

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nataša MAJCEN

**DOLOČANJE HOLESTEROLA, OKSIDOV HOLESTEROLA IN MAŠČOBNIH
KISLIN V MORSKIH IN SLADKOVODNIH RIBAH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF CHOLESTEROL, CHOLESTEROL OXIDES AND
FATTY ACIDS OF SEA AND FRESHWATER FISH**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi ter Katedri za vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Božidarja Žlendera in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob.

Mentor: prof. dr. Božidar Žlender

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nataša Majcen

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 637.56:543.61:547.92(043)=863
- KG ribe/morske ribe/sladkovodne ribe/sardela/postrv/kemijska sestava/holesterol/oksidi holesterola/metoda po Ubhayasekeraju
- AV MAJCEN, Nataša
- SA ŽLENDER, Božidar (mentor) / GOLOB, Terezija (recenzentka)
- KZ SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2006
- IN DOLOČANJE HOLESTEROLA, OKSIDOV HOLESTEROLA IN MAŠČOBNIH KISLIN V MORSKIH IN SLADKOVODNIH RIBAH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VII, 79 s., 18 pregl., 17 sl., 81 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen diplomskega dela je bil modificirati in testirati metodo po Ubhayasekeraju, za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v mesu morskih in sladkovodnih rib, določiti osnovno kemijsko (maščobe, voda, beljakovine, pepel) in maščobnokislinsko sestavo lipidov. Analize smo opravili na postrveh (šarenka), gojenih v dveh ribogojnicah in različnih starosti (Gameljne, 14 mesecev; Ilirska Bistrica, 18 mesecev), ter jadranski sardeli. Pri modifikaciji metode smo testirali učinkovitost ekstrakcije z različnimi topili ter postopek ločbe na SPE. Z izbrano modificirano metodo smo uspeli ločiti in določiti vsebnost holesterola in oksidov holesterola. Maščobne kisline (MK) smo z metodo in situ transesterifikacije analizirali na plinsko tekočinskem kromatografu. Vsi podatki so bili obdelani s programskim paketom SAS. Vsebnost holesterola se je značilno razlikovala med obema vrstama rib (postrvi 57,31 mg/100 g; sardele 80,92 mg/100 g), vsebnost oksidov holesterola pa smo določili v izredno nizkih koncentracijah (< 3,78 mg/100 g). Meso sardel in postrvi se je zelo visoko značilno razlikovalo v vsebnosti vode in pepela, maščobe pa so v povprečju vsebovale največ večkrat nenasičenih MK (sardele 47,62 %; postrvi 43,69 %), predvsem DHA (C22:6n-3; sardele 25,86 %; postrvi 16,71 %) in EPA (C20:5n-3; sardele 8,97 %; postrvi 6,73 %), sledile so nasičene MK (32,76 %) v maščobah sardel ter enkrat nenasičene MK (33,20 %) v maščobah postrvi. Razmerje med n-6/n-3 MK je bilo nizko (sardele 0,08; postrvi 0,39), indeks aterogenosti je bil pri sardelah 0,69 in 0,42 pri postrveh. S prehranskega vidika je tako P/S indeks (sardele 1,45; postrvi 1,89), kot tudi indeks aterogenosti ugodnejši pri postrveh.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 637.56:543.61:547.92(043)=863
- CX fish/sea fish/freshwater fish/sardine/trout/chemical composition/cholesterol/cholesterol oxides/method by Ubhayasekera
- AU MAJCEN, Nataša
- AA ŽLENDER, Božidar (supervisor), GOLOB Terezija (recenzent)
- PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2006
- TI DETERMINATION OF CHOLESTEROL, CHOLESTEROL OXIDES AND FATTY ACIDS OF SEA AND FRESHWATER FISH
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO VII, 79 p., 18 tab., 17 fig., 81 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The purpose of this work was to establish a modified method by Ubhayasekera, usable for determining cholesterol and cholesterol oxides of sea and freshwater fish and to determine the chemical content (fats, water, proteins, mineral) and fatty acids composition of muscle lipids. The analysis was performed on boarded trouts from two different fish farmings and of different ages (Gameljne, 14 months; Ilirska Bistrica, 18 months) as well as on Adriatic sardines. When modifying the method we tested a suitable organic dissolve used for extraction and SPE method. Then the quantities of cholesterol and its oxides were determined by our modified method. Fatty acids (FA) was determined by in situ transesterification and capillary column gas-liquid content chromatography. Finally all results were processed with the SAS statistical program. The amount of total cholesterol strongly differed between both kinds of fish (trout 57.31 mg/100 g, sardine 80.92 mg/100 g), the amount of oxisteroles were determined in very low quantities (< 3,78 mg/100 g). The percentages of water and mineral matters showed a statistically very high discrepancy. Trout and sardine fats on average contained the largest quantity of polyunsaturated FAs (sardine 47.62 %, trout 43.69 %), above all DHA (C22:6n-3; sardine 25.86 %; trout 16.71 %) and EPA (C20:5n-3; sardine 8.97 %; trout 6.73 %), followed by saturated FA (32.76 %) in sardine fats and monounsaturated FA (33.20 %) in trout fats. N-6/n-3 ratio was low (sardine 0.08, trout 0.39), the aterogenic index in sardines exceeded the recommended values (0.69), in trouts this index came to 0.42. From the nutritional point of view the aterogenic index and P/S indeks (sardine 1,45, trout 1,89) are better in boarded trouts.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 ŠARENKA (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>)	3
2.2 JADRANSKA SARDELA (<i>SARDINA PILCHARDUS WAL.</i>)	4
2.3 RIBJE MESO V PREHRANI	5
2.4 KEMIJSKA SESTAVA MESA RIB	6
2.4.1 Primerjava kemijske sestave mesa sladkovodnih in morskih rib	7
2.4.2 Maščobe.....	8
2.4.3 Maščobne kisline	8
2.4.4 Beljakovine.....	9
2.4.5 Sladkorji	10
2.4.6 Mineralne snovi, vitamini.....	10
2.5 MAŠČOBE IN MAŠČOBNE KISLINE	11
2.5.1 Esencialne maščobne kisline	12
2.5.2 Razmerje med n-6 in n-3 maščobnimi kislinami.....	12
2.5.3 Razmerje P/S, indeks aterogenosti	13
2.5.4 <i>Trans</i> - maščobne kisline.....	14
2.6 HOLESTEROL IN OKSIDI HOLESTEROLA	14
2.6.1 Holesterol	14
2.6.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti holesterola.....	14
2.6.1.2 Vloga holesterola v organizmu	15
2.6.1.3 Metabolizem holesterola	16
2.6.2 Oksidi holesterola.....	17
2.6.2.1 Oksidacija holesterola	17
2.7 VPLIV HOLESTEROLA IN VEČKRAT NENASIČENIH DIETNIH MAŠČOB NA ZDRAVJE	18
2.7.1 Vpliv nasičenih MK na koncentracijo holesterola v krvi.....	19
2.7.2 Vpliv nenasičenih MK na koncentracijo holesterola v krvi	19
2.8 METODE DOLOČANJA VSEBNOSTI HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA	20
2.8.1 Metode določanje vsebnosti holesterola.....	20
2.8.2 Metode določanja vsebnosti oksidov holesterola	21

