Određivanje sadržaja omga-3 masnih kiselina u konzumnim jajima primjenom plinske kormatografije

Dornjak, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:540008

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Luka Dornjak

Određivanje sadržaja omega-3 masnih kiselina u konzumnim jajima primjenom plinske kromatografije

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2018 godina.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za kemiju i Fakultetu agrobiotehničkin znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Zahvala

Zahvaljujem se dr. sc. Manueli Grčević i doc. dr. sc. Oliveri Galović na pomoći u izradi ovoga rada. Zahvaljujem svojoj obitelji bez čije potpore ovaj rad ne bi bio moguć. Zahvaljujem prijateljima koji nisu dopustili da ih kilometri spriječe u potpori.

Sažetak

Jaja se smatraju koncentriranim izvorom hranjivih tvari. U sastavu jaja možemo naći proteine, masti, nezasićene masne kiseline, dobar su izvor vitamina A, D, E i K, a nalazimo i željezo i fosfor. Obogaćivanjem jaja različitim nutrijentima, jaje postaje funkcionalna hrana. Istraživanjem utjecaja omega-3 masnih kiselina na zdravlje ljudi, utvrđen je niz dobrobiti pa se u današnje vrijeme brzog načina života pojavila potreba za proizvodnjom lako dostupnog izvora omega-3 masnih kiselina.

U ovom radu opisan je postupak analize, rezultati i usporedba rezultata analize profila masnih kiselina jaja kokoši nesilica koje su bile hranjene hranom koja nije obogaćena omega-3 masnim kiselinama, i hranom koja je u svom sastavu imala omega-3 masne kiseline, kao bi se utvrdilo utječe li sastav hrane na povećanje sadržaja omega-3 masnih kiselina u jajima.

Ključne riječi: profil masnih kiselina, omega-3 masne kiseline, jaja, funkcionalna hrana, zdravlje ljudi

Abstract

Eggs are considered as an excellent source of nutrients. In the egg composition we can find proteins, fat, unsaturated fatty acids, vitamins A, D, E and K, as well as iron and phosphorus. By enriching eggs with different nutrients, the egg becomes functional food. Investigating the effects of omega-3 fatty acids on human health, a variety of well-being has been identified, so today's fast lifestyle has emerged the need to produce an easily accessible source of omega-3 fatty acid .

This paper describes the process of analysis, results and comparison of the results of the analysis of fatty acid profile of eggs of hens that were fed with non-enriched omega-3 fatty acids food, and food that is rich in omega-3 fatty acids. The study was conductet to determined whether the composition of the food affects the increase of the omega-3 fatty acid content in the eggs.

Keywords: fatty acids profile, omega-3 fatty acids, eggs, functional foods, human health

Sadržaj

1.Uvod....8
2. Literaturni dio....9
2.1. Omega-3 masne kiseline....9
2.2. Sinteza omega-3 masnih kiselina kod biljaka i životinja....10
2.3. Prehrambeni izvori omega-3 masnih kiselina....11
2.4. Utjecaj omega-3 masnih kiselina na ljudski organizam....12
2.4.1. Koronarne bolesti srca....12
2.4.2. Rak....13
2.4.3. Dijabetes....14
2.4.4. Artritis....14
2.5. Utjecaj konzumiranja jaja na zdravlje....15
2.6. Preporučena prehrana....16
2.7. Uloga omega-3 u fetalnom razvoju....16
2.8. Druga fiziološka djelovanja....17
2.9. Obogaćivanje jaja omega-3 masnim kiselinama....18
2.10. Plinska kromatografija....19
2.10.1. Mobilna faza....19
2.10.2 Izbor plina (mobilne faze)....20
2.10.3. Kontrola protoka plina....21
2.10.4. Izvor plina i čistoća....21
2.10.5. Uvodni otvor za uzorak....22
2.10.6. Šprice i prekidački ventili....22
2.10.7. Piroliza....23
2.10.8. Konvencionalni dizajni pećnica....23
2.10.9. Detektori....24
2.10.10. Sustav podataka....25
3. Eksperimentalni dio....26
3.1. Reagensi i pribor....26
3.2. Instrumentacija....27
3.3. Opis metode....28
3.3.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu plinskom kromatografijom....29

3.3.1.1. Ekstrakcija masti 29
3.3.1.2 Priprema metil estera masnih kiselina 31
3.4. Proces analize plinskom kromatografijom 34
3.4.1. Injektiranje uzorka 34
4. Rezultati i rasprava 35
4.1. Rezultati analize standarda 35
4.2. Usporedba kromatograma 40
5. Zaključak 42
6. Literatura 43

1. Uvod

Omega-3 masne kiseline spadaju u skupinu polinezasićenih maslih kiselina čija prva dvostruka veza započinje na trećem ugljikovom atomu. Sama sinteza vrši se pomoću procesa elongacije i desaturacije. Nama važne omega-3 masne kiseline potječu najviše od biljaka dok sami životinjski organizmi rijetko kad mogu sintetizirati potrebne omega-3. Kako bi se u organizam unijele potrebne omega-3 masne kiseline preporučuje se prehrana bogata biljnim i životinjskim podrijetlom kako bi se osigurao normalan i optimalan rad organizma [1].

Mnoga istraživanja se provode o pozitvnim utjecajima omega-3 masnih kiselina na ljudski organizam, te lakši unosi samih omega-3 u svakodnevnom životu čovjeka kako bi se olakšala konzumacija i samim time poboljšalo opće zdravlje populacije.

Svrha ovog rada je utvrditi uspješnost obogaćenja konzumnih jaja omega-3 masnim kiselinama tako što se u hranu koju konzumiraju nesilice uveli optimalnu prehranu kako bi povećali koncentracije omega-3 masnih kiselina u konzumnim jajima.

2. Literaturni dio

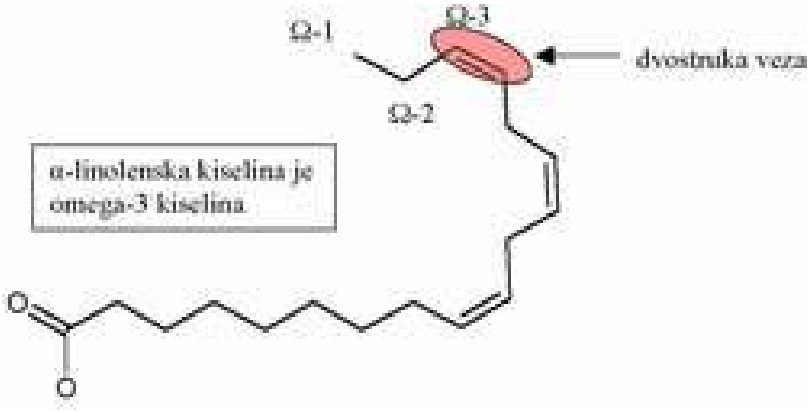
2.1. Omega-3 masne kiseline

Najvažnije polinezasićene masne kiseline su spojevi ravnog lanca koji sadrže 18, 20, 22 ugljikova atoma po molekuli i dva do šest olefinskih centara od kojih je svaki odvojen od sljedeće jednom metilenskom funkcijom. One imaju opću strukturu:

$CH_3(CH_2)xCH=CH[CH_2CH=CH]y(CH_2)zCH_2COOH$ [1]

te su podijeljene u obitelji ovisno o iznosu x. Članovi svake od tih obitelji višestruko nezasićenih masnih kiselina dijeli zajedničku strukturnu značajku na položaju dvostruke veze najbliže krajnjoj metilnoj skupini molekule. Na primjer, za obitelj višestruko nezasićenih masnih kiselina za koje je x = 1, nezasićenost započinje na trećem ugljikovom atomu od metilne krajnje skupine, vidljivo na slici 1. Takve kiseline označavaju se kao omega-3 (također poznate pod imenom n-3) masne kiseline [1]. Masne kiseline koje u svojoj strukturi sadrže kisik, ugljik i vodik dijelimo na zasićene, monozasićene i polizasićene. Ono što određuje fiziološka svojstva masnih kiselina je pozicija dvostruke veze od metil terminalne skupine. Masne kiseline koje označavamo s n-3 imaju prvu dvostruku vezu na trećem ugljikovom atomu, dok n-6 masne kiseline imaju prvu dvostruku vezu na šestom ugljikovom atomu [2]. Kao najbolji primjer možemo uzeti dokosaheksanoičnu kiselinu čiji je opći naziv cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksanoična kiselina što nam govori da kiselina sadržava 22 atoma ugljika i 6 nezasićenih ugljik-ugljik veza.

Polinezasićene masne kiseline se sintetiziraju kombinacijom metaboličkih elongacija i procesa desaturacije počevši od nezasićene kiseline. Odgovarajuća polienska kiselina za sintezu omega-3 masne kiseline je α-linolenska kiselina (eng. *α-linolenic*, ALA) vidljiva na slici 1. Takve metaboličke promjene su iznimno važne u životinjskim organizmima i dovode do sinteze C_{20} i C_{22} polinezasićenih masnih kiselina koje imaju važno nutritivno značenje.



Slika 1. Prikaz dvostrukih veza kod α-linelinske kiseline [3]

2.2. Sinteza omega-3 masnih kiselina kod biljaka i životinja

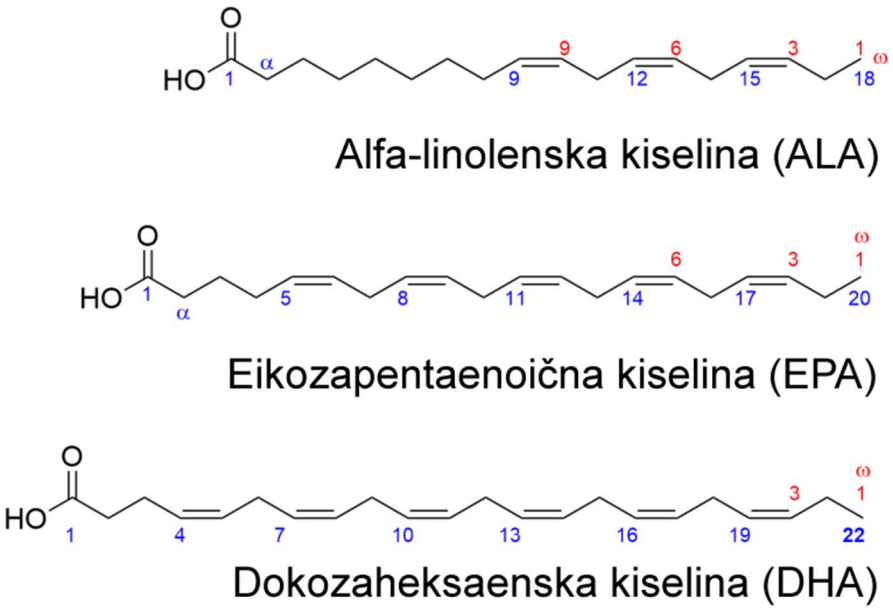
U citoplazmi biljaka, proces desaturacije pretvara oleat u obliku fosfatidikolina u linoleat i pretvara linoleat kao monogalaktozildiacilglicerol derivat u linolenat. Navedene promjene se događaju kroz djelovanje Δ12 i Δ15 desturaze. Desaturaze su enzimi koji uklanjaju vodikove atome s masne kiseline i stvaraju ugljik-ugljik dvostruke veze. Dodane dvostruke veze imaju *cis* konfiguraciju te su u metilen-ometajućoj relaciji u usporedbi s drugim dvostrukim vezama.

