,4	13,3	15,8	12,5	9,63	11,1	14,7
Cis-10-heptadecenojska kislina (17:1)	/	/	/	/	0,0623	/	/	/
Heptadekanojska kislina (17:0)	0,117	0,0318	0,111	0,104	0,0866	0,0434	0,0587	0,0805
γ -linolenska kislina – GLA (18:3)	0,0393	/	/	/	/	/	/	/
Linolna kislina (18:2)	5,73	3,69	4,80	5,39	4,06	2,06	2,88	3,57
Oleinska kislina (18:1)	1,23	0,830	1,65	1,20	12,1	5,76	0,748	1,01
Elaidinska kislina	1,94	1,32	2,61	1,90	1,36	0,995	1,17	1,60
Stearinska kislina (18:0)	5,69	3,93	4,11	5,94	3,49	3,38	3,83	5,22
Arahidonska kislina (20:4)	1,87	0,709	1,67	1,49	0,926	0,379	0,639	1,18
Eikozapentaenojska kislina – EPK (20:5)	/	/	/	/	0,0133	/	/	/

Dihomo- γ -linolenska kislina – DGLA (20:3)	/	/	/	/	0,0236	/	/	/
Eikozadienojska kislina (20:2)	/	/	/	/	/	/	/	/
Dokozatrienojska kislina (22:3)	/	/	/	0,0501	/	/	/	0,0291
Arašidna kislina (20:0)	/	/	/	/	/	/	/	/
Dokozaheksaenojska kislina – DHK (22:6)	1,66	0,545	/	1,29	0,720	0,406	0,561	1,89
Dokozadienojska kislina (22:2)	/	/	/	/	/	/	0,0422	/
Eruka kislina (22:1)	/	/	/	/	/	0,0100	/	/
Skupaj vseh maščobnih kislin	39,9	24,2	30,4	35,2	36,8	23,9	22,5	30,8
Povprečje	32,1		32,8		30,4		26,7	
Skupaj nasičenih MK	24,9	15,5	17,8	22,1	16,3	13,2	15,1	20,2
Povprečje	20,2		19,9		14,8		17,7	
Skupaj enkrat nenasičenih MK	3,79	2,47	3,57	2,97	13,4	6,87	2,06	2,33
Povprečje	3,13		3,27		10,1		2,2	
Skupaj omega-6 MK	7,63	4,39	6,48	6,89	4,98	2,44	3,52	4,75
Povprečje	6,01		6,69		3,71		4,14	
Skupaj omega-3 MK	1,66	0,545	/	1,29	0,733	0,406	0,561	1,89
Povprečje	1,10		1,29		0,570		1,23	
Omega-6 / omega-3	4,61	8,06	/	5,35	6,80	6,01	6,28	2,51
Povprečje	6,34		5,35		6,41		4,40	

Opomba: / Odsotnost maščobne kisline v vzorcu ali pa količina maščobnih kislin v vzorcu ni dosegla praga kvantifikacije.

Preglednica 14: Primerjava maščobnokislinske sestave svežega in omega-3 obogatenega jajca