2.8.3	Metoda določanja holesterola in oksidov holesterola, na kateri je temeljilo naše analitično delo	22
3	MATERIAL IN METODE DELA	25
3.1	MATERIAL	25
3.2	METODE DELA	25
3.2.1	Priprava vzorcev	25
3.2.2	Določanje vsebnosti holesterola	25
3.2.2.1	Priprava umeritvene krivulje	26
3.2.2.2	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	27
3.2.2.3	Določanje vsebnosti holesterola v vzorcu	27
3.2.3	Določanje oksidov holesterola	28
3.2.3.1	Interni standard	28
3.2.3.2	Derivatizacija (priprava TMS – etrov, derivatov holesterol oksidov)	28
3.2.3.3	Plinska kromatografija	28
3.2.3.4	Določanje vsebnosti oksidov holesterola v vzorcu	29
3.2.4	Določanje maščobnokislinske sestave	29
3.2.4.1	Interni standard	29
3.2.4.2	Ekstrakcija MEMK	30
3.2.4.3	Plinska kromatografija	30
3.2.4.4	Določanje vsebnosti MK v vzorcu	31
3.2.4.5	Določanje vsebnosti posameznih MK računsko	33
3.2.4.6	Določanje vsebnosti posameznih MK z internim standardom	33
3.2.5	Določanje vsebnosti vode	33
3.2.6	Določanje vsebnosti beljakovin	34
3.2.7	Določanje vsebnosti maščob	36
3.2.8	Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi	37
3.2.9	Statistična obdelava podatkov	38
3.2.9.1	Statistični model za določeno kemijsko sestavo (model 1)	38
3.2.9.2	Statistični model za določeno kemijsko sestavo (model 2)	38
4	REZULTATI	39
4.1	RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA V RIBJEM MESU	39
4.1.1	Metoda 1 – vključuje vroče umiljanje	39
4.1.2	Metoda 2 – vključuje hladno umiljanje	40
4.1.2.1	Primerjanje ustreznosti različnih organskih topil	41
4.1.2.2	Ugotavljanje ustreznosti različnih kolon za SPE postopek	43
4.2	APLIKACIJA METODE ZA DOLOČANJE HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA V MESU SARDEL IN POSTRVI	47
4.2.1	Ponovljivost metode določanja holesterola in oksidov holesterola	48
4.2.2	Linearnost uporabljane kromatografske metode za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola	49
4.3	OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MESA SARDEL IN POSTRVI	50
4.3.1	Kemijska sestava mesa sardel in postrvi	50
4.3.1.1	Povprečne vrednosti kemijske sestave mesa rib	50
4.3.1.2	Primerjave rezultatov kemijske sestave mesa sardel in postrvi	51