Δ6 desaturaza je uobičajena u životinjskim sustavima, ali manje u biljnom svijetu. Međutim, aktivna je u biosintezi γ-linolenske kiseline iz linoleata i stearidonske kiseline iz α-linolenata. C_{20} i C_{22} polieni koji karakteriziraju životinjske organizme (osobito riblje lipide) ili ne postoje u sustavima kopnenih biljaka ili su iznimno rijetke. Jedna od iznimki je biljka Purslane (lat. *Portulaca oleracea)* koja sadrži omega-3 masne kiseline u svim dijelovima biljke.

Važno je prepoznati da životinje ne mogu sintetizirati linoleinsku kiselinu ili α-linolensku kiselinu niti mogu međusobno izmijeniti omega-6 i omega-3. Kod životinja polinezasićene masne kiseline moraju doći iz prehrambenog izvora biljnog porijekla. Dugolančane polinezasićene masne kiseline ulaze u prehrambeni sustav pomoću hrane bogate biljem, dok je kod riba izvor plankton.

Važno pitanje je, mogu li ljudi proizvesti dovoljnu količinu eikozapentaenoične kiseline (eng. *eicosapentaenoic*, EPA) i dokozaheksaenske kiseline (eng. *docosapentaenoic*, DHA) iz dovoljnog unosa α-linolenske kiseline ili se moraju oslanjati na prehranu koja ima dovoljne količine te dvije dugolančane esencijalne omega-3 masne kiseline. To pitanje rezultiralo je u promjenama

preporučene prehrane tako da ona sadrži dovoljne količine EPA/DHA koje su životinjskog podrijetla i ALA koja je isključivo biljnog podrijetla, čije su strukture vidljive na slici 2.



Slika 2. Prikaz EPA/DHA i ALA kiselina [4]

2.3. Prehrambeni izvori omega-3 masnih kiselina

Među biljnim uljima, samo tri sadrže ALA u značajnim količinama. To su: sojino ulje (8% ALA, godišnja proizvodnja od 33,3 milijuna tona), ulje repice/kanola ulje (10%, godišnja proizvodnja od 16,0 milijuna tona), ulje lana (cca.50% ALA, godišnja proizvodnja od 0,6 milijuna tona). Laneno ulje se isključivo koristi u industrijske svrhe te se vrlo mali postotak koristi u kućanstvima, što rezultira u puno većoj zastupljenosti repice i soje u prehrambenoj industriji za obogaćenje dijete s ALA [5].

Dugolančane polinezasićene masne kiseline (EPA/DHA) u ljudskoj prehrani uglavnom se dobivaju prehranom koja sadrži „masne“ ribe ili uzimajući prehrambene dodatke koji su obogaćeni s navedenim kiselinama. Tablica 1 sadrži informacije za „masnu“ ribu koja predstavlja vrijedne izvore EPA/DHA.

Tablica 1. Razine EPA/DHA u odabranim vrstama riba [5]

Riba	Koncentracija (g/100 g tkiva)		
	Mast	**EPA**	**DHA**
Haringa	17,8	2,04	0,68
Sleđica	16,6	1,33	1,90
Tuna	15,5	1,08	2,29
Losos	13,6	0,71	2,15
Sardine u ulju	13,9	1,20	1,24

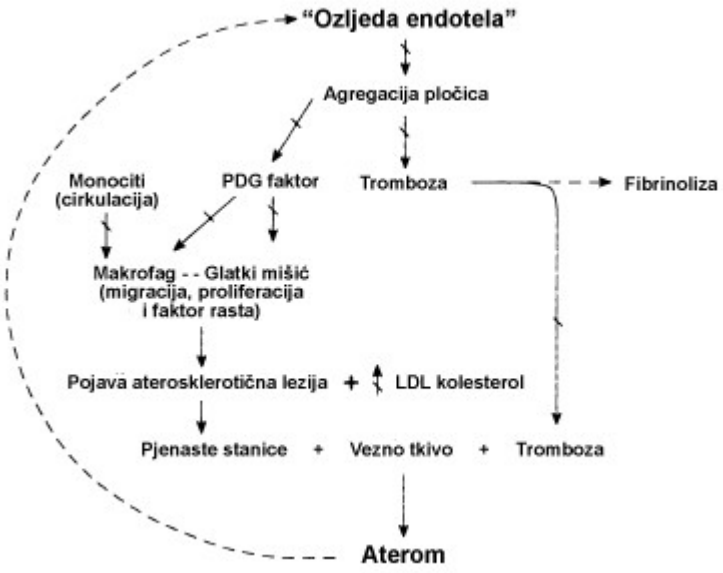
Mnogi prehrambeni proizvodi reklamiraju se kao proizvodi obogaćeni omega-3 masnim kiselinama bez jasnih pokazatelja udjela (koncentracije) ALA te udjela (koncentracije) duglančanih polinezasićenih masnih kiselina. Također, popisi hrane preporučene zbog njenog sadržaja omega-3 masnih kiselina često ne razlikuje između onih koji sadrže C_{18}, C_{20}/C_{22} kiselina, što nam je važan čimbenik ako gledamo pretvorbu odnosno sintezu EPA/DHA iz ALA [5].

2.4. Utjecaj omega-3 masnih kiselina na ljudski organizam

2.4.1. Koronarne bolesti srca

Danas je puno više informacija dostupno o učincima omega-3 masnih kiselina na kardiovaskularni sustav nego što je to za bilo koju drugu bolest. Koronarne bolesti srca su multifaktorske bolesti s genetskim odrednicama koje imaju interakcije s velikim brojem faktora okoliša, uključujući dijetu i druge životne promjene koje pridonose njihovu razvoju. Velik broj ljudi na svijetu pati od koronarnih bolesti srca, no najčešće utječu na stariju populaciju.

Jedan od prvih koraka u formaciji ateroskleroze je nespecifična ozljeda prodjeva nakon čega slijedi akumulacija monocita i makrofaga, formiranje pjene i agregaciju trombocita. Ozljeda dovodi do taloženja kolesterola u stanicama mišića i monocitnih makrofaga u venskim zidovima. Dokazano je da se konzumiranjem omega-3 masnih kiselina spriječava povećanje staničnih komponenata sintetiziranih od strane tih stanica te se upliću i ometaju razne korake u procesu koji bi rezultirao štetom venskih zidova i sl. Na slici 3. vidljiva su moguća mjesta prekida ateroskleroze



Slika 3. Mjesta mogućih prekida ateroskleroze [6]

Same omega-3 masne kiseline neće dovesti do iskorijenjenja ateroskleroze. Međutim, sve je očitije da prehrambena ulja mogu pomoći u prevenciji ateroskleroze ili njegovih tromboznih komplikacija.

2.4.2. Rak

Broj publikacija iz uporabe omega-3 masnih kiselina u istraživanjima raka se povećala eksponencijalno tijekom proteklih 5 godina.

Modeli tumora životinja u kojima je tumor bio izazvan kancerogenima i životinjski modeli s transplantabilnim tumorima (rak dojke, crijeva, prostate) su često istraživana. Rezultati su dosljedno pokazivali da omega-3 masne kiseline odgađaju pojavu tumora i smanjuju brzinu rasta, veličinu i broj tumora. U tim istraživanjima kalorijska ograničenja potenciraju učinke omega-3 masnih kiselina, dok su omega-6 masne kiseline u obliku kukuruznog ulja povećale formiranje, veličinu i broj tumora [6].

Nadalje, studije pokazuju da sastav prehrambenih lipida modificira metabolizam lipida i da visok dijetalni unos omega-3 masnih kiselina spriječava ili odgađa izražavanje neoplazmi.

U drugim istraživanjima koja uključuju ljudske stanice raka dojke u bezdlakim miševima, rezultati pokazuju da miševi hranjeni s omega-3 masnim kiselinama imaju manji broj plućnih metastaza i

smanjenje koncentracije seruma estrogena i prolaktina. Suprotno se dogodilo s miševima hranjenih kukuruznim uljem koji sadrži omega-6 masne kiseline.

2.4.3. Dijabetes

Dijabetes je kronični poremećaj koji uključuje koronarne bolesti srca (KBS) i hipertenziju. Mnoge komplikacije koje se navode mogu se ubrojiti u mikrovaskularne bolesti. Jensen et al provode istraživanja u kojima se ispitanicima daje ulje bakalara na bazi osmotjedne dijete, dok se drugoj grupi daje ulje maslina. Proučavale su se promjene u krvnom tlaku, plazmatskim lipidima i endotelnu propusnost.

Pacijenti koji su primali ulje lososa u svojoj dijeti pokazivali su značajni pad krvnog tlaka i transkapilarnog albumina, dok pacijenti koji su primali maslinovo ulje u svojoj dijeti ne prikazuju skoro nikakve promjene [6].

Ulje lososa povezano je uz znatno povećanje koncentracije HDL (lipoprotini visoke gustoće) u plazmi i značajno smanjenje VLDL (lipoproteini vrlo male gustoće) kolesterola i triglicerida te bez promjene koncentracije LDL (lipoproteini male gustoće).

Jensen et al zaključuju da ulje bakalara ima direktan utjecaj na vaskularnu permeabilnost i na krvni tlak koji je rezultat smanjenja transportiranja lipoproteina u vaskularni zid [6].