Maščobna kislina	mg maščobnih kislin/g jajca				% posamezne maščobne kisline glede na vse maščobne kisline			
	Sveža domača jajca		Omega-3 obogatena jajca		Sveža domača jajca		Omega-3 obogatena jajca	
	J1	J3	O1	O3	J1	J3	O1	O3
Tridekanojska kislina (13:0)	/	0,0116	/	/	-	0,00908	-	-
Miristoleinska kislina (14:1)	0,0716	0,100	/	0,0354	0,0827	0,0781	-	0,0607
Miristinska kislina (14:0)	0,516	0,807	0,137	0,222	0,596	0,630	0,297	0,380
Pentadekanojska kislina (15:0)	0,140	0,267	0,0401	0,0336	0,162	0,208	0,0872	0,0577
Palmitoleinska kislina (16:1)	3,36	3,48	1,40	2,52	3,88	2,71	3,04	4,32
Palmitinska kislina (16:0)	30,9	40,4	15,1	23,4	35,7	31,5	32,7	40,2
Cis-10-heptadecenojska kislina (17:1)	0,226	0,406	/	/	0,260	0,317	-	-
Heptadekanojska kislina (17:0)	0,365	0,773	0,0977	0,0873	0,422	0,603	0,212	0,150
γ -linolenska kislina – GLA (18:3)	/	0,405	/	0,0440	-	0,316	-	0,0754
Linolna kislina (18:2)	29,5	42,2	14,6	14,6	34,1	32,9	31,8	25,0
Oleinska kislina (18:1)	1,44	2,00	0,720	1,68	1,66	1,56	1,56	2,88
Elaidinska kislina	2,28	3,17	2,42	1,82	2,63	2,47	5,26	3,12
Stearinska kislina(18:0)	8,86	15,2	7,61	8,24	10,2	11,8	16,5	14,1

Arahidonska kislina (20:4)	3,81	9,06	1,33	1,74	4,39	7,07	2,89	2,99
Eikozapentaenojska kislina – EPK (20:5)	0,0150	0,0280	/	/	0,0173	0,0219	-	-
Dihomo- γ -linolenska kislina – DGLA (20:3)	0,283	0,390	/	/	0,327	0,304	-	-
Eikozadienojska kislina (20:2)	0,173	0,227	/	/	0,199	0,177	-	-
Dokozatrienojska kislina (22:3)	0,0639	0,111	/	0,0311	0,0738	0,0866	-	0,0534
Dokozaheksaenojska kislina – DHK (22:6)	4,54	9,20	2,58	3,74	5,24	7,17	5,61	6,42
Eruka kislina (22:1)	/	0,110	/	/	/	/	/	0,189
Skupaj vseh maščobnih kislin	86,6	128	46,0	58,3	100	100	100	100
Povprečje	107		52,2		100		100	
Skupaj nasičenih MK	40,8	57,4	22,9	32,0	47,1	44,8	49,8	54,9
Povprečje	49,1		27,5		46,0		52,4	
Skupaj enkrat nenasičenih MK	5,10	5,98	2,12	4,33	5,89	4,67	4,60	7,43
Povprečje	5,54		3,23		5,28		6,02	
Skupaj omega-6 MK	33,8	52,3	16,0	16,4	39,0	40,8	34,7	28,1
Povprečje	43,1		16,2		39,9		31,4	
Skupaj omega-3 MK	4,56	9,22	2,58	3,74	5,26	7,20	5,61	6,42
Povprečje	6,89		3,16		6,23		6,02	
Omega-6 / omega-3	7,42	5,67	6,18	4,37	7,42	5,67	6,18	4,37
Povprečje	6,55		5,28		6,55		5,28	

Opomba: / Odsotnost maščobne kisline v vzorcu ali pa količina maščobnih kislin v vzorcu ni dosegla praga kvantifikacije.

Priloga: Sestava standardne mešanice F.A.M.E. Mix C4-C24*Certificate of Composition*