4.3.1.3	Primerjava kemijske sestave mesa postrvi, vzgojenih v različnih ribogojnicah.....	52
4.4	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA LIPIDOV SARDEL IN POSTRVI.....	53
4.4.1	Identifikacija maščobnih kislin.....	53
4.4.2	Ponovljivost metode določanja maščobnih kislin	54
4.4.3	Povprečne vsebnosti maščobnokislinske sestave lipidov sardel in postrvi	57
4.4.4	Primerjava maščobno kislinske sestave postrvi iz različnih ribogojnic	60
4.4.5	Primerjava naših rezultatov z literaturnimi	63
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1	RAZPRAVA	65
5.2	SKLEPI	69
6	POVZETEK	70
7	VIRI.....	72
	ZAHVALA	77
	PRILOGE.....	78

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Približna kemijska sestava mesa sardel in postrvi (Žlender, 2000).....	6
Preglednica 2: Kemijska sestava nekaterih sladkovodnih in morskih rib (g/100 g)	7
Preglednica 3: Vsebnost nekaterih MK v lipidih postrvi in sardel (Johansson, 2000).....	9
Preglednica 4: Topnost holesterola v različnih topilih (Shepard in sod., 1993).....	15
Preglednica 5: Konverzijski faktorji (FA _i) za preračun MEMK v MK (AOAC Official Method 996.06. Fat (Total, Saturated and Monosaturated) in Foods, 1999: 18B).....	32
Preglednica 6: Ponovljivost določanja holesterola in oksidov holesterola znotraj paralelke vzorca št. 086 (sardela, Delamaris).....	48
Preglednica 7: Ponovljivost določanja holesterola in oksidov holesterola znotraj vzorca št. 093I (postrv, Gameljne).....	48
Preglednica 8: Povprečna kemijska sestava mesa sardel z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri	50
Preglednica 9: Povprečna kemijska sestava mesa postrvi z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri	50
Preglednica 10: Primerjava povprečne kemijske sestave mesa sardel in postrvi (LSM ± SEM) in značilnost razlike	51
Preglednica 11: Primerjava rezultatov kemijskih analiz mesa postrvi, vzgojenih v različnih ribogojnicah (LSM ± SEM) in značilnost razlike.....	52
Preglednica 12: Ponovljivost znotraj paralelke vzorca postrvi št. 095 (ut % MK od skupnih MK).....	55
Preglednica 13: Ponovljivost znotraj vzorca postrvi št. 097 II (ut % MK od skupnih MK).	56
Preglednica 14: Primerjava povprečnih deležev MK (% od vseh MK) lipidov sardel in postrvi (LSM ± SEM) in značilnost razlike	59
Preglednica 15: Primerjava povprečnih utežnih deležev MK (% od vseh MK) mesa postrvi, vzgojenih v različnih ribogojnicah (LSM ± SEM) in značilnost razlike.....	61
Preglednica 16: Maščobnokislinska sestava določena z internim standardom in z izračunom (mg MK/100 g).....	62
Preglednica 17: Primerjava kemijske sestave mesa sardel in postrvi s podatki iz literature (g/100 g).....	63
Preglednica 18: Primerjava povprečnih vrednosti najpomembnejših maščobnih kislin v mesu sardel in postrvi z podatki iz literature (podatki so podani v % od vseh MK)...	63