2.4.4. Artritis

Osteoartritis možemo opisati kao degenerativnu reumatsku bolest koja se najčešće pojavljuje u zglobovima te je karakteristična kod starije populacije. Čak i s razvojem tehnologije i medicine, ne postoji lijek za artritis, već se najčešće samo liječe simptomi kako bi se olakšao život osobe koja pati od nje. Najveći problem predstavlja samo liječenje, jer iako postoje razni lijekovi koji ublažavaju bol, kod artritisa se pokušava ciljano liječiti pacijenta kako se ne bi utjecalo na druge dijelove organizma. Nažalost i ciljano liječenje često ima nuspojave koje mogu biti ometajuće za svakodnevni život. Zato uvijek pokušavamo pronaći onu terapiju koja ima prihvatljiv omjer učinkovitosti i nuspojava.

Poznato je da eskimi, čija se prehrana isključivo sastoji od konzumiranja mesa i masnoće imaju mnogo nižu stopu kardiovaskularne smrti te je to otkriće započelo niz istraživanja koji su zaključili da je dobar omjer masnih kiselina recept zdrave prehrane [7].

Sam mehanizam djelovanja masnih kiselina, a pogotovo omega-3 masnih kiselina se tek nedavno otkrio. Konzumiranjem omega-3 masnih kiselina mijenja se fluidnost membrane koja utječe na strukturu i funkcioniranje proteina ugrađenih u membranu, uključujući i receptore i ionske kanale. Unutar samog organizma postoji natjecanje između omega-3 i omega-6 masnih kiselina za ugradnju u staničnu membranu [7]. Ugradnjom omega-6 masnih kiselina prevladavaju proupalni medijatori, dok ugradnjom omega-3 masnih kiselina prevladavaju protuupalni medijatori.

Iz gore navedenog zaključka o natjecanju omega-3 i omega-6 masnih kiselina dolazimo do zaključka da obogaćivanjem prehrane s omega-3 masnim kiselinama možemo smanjiti koncentraciju arhidonske kiseline (omega-6) i time spriječiti sintezu proupalnih medijatora u stanici.

2010. izvedeno je kliničko istraživanje na grupi od 25 ljudi. Gdje je polovina grupe primala omega-3 masne kiseline preko infuzije i kasnije prehranom koja je obogaćena ribom, a druga polovina je primala placebo. Već nakon 7, ali i nakon 14 dana je uočeno značajno ublažavanje kliničkih simptoma te poboljšanje kod kontrole upalne aktivnosti kod bolesnika koji su dobivali riblje ulje. Također, naknadna oralna konzumacija ribljeg ulja može produljiti pozitivne učinke sa smanjenjem simptoma upale kod bolesnika s reumatoidnim artritisom [7].

2.5. Utjecaj konzumiranja jaja na zdravlje

U prošlosti smo često povezivali jaja s mnogim nepoželjnim faktorima kod zdravlja zbog visokih koncentracija zasićenih masnih kiselina i kolesterola. No današnja istraživanja otkrivaju da konzumiranje tri jaja na tjednoj bazi koja sadrže dovoljne koncentracije EPA/DHA zapravo pridonose zdravlju samog organizma i ne podižu koncentraciju kolesterola te čak i snižavaju krvni tlak [8]. Druga istraživanja također potvrđuju nedostatak korelacije između koncentracije kolesterola u serumu i prehrane koja uključuje jaja.

2.6. Preporučena prehrana

Omega-3 masne kiseline su dio ljudske prehrane već stoljećima, no razvitkom raznih prehrambenih industrija i raznolikosti u prehrani kod ljudi dovode do nedovoljnih razina omega-3 masnih kiselina u našoj prehrani te povećanja koncentracije omega-6 masnih kiselina. Omjer omega-3 i omega-6 masnih kiselina u organizmu vrlo je važna značajka koja je spomenuta u prijašnjim paragrafima. Kako bi se omega-3 masne kiseline počele konzumirati u većim količinama. FDA (eng. *Food and drug administration*) prepoznaje i preporučuje da 3g/danu morske omega-3 masne kiseline je sigurno za dodatak prehrani, također odobrava dodavanje omega-3 masnih kiselina (točnije EPA i DHA) u razne prehrambene dodatke. Istraživanja su pokazala da mnogi ne mogu podnijeti okus ribe koji je rezultat dodataka koji sadrže omega-3 masne kiseline, te se preporučuje konzumacija hrane koja sadrži omega-3 kao što su tuna ili haringa. Također, ovaj prehrambeni dodatak se posebno preporučuje trudnicama, čak u višim koncentracijama jer omega-3 masne kiseline imaju pozitivan utjecaj na razvoj fetusa o čemu se raspravlja u ranijem paragrafu [9].

2.7. Uloga omega-3 u fetalnom razvoju

Istraživanja kod štakora i rhesus majmuna u slučaju ograničenja omega-3 masnih kiselina u dijetalnoj prehrani (primarno LNA), tijekom trudnoće i laktacije ometa normalnu vizualnu funkciju i može čak i umanjiti sposobnost učenja kod potomaka. Zaključeno je da nedostatak omega-3 masnih kiselina u prehrani tijekom trudnoće kod rhesus majmuna rezultira smanjenjem vida, abnormalnim elektroretinogramima i polidipsiom [10]. Tokom tih istraživanja zaključeno je da sva šteta nanesena nedostatkom omega-3 masnih kiselina nije popravljiva.

Uloga omega-3 masnih kiselina je tek nedavno ispitivana kod ljudske trudnoće. Provedena istraživanja formule koja se često koristi kao zamjena za ljudsko mlijeko te kroz analizu 32 uzorka ustanovili da formula korištena za prehranu ne sadrži AA, EPA, LNA. Priložen je prijedlog da se navedene omega-3 i omega-6 masne kiseline uvedu u prehranu dojenčadi kako ne bi došlo do deficijencije samih tih masnih kiselina.

Može se zaključiti da prehrana kod trudnih žena treba sadržavati dovoljne koncentracije omega-3 masnih kiselina. Nakon poroda, ako se dojenčad hrani pomoću formule, potrebna je formula koja sadrži prijašnje navedene masne kiseline te ne smije imati previsok omjer omega-6/omega-3

masnih kiselina kako ne bi došlo do drugih oštećenja kod dojenčadi. Za bolju sigurnost se preporučuje prirodno dojenje male djece u ranim stadijima razvoja [10].

2.8. Druga fiziološka djelovanja

Posebnim mehanizmom koji je nedavno zabilježen, djelovanja omega-3 masnih kiselina na miokard srca otkriva pozitivna djelovanja na aritmiju srca. Jedna od prvih otkrivenih naznaka je bila povećana srčana varijabilnost kod otkucaja. Također je zabilježeno da EPA i DHA smanjuju otkucaje te povećavaju kapacitet lijeve ventrikule srca što značajno pomaže kod liječenja aritmije. Daljnja istraživanja se provode kod pasa i mačaka kako bi se bolje razumio sam mehanizam i kako ga primijeniti na ljudske organizme [11].

Provodena istraživanja utjecaja omjera omega-6 i omega-3 masnih kiselina na astmu dolaze do zaključka da povećan omjer izaziva povećanje respiratornih neprilika, dok smanjenjem omjera dolazi do poboljšanja djelovanja terapija u čak 40% ispitanika [12]. Sam učinak nam pokazuje da omega-3 može poboljšati djelovanje određenih terapija za astmu kod ispitanika te čak omogućiti smanjenje koncentracija tj. količine terapije što može imati pozitivan učinak ako terapija sama po sebi uzrokuje daljnje nuspojave.

Proučavanjem etil estera eikosapentanoične kiseline (E-EPA) kao dodatka za antidepresivne lijekove pokazali su da omega-3, točnije E-EPA smanjuje Hamilton depresijski rezultat za čak 50% kod nekih ispitanika. Postoje starija istraživanja koja predstavljaju teoriju da omega-3 masne kiseline također utječu na ljudski CFS (eng. *Chronic fatigue syndrome*) serotonin i na same razine masnih kiselina i crvenih krvnih stanica kod ljudi koji pate od depresije. Jedna od najvažnijih poveznica koja se trenutno istražuje je prijedlog da su omega-3 masne kiseline karika koja nedostaje u povezivanju kardiovaskularnih bolesti i depresije [13].

Korištenjem omega-3 masnih kiselina kao dodatka samoj terapiji kod osoba koje pate od bipolarnog poremećaja smanjuje simptome tj. samu remisiju i njezino trajanje. Također, u istraživanjima sve osobe koje su primale omega-3 masne kiseline su davale bolje rezultate nego grupa koja je primala placebo. Učinak nije bio velik, no bio je ipak uočen. Provode se i daljnja istraživanja kako bi se učinak mogao poboljšati [14].

Istraživanja kod starije populacije ukazuju da ne samo omega-3 masne kiseline, već i opća konzumacija morske ribe može dovesti do poboljšanja kognitivnih funkcija te igraju važnu ulogu zaštitnog faktora od poremećaja kao što su demencija i Alzheimerova bolest. Unošenjem prehrane ribom jednom tjedno je pokazalo smanjenje mogućnosti pojave mentalnih poremećaja za čak 60% kroz period od 4 godine. Također je otkriveno smanjenje DHA koji imaju kognitivne poremećaje, no ne pate od demencije [15]. Znanstvenici pokušavaju dokazati da smanjenje razina DHA može biti pokazatelj na rane stadije demencije ili jednostavnu mogućnost razvitka istog kod te osobe.

2.9. Obogaćivanje jaja omega-3 masnim kiselinama

U današnje vrijeme sve je važnija zdrava prehrana. Jedno od popularnih istraživanja je pronalazak alternativnih izvora omega-3 masnih kiselina. Znanstvenici su započeli istraživati mogućnosti obogaćenja raznih svakodnevnih namirnica koje čovjek konzumira s korisnim i zdravim tvarima koje bi koristile čovjeku i ne bi zahtijevale promijene načina ishrane. Jedna od tih metoda je obogaćivanje konzumnih jaja s omega-3 masnim kiselinama.

Raznim istraživanjima došlo se do zaključka da razine masnih kiselina unutar jaja ovise o razinama masnih kiselina u hrani kojom se prehranjuju kokoši nesilice. Taj zaključak nam govori da možemo povećati koncentracije zdravih masnih kiselina u jajima tako što povećamo koncentracije omega-3 polinezasićenih masnih kiselina unutar hrane koja se konzumira kod nesilica [16].