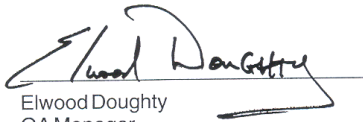
DESCRIPTION: F.A.M.E. Mix C4-C24

CATALOG NO.: 18919-1AMP
LOT NO.: LB-89551MFG. DATE: Jan 2012
EXP. DATE: Jan 2015

ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER	56219-06-8	99.9	2.00	LB87592
CIS-10-PENTADECENOIC ACID METH	90176-52-6	99.0 (a)	2.00	LB84963
LINOLELAIDIC ACID METHYL ESTER	2566-97-4	99.9	2.00	LB67773
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ES	16326-32-2	99.9	2.00	LB85406
METHYL CIS-5,8,11,14-EICOSATET	2566-89-4	99.9	2.00	LB85903
ALL CIS-4,7,10,13,16,19-DOCOSA	2566-90-7	99.2	2.00	LB73438
METHYL CIS-5,8,11,14,17-EICOSA	2734-47-6	99.9	2.00	LB83268
METHYL BUTYRATE	623-42-7	99.9	3.99	LB63798
METHYL HEXANOATE	106-70-7	99.9	3.99	LB78270
METHYL OCTANOATE	111-11-5	99.9	3.99	LB78266
METHYL DECANOATE (CAPRATE)	110-42-9	99.9	4.00	LB80132
METHYL UNDECANOATE	1731-86-8	99.5	2.00	LB79889
METHYL LAURATE	111-82-0	99.8	4.01	LB32645
METHYL TRIDECANOATE	1731-88-0	99.9	2.00	LB79989
METHYL MYRISTATE	124-10-7	99.8	3.99	LB78271
METHYL PENTADECANOATE	7132-64-1	99.9	2.00	LB84181
METHYL PALMITATE	112-39-0	99.8	5.99	LB82986
METHYL HEPTADECANOATE	1731-92-6	99.9	2.00	LB84180
METHYL STEARATE	112-61-8	99.7	4.01	LB83390
METHYL HENEICOSANOATE	6064-90-0	99.4	2.00	LB75382
METHYL BEHENATE	929-77-1	99.6	4.00	LB80162
METHYL TRICOSANOATE	2433-97-8	99.1	2.00	LB78268
METHYL PALMITOLEATE (METHYL CI	1120-25-8	99.5	2.03	LB79596
CIS-9-OLEIC METHYL ESTER	112-62-9	99.9	3.99	LB83428
METHYL LINOLEATE	112-63-0	99.9	2.00	LB85946
METHYL ERUCATE (CIS-13-DOCOSEN	1120-34-9	99.6	2.00	LB43037
METHYL NERVONATE	2733-88-2	97.4	2.05	LB85960
METHYL ARACHIDATE	1120-28-1	99.9	3.99	LB83052
METHYL LIGNOCERATE	2442-49-1	99.9	4.00	LB85855

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(a) Resale Item.

(2) Weight percent of analyte, calculated by using analyte weights. The total may not equal 100% due to rounding. Weight concentrations may not remain stable after opening, even if resealed.
NIST-Traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot.


Elwood Doughty
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.

 **SUPELCO**
Analytical
595 North Harrison Road • Bellefonte, PA
16823-0048 USA • Phone (814) 359-3441

Certificate of Composition

DESCRIPTION: F.A.M.E. Mix C4-C24

CATALOG NO.: 18919-1AMP

MFG. DATE: Jan 2012

LOT NO.: LB-89551

EXP. DATE: Jan 2015

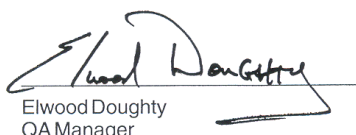
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
TRANS-9-ELAIDIC METHYL ESTER	1937-62-8	99.9	2.00	LB73439
METHYL LINOLENATE	301-00-8	99.9	2.00	LB84165
METHYL EICOSENOATE	2390-09-2	97.8	2.04	LB84595
CIS-10-HEPTADECENOIC ACID METH	75190-82-8	99.9	2.00	LB86712
CIS-11,14-EICOSADIENOIC ACID M	2463-02-7	99.9	2.00	LB81408
CIS-11,14,17-EICOSATRIENOIC AC	55682-88-7	99.9	2.00	LB86027
CIS-8,11,14-EICOSATRIENOIC ACI	21061-10-9	99.9	2.00	LB86226
CIS-13,16-DOCOSADIENOIC ACID M	61012-47-3	99.9	2.00	LB87399

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(a) Resale Item.

(2) Weight percent of analyte, calculated by using analyte weights. The total may not equal 100% due to rounding. Weight concentrations may not remain stable after opening, even if resealed.

NIST-Traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot.


Elwood Doughty
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.


595 North Harrison Road • Bellefonte, PA
16823-0048 USA • Phone (814) 359-3441