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Šarenka (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	3
Slika 2: Jadranska sardela (<i>Sardina pilchardus</i> Wal.)	5
Slika 3: Holesterol (holest-5-en-3 β -ol) (Chandan, 1997)	15
Slika 4: Shema štirih različnih analitičnih načinov določanja oksidacijskih produktov holesterola (Ubhayasekera, 2004)	22
Slika 5: Kromatogram neuspešne analize, ki vključuje vroče umiljanje	40
Slika 6: Primerjava vsebnosti holesterola v vzorcu, po testiranju različnih organskih topil	42
Slika 7: Izločanje holesterola, z uporabo kolone Strata X	44
Slika 8: Izločanje holesterola, z uporabo kolone C18 VARIAN	44
Slika 9: Izločanje holesterola, z uporabo kolone Strata SI-1	45
Slika 10: Izločanje holesterola z izboljšano SPE metodo	46
Slika 11: Površine izločenega holesterola z izboljšano SPE metodo za izračun izkoristka SPE metode	47
Slika 12: Tri umeritvene krivulje, ki prikazujejo linearnost HPLC določanja vsebnosti holesterola	49
Slika 13: Primerjava kemijske sestave mesa sardel in postrvi	51
Slika 14: Primerjava kemijske sestave mesa postrvi, gojenih v različnih ribogojnicah in različnih starosti (Gameljne, 14 mesecev; Ilirska Bistrica 18 mesecev)	52
Slika 15: Plinski kromatogram MK sestave vzorca 092I (sardela, paralelka 1)	53
Slika 16: Primerjava vsebnosti posameznih skupin MK v lipidih sardel in postrvi	57
Slika 17: Primerjava deležev pomembnejših VNMK v lipidih sardel in postrvi	58

KAZALO PRILOG

Priloga A: Faktor odzivnosti detektorja (Rf) za posamezno MK.....	78
Priloga B: Podatki, ki pojasnjujejo morebiten vpliv prehrane na MK sestavo (% od vseh MK)	79

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALK	α -linolenska kislina
AOAC	uradno potrjena metoda
DHK	dokozaheksaenojska kislina
EMK	esencialne maščobne kisline (EFA–Essential Fatty Acid)
ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline (MUFA–Monounsaturated Fatty Acid)
EPK	eikozapentaenojska kislina
FID	plamensko ionizacijski detektor (Flame Ionisation Detector)
GC	plinska kromatografija
GC-MS	plinska kromatografija z masno spektrometrijo
GLC	plinsko tekočinska kromatografija (Gas Liquid Chromatography)
HDL	lipoproteini visoke gostote
IA	indeks aterogenosti
ISTE	in situ transesterifikacija
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
KV	koeficient variabilnosti
LDL	lipoproteini nizke gostote
LK	linolna kislina
MEMK	metilni ester maščobne kisline (FAME–Fatty Acid Methyl Ester)
MK	maščobna kislina (FA–Fatty Acid)
MTBE	tetra-butil metil eter
NMK	nasičene maščobne kisline (SFA–Saturated Fatty Acid)
P/S	razmerje med vsoto vseh večkrat nenasičenih maščobnih kislin in vsoto
R _f	faktor odzivnosti detektorja (Response factor)
SO	standardni odklon
SPE	ekstrakcija s trdno fazo (Solid Phase Extraction)
TLC	tankoplastna kromatografija
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline

1 UVOD

Ribe so pomemben vir hrane, tako v razvitem kot nerazvitem delu sveta. Za razliko od drugih vrst mesa, vsebuje meso rib maščobo, katera je s prehranskega stališča sprejemljiva, saj ima ugodno maščobnokislinsko sestavo. Ribe vsebujejo zelo različno količino maščob. Glede vsebnosti holesterola ni bistvenih razlik med ribami in drugimi živalmi.

O maščobah največ govorimo in razmišljamo kot o zdravju škodljivi sestavini živil. Ko pogledamo maščobe s stališča prehrane, pa hitro vidimo, da so za življenje in zdravje pomembno in nepogrešljivo hranilo. So vir energije v telesu, gradniki celičnih membran, vsebujejo v maščobi topne vitamine ter esencialne MK in prekurzorje tkivnih hormonov.

Meso rib je po kemijski sestavi in hranilni vrednosti podobno mesu klavnih živali in perutnine. V humani prehrani ima ribje meso pomembno vlogo, ker je bogat vir biološko visokovrednih in lahko prebavljivih beljakovin, nenasičenih (tudi esencialnih) maščobnih kislin, vitaminov in mineralov.