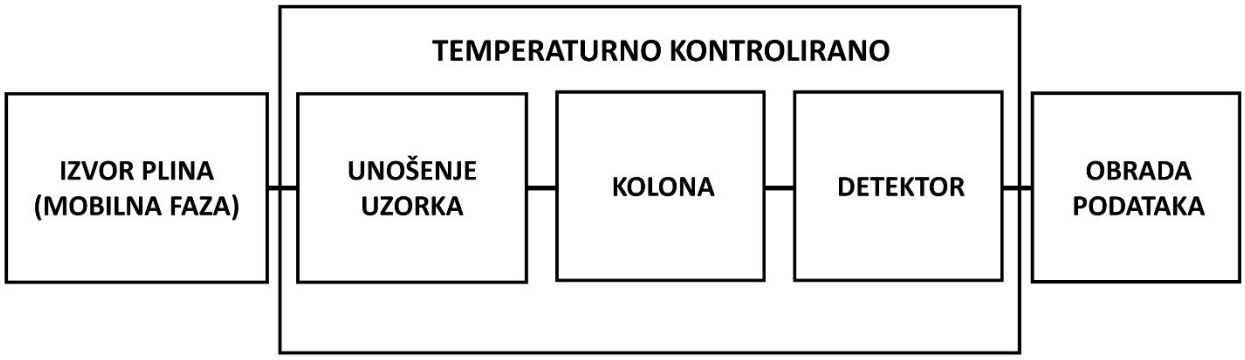
Potrebne omega-3 masne kiseline se najčešće pronalaze u morskim uljima, no druge omega-3 nezasićene masne kiseline se mogu pronaći u sjemenu lana i mikroalgama te se time mogu inkorporirati u prehranu nesilica.

Jedna od važnih omega-3 masnih kiselina je ALA koja se može pronaći u velikim količinama u kloroplastima, što znači da se dodatkom zelene lisnate prehrane kod nesilica osigurava veća koncentracija ALA. Druga važna omega-3 masna kiselina pod imenom DHA se dobiva elongacijom ALA što znači da smo povećanim unosom zelene prehrane kod nesilica povećali i koncentracije dvije važne omega-3 masne kiseline istovremeno [16].

Trenutno se istražuju drugi izvori kako bi se uz ALA i DHA u prehrani povećale i koncentracije EPA kao što su bakterije, fungi, mikroalge i biljke. Nažalost, trenutno nisu pronađeni adekvatni izvori pošto većina organizama koji sadrže EPA trebaju poduže periode inkubacije.

2.10. Plinska kromatografija

Pod ključne dijelove kromatografa nabrajamo: izvor plina koji smatramo mobilnom fazom, ulaz za stavljanje uzorka u stupac, stupac za odvajanje, pećnica koja zagrijava stup, senzor za analizu (također prikazuje prisutnost kemikalija u izljevu) i sustav za obradu podataka koji nam koristi za prikaz i daljnju obradu rezultata. Također postoje dodatni dijelovi koji osiguravaju lakšu kontrolu temperature kroz razne dijelove kromatografa, a ti dijelovi su većinom i nepromijenjeni od izuma kromatografa, iako je tehnologija napredovala i poboljšala neke dijelove. Za primjer poboljšanja napretka tehnologije može se uzeti analogna priroda starih kromatografa koja je zamijenjena sa digitalnim kopijama [17]. Raspored navedenih komponenti kromatografa vidljiva je na slici 4. te je sama konfiguracija gotovo univerzalna kod svih plinskih kromatografa.



Slika 4. Prikaz rasporeda komponenti plinskog kromatografa [17]

2.10.1. Mobilna faza

Mobilna faza ima vrlo važnu ulogu u ukupnom pogledu na plinski kromatograf. Mobilna faza se koristi za transport uzoraka (konstituenata) u stupcu te sam izbor plina koji će imati ulogu mobilne faze je važan izbor. U odabiru mobilne faze se mora paziti na svojstva plina i gledati hoće li odgovarati uzorku koji pokušavamo analizirati, a da s time ne utječe na krajnje rezultate ili usporava sam tijek analize. Izbor plinova za mobilnu fazu za razliku od tekućinske kromatografije je dosta ograničen te se najčešće bazira na samo dva plina (dušik i helij) jer se mijenjanjem plina postiže vrlo mala promjena na koeficijent raspodjele (k) i faktor razdvajanja (a) [17].

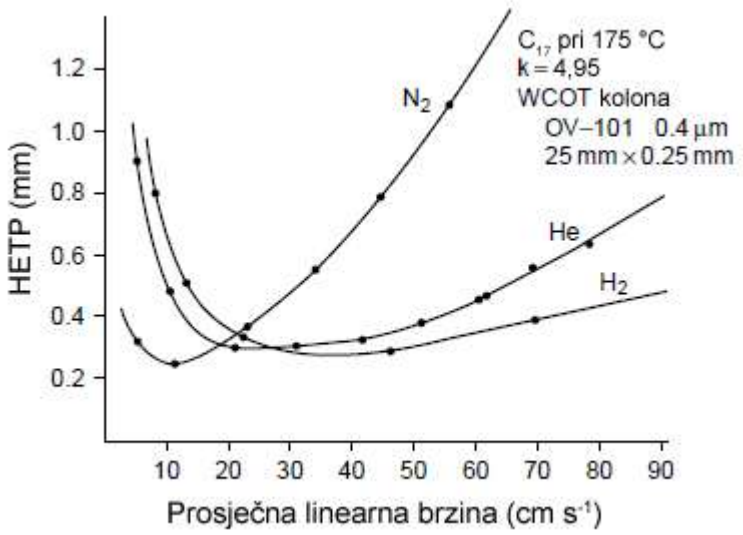
2.10.2 Izbor plina (mobilne faze)

Kao što je navedeno u prijašnjem paragrafu, izbor plina kao mobilne faze je prilično jednostavan. Pošto se najčešće koriste dva plina, a to su dušik i helij, izbor zapravo ovisi o svojstvima plina i samog uzorka kojeg želimo analizirati. Također se mora obratiti pozornost na ekonomičnost samih plinova tj. koliko će sama analiza koštati kod jednog i drugog plina te izabrati onaj koji će nam dati dovoljno točne rezultate s manjom cijenom. Međutim, osim cijene mora se gledati i sama učinkovitost stupca. Učinkovitost samog stupca igra važnu ulogu izbora mobilne faze kod plinske kromatografije. Učinkovitost stupca sadrži pojam longitudionalnog širenja u mobilnoj fazi (transportnom plinu) koji je dan terminom „Dg“ u Van Deemter jednadžbi (1). Izraz je proporcionalan korijenu molarne mase mobilne faze [17] sam izraz glasi:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \qquad (1)$$

Gdje je: H = visina ploče, A = izraz difuzije, B = longitudionalni difuzijski izraz, u = linearna brzina, C = koeficijent otpora masnom prijenosu [18],

a proporcinalnost je vidljiva na slici 5. može se ustanoviti da je dušik daje bolje rezultate prema navedenoj relaciji. Također prema slici se može zaključiti da helij prikazuje dovoljno visoku učinkovitost pri dovoljno visokim brzinama, te je Van Deemeter krivulja za dušik relativno uska u usporedbi s helijem. Može se zaključiti da se dovoljna točnost može postići korištenjem helija pri brzinama na 50-60 cm s^{-1} u usporedbi sa dušikom pri brzinama od 10 cm s^{-1}. Praktična posljedica je da se troškovi plinskog kromatografa smanjuju kada se uračuna brzina analize korištenjem helija umjesto dušik [19].



Slika 5. Komparativna učinkovitost odvajanja u odnosu na stupac kolone [19]

2.10.3. Kontrola protoka plina

Jedan od najvećih problema je kompresibilnost mobilne faze tj. plina te njegov utjecaj na sam rezultat prilikom analize. Utjecaj faze postaje kritičan pri visokim temperaturama cca. 200˚C te se moraju poduzimati mjere kako bi se utjecaj mobilne faze na rezultat smanjio. Povećanjem temperature mobilne faze koja ima konstantan tlak, ima utjecaj na protok plina u koloni tj. smanjuje ga zbog povećane viskoznosti mobilne faze prema proporcionalnom, ali nelinearnom odnosu. Kako bi se izbjegao navedeni utjecaj protok se mora održavati konstantnim, što se postiže s prolaskom plina kroz nekoliko mjerača protoka mase koji imaju ulazne i izlazne otvore te su podesivi na temelju razlike u tlaku. Moderna tehnologija omogućila je komercijalizaciju programiranog protoka što omogućuje reprodukciju tlaka u pokušajima reprodukcije same analize [19].

2.10.4. Izvor plina i čistoća

Kao izvor plina tj. mobilne faze kod plinske kromatografije koristimo cilindar pod tlakom ili plin u boci (sadrži ventile za regulaciju tlaka u dva stupnja) jer su lako isporučivi. Plinovi u boci se najčešće koriste kod plinske kromatografije, iako zbog lakše dostupnosti generatora dušika (zrak i vodik) sve više zamjenjuju plinske boce jer imaju veće sigurnosne mjere. Sam izvor plina može se zanemariti ako čistoća plina unutar boce ili generatora nije dovoljna. Čistoća mobilne faze igra

važnu ulogu kod analize. Ako mobilna faza sadrži razne nečistoće može utjecati na reproducibilnost i same rezultate analize. Čimbenik koji najviše utječe na rezultate tj. samu analizu je vlaga jer ju većina stupaca ne tolerira pri temperaturama koje nadmašuju 100˚C. Kako bi se izbjegla vlaga u mobilnoj fazi koriste se molekularna sita [19]. U dodatku se također mogu koristiti zamke koje smanjuju ili uklanjaju ugljikovodik i kisik iz nosača plina.

2.10.5. Uvodni otvor za uzorak

Uvođenjem uzorka u stupac kromatografa započinje sam proces analize. Kako bi rezultati analize bili reproducibilni tj. kako bi se mogli provjeriti rezultati u drugim laboratorijima, proces kromatografske analize se mora provoditi bez smetnji i utjecaja vanjskih čimbenika na analizu, također mobilna faza ne smije imati utjecaj na tijek analize kao što je navedeno u prijašnjem paragrafu te uvjeti tokom analize moraju biti stalni (temperatura i tlak) kako bi se što lakše analiza ponovila i dobili rezultati [19].

2.10.6. Šprice i prekidački ventili

Najpovoljnija metoda dostavljanja uzroka unutar kolone za analizu je pomoću mikrolitarske šprice sa iglom. Taj postupak nam omogućava dostavu uzorka bez ugrožavanja stabilnosti i strukture plastične membrane. Jedan od čimbenika koji se mora smatrati kod dodavanja uzorka jest sama izdržljivost membrane, koja kao i svaki dio aparata ima svoj vijek trajanja (cca. 30 ubrizgavanja) te moramo zamijeniti kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka i stupca tokom dodavanja. Također u obzir moramo uzeti i čistoću samog plina koja može izazvati stvaranje *„ghost“* vrhova koje ometaju analizu i preglednost kromatograma.

Jednu od komplikacija nam predstavlja samo dostavljanje uzorka u kolonu, tj. njegovo ometanje konstantnog protoka plina unutar kolone što može dovesti do promjene tlaka i utjecaja na rezultate i reproducibilnosti analize. Taj problem se zaobilazi dodavanjem preciznih prekidačkih ventila koji dopuštaju polagano dostavljanje uzorka u stalni tok plina ne mijenjajući njegov tok i tlak i koristeći se petljom u koju se dostavlja uzorak te prolaskom uzorka kroz seriju ventila, uzorak se propušta u mobilnu fazu [19]. Navedeni ventili se mogu kontrolirati digitalno tj. omogućuje puno preciznije dostavljanje uzorka iz razloga što računalo može puno brže upravljati, računati i dostaviti uzorak nego čovjek.

2.10.7. Piroliza

Jedna od nama važnih metoda koja se rutinski primjenjuje u materijalnim znanostima je uzorkovna piroliza. Proces u kojemu se uzorak zagrijava do točke toplinske razgradnje na način koji nam omogućava visoku reproducibilnost. Pri temperaturama višima od 600˚C dolazi do raspadanja sintetičkih polimera na vrlo male molekularne težine, pružajući nam stabilne tvari koje omogućuju stvaranje kromatografskih profila koji su jedinstveni za određene materijale. Dostupnost takvog injektora nam omogućava analize čvrstih uzoraka plinskom kromatografijom koji inače ne bi bili smatrani pogodnim za ovu vrstu kromatografije [19]. Metode pirolize se često uvode kao standardi za analizu plastike i sličnih polimera.

2.10.8. Konvencionalni dizajni pećnica

Kako bi se analiza pomoću plinske kromatografije mogla započeti, uzorak se mora prvo pretvoriti u plin te održavati u tom stanju tokom analize. Kako bi se postigao taj cilj većina plinskih kromatografa je opremljena s pećima koje se koriste za zagrijavanje uzorka do potrebne temperature kako bi se uzorak pretvorio u plin. Najčešće peći unutar plinskih kromatografa mogu postići temperaturu od 40 do 350˚C. U prošlosti su se najčešće koristile izotermne peći, no razvitak tehnologije dovodi do zamjene izotermnih peći s onima koje se mogu programirati kako bi omogućile odvajanje kemikalija u velikom rasponu tokom samo jedne analize. Sami dijelovi peći se nisu previše promijenili od samog početka te se sastoje od žice koja djeluje kao otpornik (žičana zavojnica) koja se koristi za zagrijavanje unutrašnjosti peći, ventilator koji služi kako bi se toplina širila jednoliko i idealno u svakom smjeru, električni motor koji pokreće ventilator. Termoelement unutar pećnice regulira temperaturu peći tako što detektira količinu topline oslobođene od strane grijača (zavojnice) [19]. Unutar peći se nastoje stvoriti idealni uvjeti tj. izotermalni uvjeti koji ne dopuštaju pojavljivanje nejednakosti topline u raznim područjima peći te osiguravaju reproducibilnost analize i istovremeno se koriste za procjenu kvalitete same peći. Dok gradijenti od nekoliko stupnjeva postoje i u najbolje dizajniranim pećima, gradijenti koji prelaze više od nekoliko stupnjeva ukazuju na loše dizajniranu peć.

2.10.9. Detektori

Jedni od važnijih elemenata plinske kromatografije su razni detektori koji se nalaze u koloni gdje se vrši karakterizacija sastava mobilne faze tj. dodanog uzorka. Postoji velik broj raznih senzora koji se mogu staviti u plinski kromatograf, no nama najpoznatiji su: plameno ionizacijski detektor (eng. *Flame ionisation detector*, FID), detektori toplinske vodljivosti (eng. *Thermal Conductivity Detector,* TCD) i detektori apsorpcije elektrona (eng. *Electron Capture Detector*, ECD). Detektori koje rjeđe pronalazimo u plinskim kromatografima, no komericalno su dostupni su: fotoionizacijski detektori (eng. *Photoionization detector*, PID), dušik-fosfor detektori (eng. *Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD) i detektori atomske emisije. Razvojem tehnologije kroz godine osmišljeni su drugi razni detektori, no nisu uspjeli prevladati u usporedbi s FID,TCD i ECD. Temeljna zadaća FID detektora je praćenje formiranja plinovitih iona od strane organskih molekula izgaranih u vodik-zrak plamenu; TCD se temelji na promjenama u apsorpcijskim svojstvima ispusnog plina; ECD se temelji na privlačenju i oduzimanju termaliziranih elektrona. Svi navedeni detektori svakim danom napreduju zbog neumorljivih konvencija i istraživanja kako bi se poboljšala učinkovitost samih detektora [19].

Kada se otkrilo da mnogi laboratoriji kojima je potreban maseno selektivni detektor (MSD) ne mogu priuštiti kupnju navedenih detektora i njihovo održavanje, proizvođači su započeli s proizvodnjom robusnijih i jeftinijih verzija spektrometara kako bi ih mogli koristiti uz plinske kromatografe kao odlične detektor. Taj razvoj u kombinaciji poznavajući činjenicu da je analitička točnost najbolja s masenim spektrometrima kao detektorima, rezultira u općoj dostupnosti kombinacije plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC/MS). Koristeći se tom kombinacijom, možemo dobiti maseni spektar u fiksnim intervalima od cca. 0.1 tijekom analize. Ta metoda nam omogućuje stvaranje masenog spektra za svaki vrh na kromatografu te njegova ramena i osnovica. Niti jedan drugi detektor ne može pružiti jednake rezultate i količine podataka kao kombinacija GC/MS. Kako bi se GC/MS metoda dalje poboljšala možemo koristiti "*single ion monitoring"* metodu koja daje mogućnost detektiranja jakosti jednog ili nekolicine iona. Jedna od revolucija prošlog stoljeća je dodatak tj. primjena stolnih računala kako bi se kontrolirala instrumentacija, a posebice za prikupljanje i rukovanje samim rezultatima.

2.10.10. Sustav podataka

Razvitkom kromatografskih metoda do danas, način bilježenja i obrade podataka se temeljno promijenio. Kroz stoljeća razvijanjem tehnologije smo sve više olakšavali postupke spremanja, obrade i pregleda podataka. Uvođenjem računala i ekrana na dodir ugrađenih izravno u aparat temeljito smo promijenili sistem kromatografije dopuštajući nam dobivanje puno boljih rezultata i s dodavanjem *hardware* i s*oftware*- u današnje kromatograme. U najvećoj mjeri promjenu donosi *software* koji nam omogućava automatsko prikazivanje rezultata tj. izvješća koja se generiraju prema standardnim formatima izvješćivanja. Sve to može biti ekonomski integrirano u kontrolu i menadžment aparata putem računala i postoji kao opcija kod većine današnjih kromatograma [19].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Reagensi i pribor

- konc. klorovodična kiselina (Carlo Erba, Francuska)
- etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- dietil eter (Carlo Erba, Francuska)
- petrol eter (J.T.Baker, Njemačka)
- natrijev hidroksid (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- borov trifluorid, 14 % otopina (Acros Organics, Belgija)
- n-Heksan (Carlo Erba, Francuska)
- natrijev klorid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- bezvodni natrijev sulfat (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Pribor

- Erlenmeyerova tikvica, 100 mL
- tikvica okruglog dna, 25 mL
- hladilo
- kuhalo
- vodena kupelj
- male bočice s čepom
- vialice
- mikropipeta
- pipeta (10 mL, 4 mL)

3.2. Instrumentacija



Slika 6. Analitička vaga (KERN, Njemačka)



Slika 7: Rotacijski uparivač [20]



Slika 8 : Plinski kromatogarf (Burker 430)

3.3. Opis metode

Određivanje količine zasićenih i nezasićenih masnih kiselina se tradicionalno provodi postupkom poznatim kao FAME (eng. *Fatty acid methyl ester analasys*). Masnoća se izvlači iz uzorka pomoću ekstrakcije hladnim otapalom u otapalima kao što su DCM (diklormetan) ili druga otapala osnovi nafte. Ekstrakti se osuše i derivatiziraju kako bi se formirali metil esteri masnih kiselina, korištenjem (otrovnih) reagensa kao što su borov triflorid. Proces je po svojoj prirodi dosta dug i opasan [21].

3.3.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu plinskom kromatografijom

Samu pripremu uzorka za analizu plinskom kromatografjom možemo podijeliti u dva dijela:

1. Ekstrakcija masti
2. Priprema metil estera masnih kiselina

3.3.1.1. Ekstrakcija masti

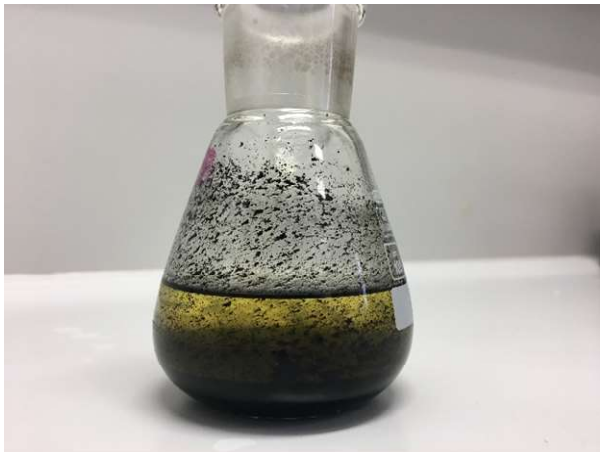
Jaje koje je namijenjeno za analizu potrebno je odvojiti na žumanjak i bjelanjak. Proces se radi ručno i oprezno kako ne bi došlo do miješanja dva dijela i dobivanja pogriješnih rezultata zbog nečistoće uzroka. Nakon što smo odvojili žumanjak i bjelanjka, žumanjak posušimo pomoću papirnatog ručnika te prenosimo u čistu staklenu čašu. U Erlenmayerovu tikvicu se pomoću analitičke vage odvaže 3 g uzorka žumanjka. U istu Erlenemayerovu tikvicu koja sadržava žumanjak dodajemo 8 mL koncentrirane HCl te smjesu zagrijavamo na vodenoj kupelji tijekom jednog sata vidljivo na slici 9.



Slika 9. Zagrijavanje otopine žumanjka i HCl na vodenoj kupelji.