Poraba ribjega mesa je v posameznih državah različna in je odvisna od prehranjevalnih navad, klime, socialno kulturnih in drugih dejavnikov. Ocena porabe rib je za Slovenijo okoli 4 kg na prebivalca letno, kar je izredno malo v primerjavi z nekaterimi državami (Islandija, Japonska), kjer se letna poraba giblje okoli 90 kg rib na prebivalca. Ob tako majhni porabi ribjega mesa pri nas lahko mirno zaključimo, da imamo v Sloveniji deficitarno oskrbo z n-3 maščobnimi kislinami, predvsem v kontinentalnem delu države, saj se v obmorskih krajih zaužije tradicionalno več ribjega mesa.

Poleg maščob v ribah naj bi varovalni vpliv imele tudi beljakovine ribjega mesa, ki imajo povsem samostojni vpliv na zniževanje plazemskega holesterola. Puste ribe vzdržujejo visoko raven plazemskega HDL-holesterola, ki ima poseben varovalni vpliv pred nastankom arterioskleroze.

Prehranski strokovnjaki ugotavljajo, da na aterogeni učinek lipidov bolj kot holesterol, vplivajo oksidi holesterola ter povečan delež nekaterih nasičenih maščobnih kislin, hkrati pa imajo varovalni antiaterogeni in tudi antikancerogeni učinek dolgoveržne n-3 maščobne kisline, npr. dokozaheksaenojska kislina (DHK).

1.1 NAMEN DELA

Meso rib uvrščamo med kakovostna živila živalskega porekla, zato smo želeli raziskati njegovo kemijsko sestavo s poudarkom na lipidih (maščobnokislinska sestava in vsebnost holesterola), ki opredeljujejo prehransko vrednost rib, tako morskih (jadranska sardela) kot sladkovodnih (postrv šarenka-gojena).

Namen našega dela je bil določiti vsebnost holesterola, oksidov holesterola ter osnovno kemijsko sestavo (maščobe, beljakovine, voda, pepel) v mesu rib in maščobnokislinsko sestavo njihovih lipidov. Že predhodniki so ugotovili, da se običajna metoda za določanje holesterola v mesu, ne obnese tudi pri mesu rib, zato smo se lotili tega problema. Na začetku našega dela smo se lotili razvoja metode z uporabo ekstrakcije s trdno fazo (SPE), s katero bi lahko določili tako vsebnost holesterola kot tudi vsebnost oksidov holesterola, ki predstavljajo večje tveganje za zdravje ljudi kot sam holesterol. V vednost smo vzeli dejstvo, da na vsebnost holesterola in oksidov holesterola v analiziranih vzorcih vplivata priprava vzorca in tudi izbrana metoda določanja.

Pričakovali smo statistično značilne razlike v vsebnosti analiziranih parametrov, predvsem med obema vrstama rib (sardela, postrv), pa tudi med postrvmi različno gojenimi in različno starimi.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ŠARENKA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Šarenka (*Oncorhynchus mykiss*) je ena izmed predstavnic družine postrvi - Salmonidae, ki sicer ni obsežna, saj zajema le 5 rodov s 24 vrstami. Med predstavniki te družine so zastopani v naših vodah rodovi *Salmo*, *Hucho*, *Onchorhynchus* in *Salvelinus*. Prva dva sta avtohtona, rod *Salvelinus* je bil naseljen v naše kraje ob koncu devetnajstega in začetku dvajsetega stoletja, rod *Onchorhynchus* pa v 80-tih letih. Šarenka spada v rod *Salmo gairdneri* Richardson 1836.

Ribe družine postrvi so izredno spremenljive tako po videzu kot po načinu vedenja in razmnoževanja. Značilno za vrste te družine je, da imajo pogosto oranžno meso, ker se hranijo s tako hrano, ki vsebuje veliko karotenov. Družina postrvi naseljuje avtohtono celo Evropo do Sredozemskega morja, Alžirijo, Azijo, skratka vse vodotoke severne zemeljske poloble do povratnikov, naselili pa so jih tudi na južno poloblo. V Sloveniji naseljujejo postrvi v vse vodotoke donavskega in jadranskega porečja (Povž in sod., 1990).