Nakon što se smjesa ohladi na sobnu temperaturu, dodajemo 7 mL etanola te promiješamo otopinu. Zatim dodajemo 25 mL dietil etera i smjesu snažno miješamo 1 minutu kako bi se

cijela smjesa homogeno izmiješala, dodamo 25 mL petrol etera te smjesu ponovno snažno promiješamo. Nakon što se smjesa dobro izmiješala, ostavljamo ju na ravnoj površini kako bi se slojevi potrebni za analizu polagano odvojili (Slika 10).



Slika 10: Izgled uzorka nakon dodavanja etanola, dietil etera i petrol etera.

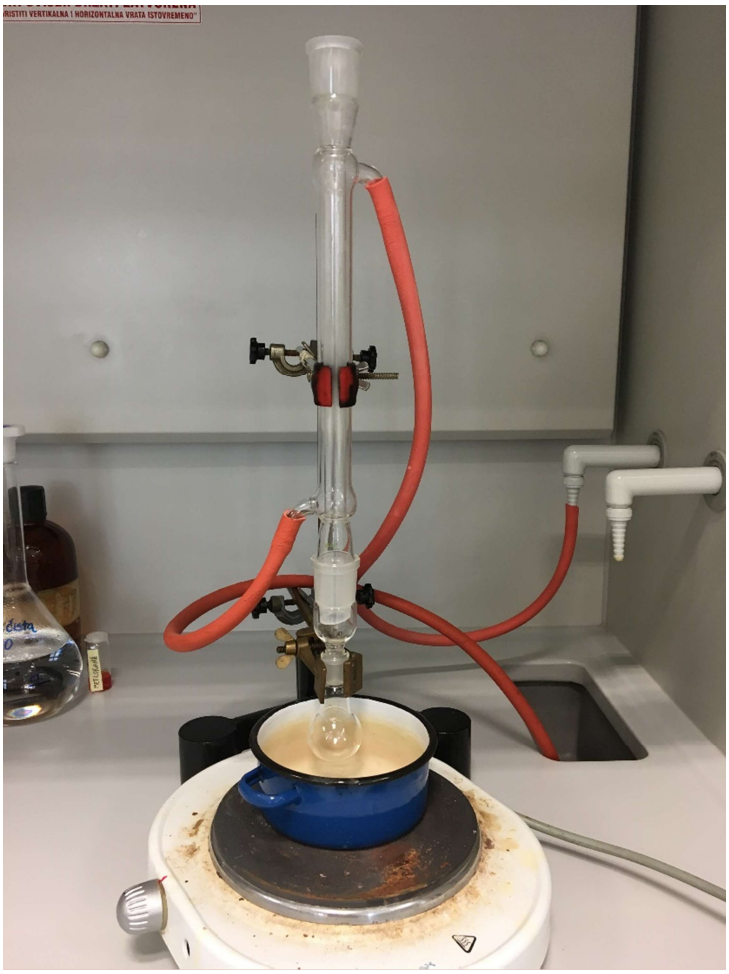
Za daljnju analizu u tikvicu okrugla dna prenosimo 20% organske faze (sloja). Prenesena organska faza u okrugloj tikvici se stavlja na rotacijski uparivač kako bi uklonili otapala, odnosno dok se ne dobije uljni ostatak (uparavanje do masnih kapljica) vidljivo na slici 11.



Slika 11. Uparivanje otapala iz otopine do uljnog ostatka.

3.3.1.2 Priprema metil estera masnih kiselina

U tikvicu s uljnim ostatkom dodamo 4 mL otopine NaOH u metanolu c = 0,5 mol dm^{-3} i smjesa se zagrijava uz refluks sve dok ne nastanu masne kapljice, aparatura vidljiva na slici 12. Zatim dodajemo 4 mL 14% otopine BF_3 u metanolu i zagrijavamo 3 minute. Pri završetku zagrijavanja dodajemo 4 mL otopine n-heksana i zagrijavamo smjesu 1 minutu.



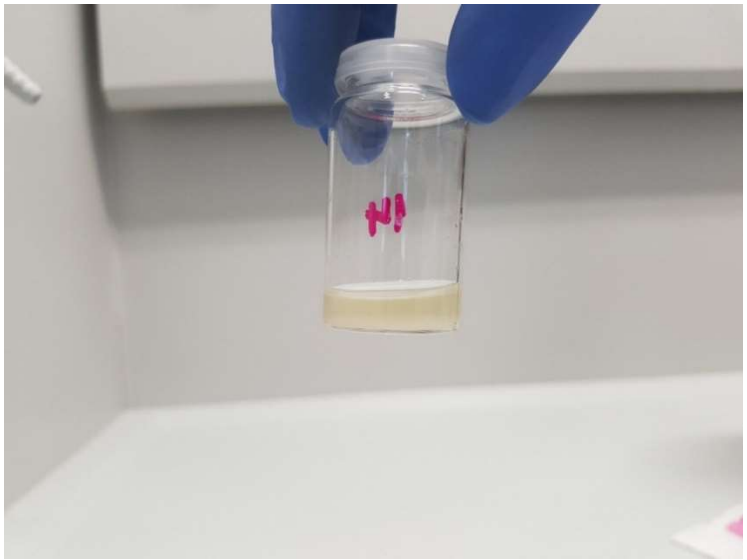
Slika 12. Refluks aparatura.

Reakcijska smjesa se makne sa refluks aparature i ostavi da se ohladi na sobnu temperaturu. U smjesu dodajemo 15 mL zasićene otopine NaCl i dobro se promiješa. Ostavljamo da se slojevi odjele. Kada se slojevi u potpunosti odijele, u tikvicu dodjemo još zasićene otopine NaCl (sve dok organski sloj ne dođe do grla tikvice) vidljivo na slici 13.



Slika 13. Odvajanje faza dodavanjem zasićene otopine NaCl (gornji sloj predstavlja organsku fazu).

Organski sloj iz tikvice prenosimo u čistu posudu u koju se stavlja žličica bezvodnog Na_2SO_4 kako bi se uklonila zaostala voda. Kada je Na_2SO_4 postao sipak, pažljivo, pomoću mikropipete, uzimamo organski sloj (gornji) i prenosimo ga u vialicu koju začepimo slika 14. Uzorak vidljiv na slici 15. je sada spreman za analizu na plinskom kromatografu.



Slika 14. Uklanjanje ostatka vode iz uzorka pomoću bezvodnog Na_2SO_4.



Slika 15. Uzorak spreman za analizu plinskom kromatografijom

3.4. Proces analize plinskom kromatografijom

Prije nego se radi analiza uzoraka jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama, potrebno je napraviti analizu standarda (u standardu imamo sve masne kiseline koje želimo analizirati, tako da uzorke imamo s čime usporediti, standard kroz GC prolazi jednom i on nam služi za usporedbu), nakon toga na analizu idu realni uzorci

Kao plin nosač u provedenom eksperimentu korišten je helij, protok je 25 mL/min. Korištena kolona je Rastek Famewax (30 m, 0.32 mm, 0.25 μm). Split je iznosio 50:1, detektor: plameno ionizacijski detektor, dok je vrijeme analize bilo 50 minuta.

3.4.1. Injektiranje uzorka

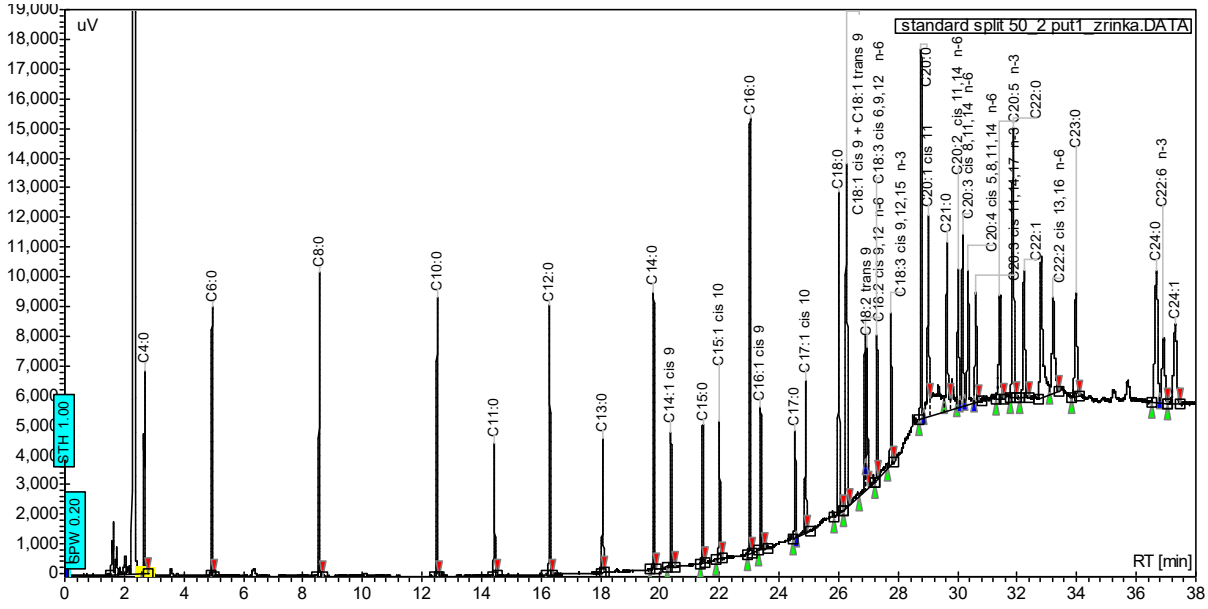
Injekciju je potrebno tri puta isprati s heksanom te tri puta sa otopinom uzorka. Ubrizgati 1 μl uzorka, ukloniti injekciju iz ulaza za uzorak te pritisnuti „start“. Dobiveni kromatogram se dalje analizira.

4. Rezultati i rasprava

Svi uzorci korišteni u analizi pripremljeni su prema ranije napisanom postupku.

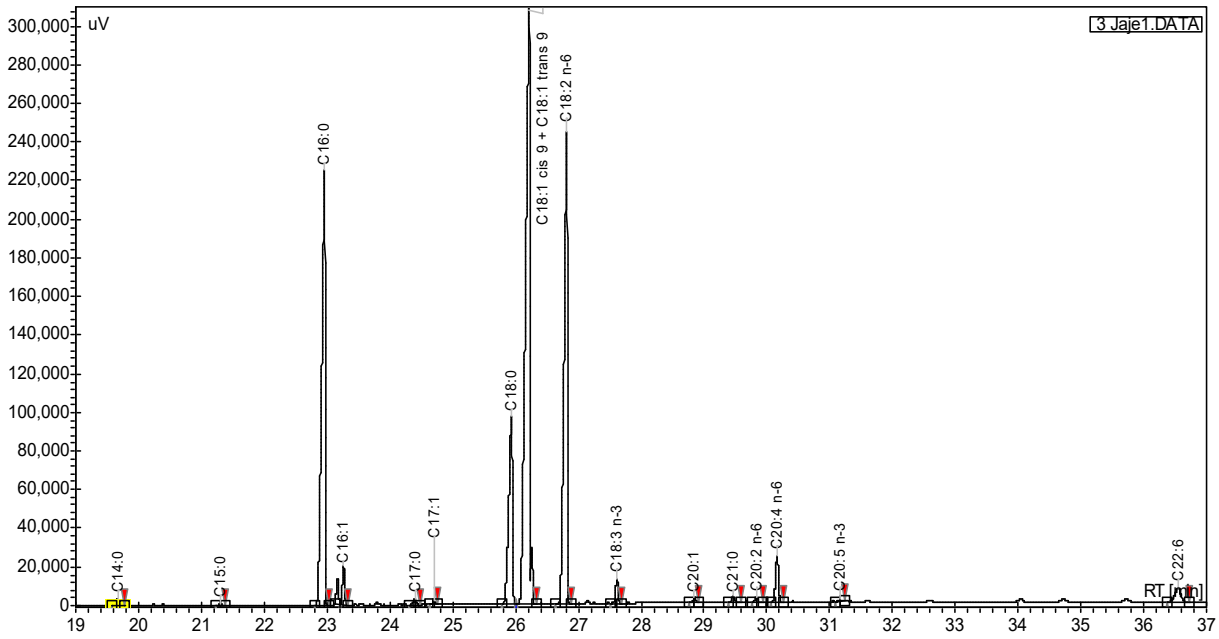
4.1 . Rezultati analize standarda

Slika 17. prikazuje kromatogram standara u kojem se nalazi niz najčešćih masnih kiselina. Standard nam omogućuje identifikaciju vrhova kromatograma realnih uzoraka kao i određivanje njihove koncentracije.



Slika 16. Kromatogram standarda korištenog za analizu

Slika 17. prikazuje kromatogram uzroka jaja nesilice koju se hranilo hranom koja nije obogaćena omega-3 masnim kiselinama.



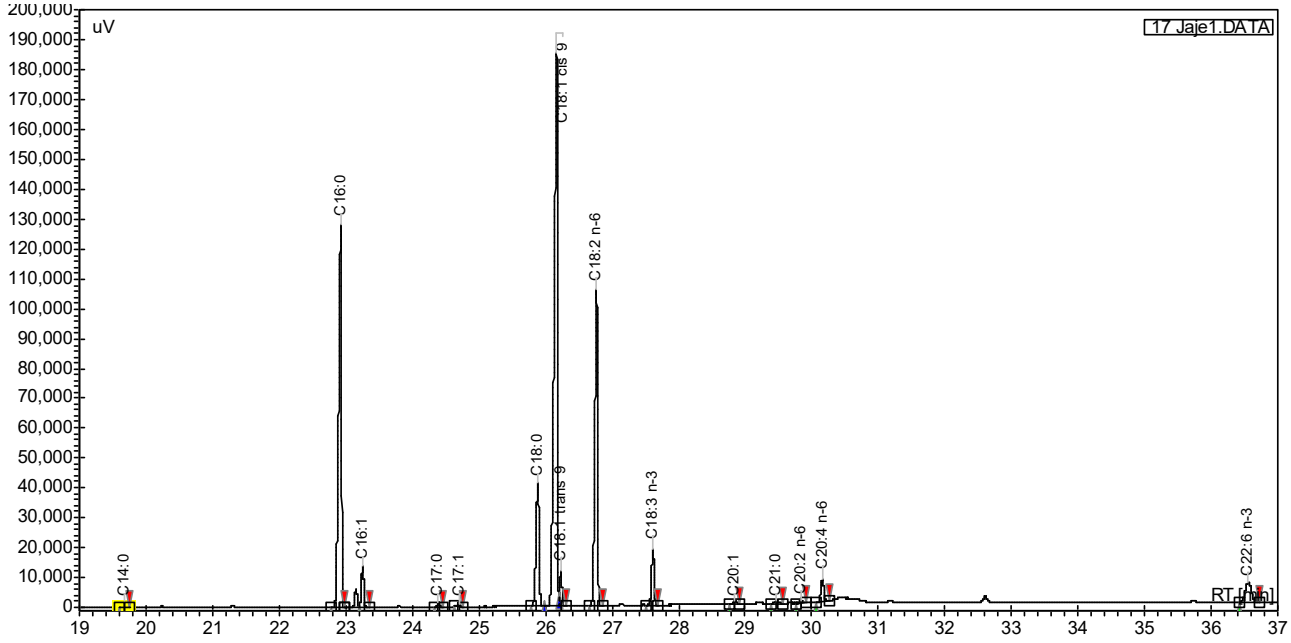
Slika 17. Kromatogram uzorka jaja nesilice koja nije hranjena hranom obogaćenom omega-3 masnim kiselinama.

U tablici 2. vidimo rezultate analize jaja nesilice koja nije hranjena hranom obogaćenom omega-3 masnim kiselinama. Promatrajući postotak masnih kiselina, vidimo da je od omega-3 masnih kiselina α-linolenska kiselina (ALA) zastupljena sa 0,91 %, eikozapentaenoična kiselina (EPA) zastupljena ja sa 0,84% dok je dokozaheksaenska kiselina (DHA) najviše zastupljena s 1,22 %

Tablica 2. Analiza koncentracija masnih kiselina u jajetu nesilice koja nije hranjena hranom obogaćenom omega-3 masnim kiselinama

#	ime	Vrijeme [Min]	ukupne FAME	% FAME	faktor	FA	%FA	**mg FA/100 g jaja**	naziv
1	C14:0	19.66	160.2	0.252	0.942134	0.237418	0.24946	**15.736**	miristinska kiselina
2	C15:0	21.3	35.5	0.056	0.945299	0.052937	0.055622	**3.509**	pentadekanska kiselina
3	C16:0	22.96	13987.4	21.974	0.948136	20.83434	21.89107	**1380.889**	palmitinska kiselina
4	C16:1	23.26	821.4	1.29	0.94775	1.222598	1.284608	**81.033**	palmitoleinska kiselina
5	C17:0	24.4	154	0.242	0.950694	0.230068	0.241737	**15.249**	heptadekanska kiselina
6	C17:1	24.7	83.7	0.131	0.950344	0.124495	0.13081	**8.251**	cis-10-heptadekanska kiselina
7	C18:0	25.93	6596.7	10.363	0.95301	9.876043	10.37696	**654.579**	stearinska kiselina
8	C18:1 cis 9 + C18:1 trans 9	26.22	24427.4	38.375	0.952693	36.55959	38.41392	**2423.150**	oleinska kiselina + elaidična kiselina
9	C18:2 n-6	26.81	14326.8	22.507	0.952372	21.43504	22.52223	**1420.702**	linolna kiselina
10	C18:3 n-3	27.61	578.6	0.909	0.952047	0.865411	0.909305	**57.359**	α-linolenska (ALA)kiselina
11	C20:1	28.85	128.9	0.202	0.956782	0.19327	0.203073	**12.810**	cis-11-eikozenska kiselina
12	C21:0	29.47	149.6	0.235	0.958816	0.225322	0.23675	**14.934**	heneikozanoična kiselina
13	C20:2 n-6	29.84	113.1	0.178	0.956514	0.170259	0.178895	**11.285**	eikozadienska kiselina
14	C20:4 n-6	30.17	1266.5	1.99	0.955968	1.902376	1.998866	**126.088**	arahidonska kiselina
15	C20:5 n-3	31.16	53.3	0.084	0.95569	0.080278	0.08435	**5.321**	eikozapentaenoična (EPA) kiselina
16	C22:6 n-3	36.55	771.9	1.213	0.95906	1.16334	1.222345	**77.106**	dokozaheksaenska (DHA) kiselina
						95.17278	100		
∑			63654.9	100					

Slika 18. prikazuje kromatogram uzorka jaja nesilice čija je hrana bila obogaćena omega-3 masnim kiselinama



Slika 18. Kromatogram uzorka jaja nesilice koja je hranjena hranom obogaćenom omega-3 masnim kiselinama .

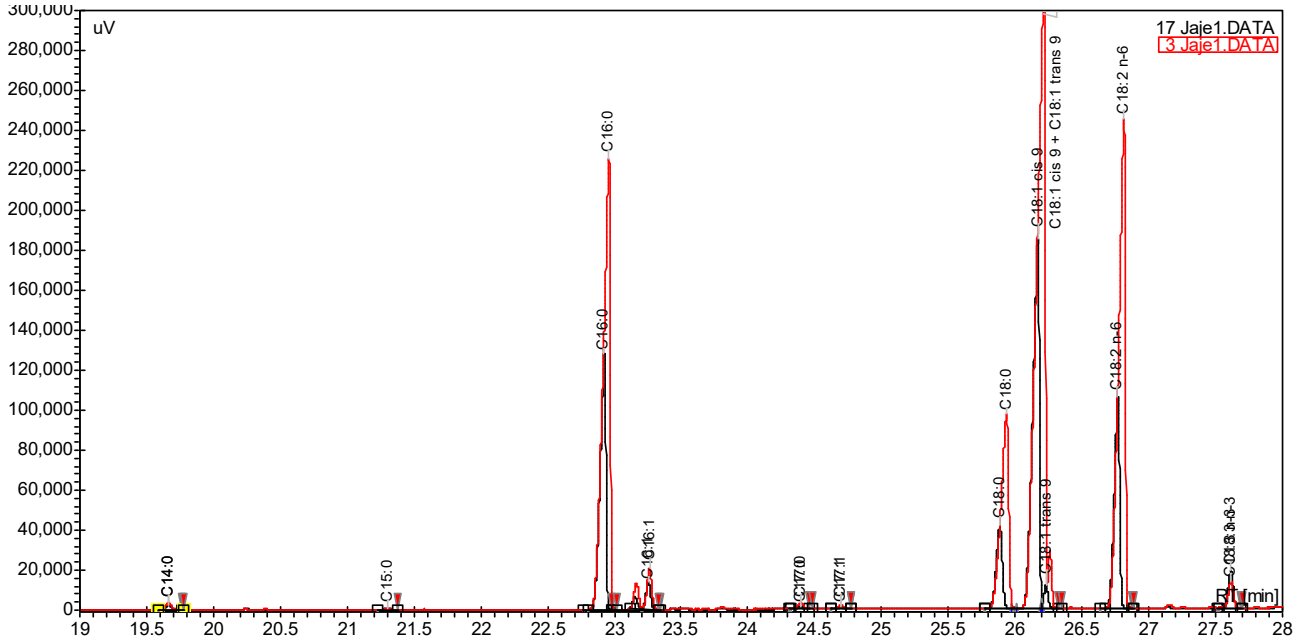
U tablici 3. vidimo rezultate analize jaja nesilice koja je hranjena hranom obogaćenom omega-3 masnim kiselinama. Promatrajući postotak masnih kiselina, vidimo da je od omega-3 masnih kiselina α-linolenska kiselina (ALA) zastupljena sa 3,02 %, dokozaheksaenska kiselina (DHA) zastupljena je sa 2,81, %, dok eikozapentaenoična kiselina (EPA) nije detektirana.

Tablica 3. Analiza uzorka jaja nesilice čija je prehrana obogaćena omega-3 masnim kiselinama

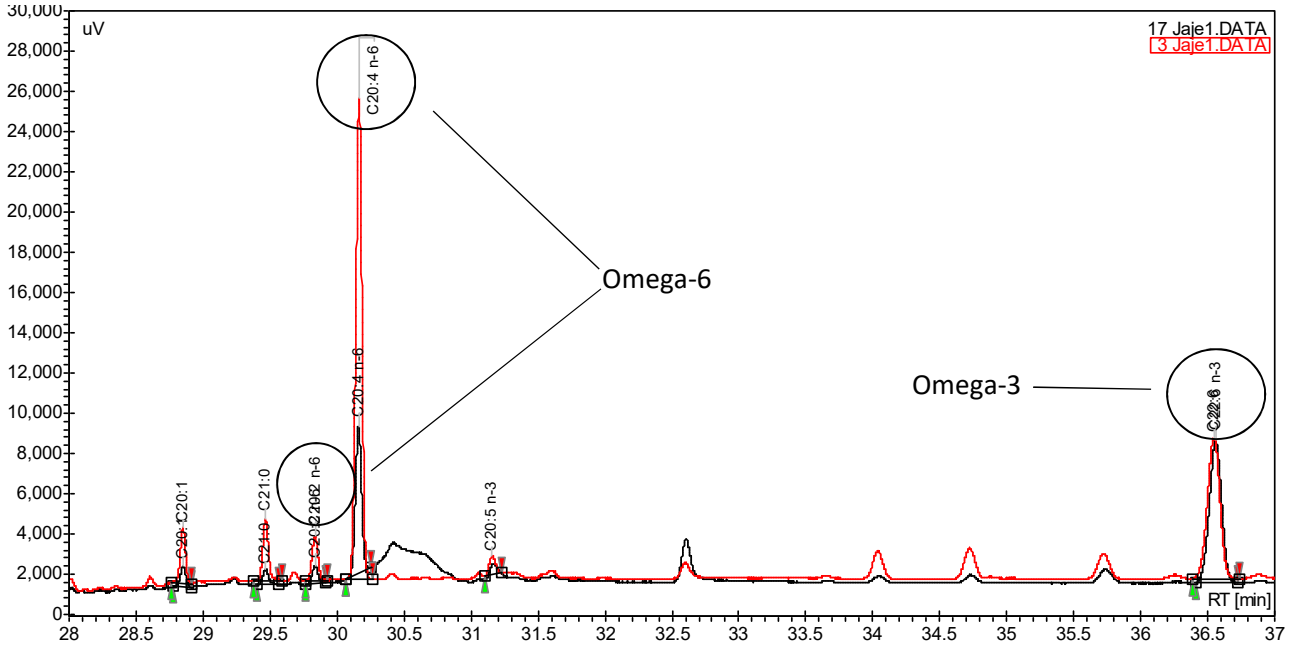
#	ime	Vrijeme [Min]	ukupne FAME	% FAME	faktor	FA	%FA	**mg FA/100 g jaja**	naziv
1	C14:0	19.66	87.1	0.319	0.942134	0.300541	0.31581	**20.183**	miristinska kiselina
2	C16:0	22.92	6354	23.28	0.948136	22.07261	23.194	**1482.329**	palmitinska kiselina
3	C16:1	23.25	580.4	2.126	0.94775	2.014917	2.117284	**135.316**	palmitoleinska kiselina
4	C17:0	24.39	61.5	0.225	0.950694	0.213906	0.224774	**14.365**	heptadekanska kiselina
5	C17:1	24.7	45.8	0.168	0.950344	0.159658	0.167769	**10.722**	cis-10-heptadekanska kiselina
6	C18:0	25.89	2182.4	7.996	0.95301	7.620268	8.007414	**511.754**	stearinska kiselina
7	C18:1 cis 9	26.17	10546.5	38.641	0.952693	36.81301	38.68329	**2472.249**	oleinska kiselina
8	C18:1 trans 9	26.23	428.6	1.57	0.952693	1.495728	1.571718	**100.449**	elaidična kiselina
9	C18:2 n-6	26.77	4897.2	17.943	0.952372	17.08841	17.95658	**1147.605**	linolna kiselina
10	C18:3 n-3	27.62	824.6	3.021	0.952047	2.876134	3.022255	**193.152**	α-linolenska kiselina
11	C20:1	28.85	47.3	0.173	0.956782	0.165523	0.173933	**11.116**	cis-11-eikozenska kiselina
12	C21:0	29.47	38.3	0.14	0.958816	0.134234	0.141054	**9.015**	heneikozanoična kiselina
13	C20:2 n-6	29.84	45.3	0.166	0.956514	0.158781	0.166848	**10.663**	eikozadienska kiselina
14	C20:4 n-6	30.16	390.9	1.432	0.955968	1.368946	1.438495	**91.934**	arahidonska kiselina
15	C22:6 n-3	36.56	763.5	2.797	0.95906	2.682491	2.818774	**180.148**	dokozaheksaenska (DHA) kiselina
						95.16515	100		
∑			27293.4	100					

4.2. Usporedba kromatograma

Na slici 19. i slici 20 vidljive su usporedbe plinskih kromatograma. Usporedba se dobiva preklapanjem kromatograma uzorka jaja koje nije obogaćen omega-3 masnim kiselinama i kromatograma uzorka jaja koje je obogaćen omega-3 masnim kiselinama. Prema kromatogramima vidljivo je značajno smanjenje omega-6 masnih kiselina i povećanje koncentracije omega-3 masnih kiselina.



Slika 19. Usporedba kromatograma uzorka jaja koje nije obogaćeno omega-3 masnim kiselinama (—) i uzorka jaja koje je obogaćeno omega-3 masnim kiselinama(—),(raspon RT 28 – 37 min.).



Slika 20. Usporedba kromatograma uzorka jaja koje nije obogaćeno omega-3 masnim kiselinama (—) i uzorka jaja koje je obogaćeno omega-3 masnim kiselinama (—) (raspon RT 28 – 37 min.).

5. Zaključak

U ovom radu se istraživao utjecaj sastava hrane za nesilice na sastav jaja, odnosno utječe li ishrana na povećanje omega-3 masnih kiselina u jajima. Uspoređivao se sastav jaja nesilica koje su konzumirale hranu koja nije obogaćena omega-3 masnim kiselinama i sastav jaja nesilica koje su konzumirale hranu obogaćenu omega-3 masnim kiselinama. Plinskom kromatografijom analiziran je profil masnih kiselina. Usporedbom rezultata može se zaključiti da je u jajima kokoši nesilica koje su hranjene hranom obogaćenom omega-3 masnim kiselinama došlo do povećanja njihove koncentracije. Imajući na umu sve dobrobiti unosa omega-3 masnih kiselina na zdravlje ljudi, može se zaključiti da jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama predstavljaju dobar, relativno jeftin i lako dostupan izvor omega-3 masnih kiselina.

6. Literatura

1. Breivik, H. ed., 2007. *Long-chain omega-3 specialty oils* (Vol. 21). Oily Press.
2. Nyberg, J., 2017. Analysis of fatty acids in egg yolks of various production systems.
3. https://www.val-znanje.com/index.php/tekstovi/zdravlje-i-lijecenje/257-omega-kiseline-izmedu-spretnih-reklama-mita-i-stvarne-istine
4. http://www.fatsoflife.com/pufa-december-2015/heart-health-benefits-of-epa-and-dha/
5. Breivik, H. ed., 2007. *Long-chain omega-3 specialty oils* (Vol. 21). Oily Press.
6. Simopoulos, A.P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition*, *54*(3), pp.438-463.
7. Gnjidić, Z., 2014. Učinak omega-3 masnih kiselina na klinički tijek artritisa. *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik*, *20*(113/114).
8. Nyberg, J., 2017. Analysis of fatty acids in egg yolks of various production systems.
9. Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *circulation*, *106*(21), pp.2747-2757.
10. Simopoulos, A.P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition*, *54*(3), pp.438-463.
11. Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. and Appel, L.J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *circulation*, *106*(21), pp.2747-2757.
12. Simopoulos, A.P., 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of nutrition*, *21*(6), pp.495-505.
13. Nemets, B., Stahl, Z. and Belmaker, R.H., 2002. Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*, *159*(3), pp.477-479.
14. Stoll, A.L., Severus, W.E., Freeman, M.P., Rueter, S., Zboyan, H.A., Diamond, E., Cress, K.K. and Marangell, L.B., 1999. Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Archives of general psychiatry*, *56*(5), pp.407-412.
15. Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A. and Millington, K.J., 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, *17*(5), pp.449-459.

16. Nyberg, J., 2017. Analysis of fatty acids in egg yolks of various production systems.
17. Eiceman, G. (2006). Instrumentation of Gas Chromatography. In Encyclopedia of Analytical Chemistry (eds R. A. Meyers and G. A. Eiceman).
18. Preuzeto s: https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Chromedia/01Gas_Chromotography_(GC)/Gas_Chromotography%3A_Basic_Theory/13The_Van_Deemter_equation
19. Eiceman, G. (2006). Instrumentation of Gas Chromatography. In Encyclopedia of Analytical Chemistry (eds R. A. Meyers and G. A. Eiceman).
20. http://www.keison.co.uk/products/stuart/large/RE300.jpg
21. Preuzeto s: http://cem.com/en/rapid-fames-analysis