Šarenka ima glavo in obliko trupa podobno potočni postrvi. Tudi odrasli samci so s svojo navzgor zasukano spodnjo čeljustjo podobni drugim postrvjim samcem. Barva telesa se do neke mere prilagaja barvi okolja, je lahko temnejša ali svetla. Sicer pa je hrbet temnejši, sivo do rjavo zelenkast, boki so svetlejši, trebuh svetlo siv do belkast. vzdolž pobočnice poteka od glave do repa rdeča proga, ki postane ob drsti čudovito mavrično obarvana in od tod tudi njeno angleško ime rainbow trout, kar pomeni mavrična postrv. Po vsem trupu in vseh plavutih ima posejane drobne črne pege (Povž in sod., 1990) (slika 1).



Slika 1: Šarenka (*Oncorhynchus mykiss*)

Šarenka spolno dozori v 2.-3. letu starosti. V svoji domovini se v času drsti seli iz morja v sladke vode ali pa preživi celo življenje v sladkih vodah.

Pri nas pa tam, kjer se naravno razmnožuje, ostane celo življenje in se ne seli. V naravi se drsti od februarja do aprila, v ribogojnicah pa že decembra ali še prej (oktobra). Samica odloži 1600-2000 iker na kilogram telesne teže. Ikre so velike, v premeru merijo okoli 4,5 mm.

Prehranjujejo se tako kot ostale vrste postrvi, torej z drobnimi vodnimi nevretenčarji, žuželkami, ki letajo nad vodami in z večjimi in manjšimi ribami (Povž in sod., 1990).

V svoji naravni domovini živi v jatah v večjih tolmunih in globljih predelih vodotokov. Pri nas neseljuje iste vode kot potočna postrv, prenese pa višje temperature in ni avtohtona vrsta ribe (Povž in sod., 1990).

Prvotna domovina šarenke je Severna Amerika. Živi v rekah, ki se izlivajo v Tihi Ocean. Od naselitve v Evropi, kamor so jo leta 1880 naselili iz Kalifornije, se je razširila po vseh evropskih vodotokih.

Tudi v Sloveniji, kamor so jo prinesli leta 1890, naseljuje skoraj vse vodotoke, njeno populacijo pa umetno vzdržujejo ribiči, ki jo stalno naseljujejo za športni ribolov. V številnih vodah, kamor jo ribiči vlagajo, se tudi razmnožuje. Zaenkrat pa nikjer ne predstavlja nobene nevarnosti oz. konkurence drugim ribam (Povž in sod., 1990).

Zaradi hitre rasti jo gojijo v ribogojnicah po vsej Sloveniji tako za vlaganje v športno ribolovne vode kot za prehrano ljudi. Med vsemi postrvjimi vrstami je pri nas gospodarsko najpomembnejša. Za športni ribolov je zanimiva zlasti zato, ker je zelo požrešna in prijema ob vsakem dnevnem času, poleg tega pa ni izbirčna za vabo (Povž in sod., 1990).

2.2 JADRANSKA SARDELA (*SARDINA PILCHARDUS WAL.*)

Jadranska ali mediteranska sardela (znanstveno ime: *Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792, slika 2), krajše tudi sardela, izhaja iz družine sledi (*Clupeidae*, rod *Clupeiformes*), ki spada v t.i. skupino drobne 'plave ribe' in je riba največjega gospodarskega pomena na območju Jadrana. Drobna 'plava riba' se imenuje zato, ker je njihovo meso temnejše in rdečkasto obarvano zaradi večje telesne aktivnosti in posledično zaradi dobre prekrvavljenosti ter intenzivne obarvanosti z mioglobinom. V to skupino drobne 'plave ribe' spadajo: sardela (*Sardina pilchardus*), sardon ali inčun (*Engraulis encrasicolus*) in papalina (*Sprattus sprattus*), v Atlantskem oceanu pa sled (*Clupea harengus*). Sem spadajo tudi večje ribe, kot na primer predstavnice družine skuš (*Scombridae*), to sta skuša (*Scomber scombrus*) in tun (*Thunnus thynnus*) ter nekatere druge družine (Petrijna, 1988; Treer in sod., 1995).

Jadransko sardelo najdemo tudi pod drugimi imeni: European pilchard, pilchard sardine, adriatic sardine (angl.), Sardine (nem.), sardina ali sarda (it.), *Sardina europea* (špan.) (FIGIS, 2004).

Telo sardele je vitko, na bokih sploščeno z okroglim trebuhom. Spodnja čeljust je nekoliko daljša od zgornje. Škržni poklopec je žarkasto progast. Po tej morfološki lastnosti jo hitro ločimo od podobnih vrst rib (papalina). Je modrikaste barve s pridihom zelenkaste do rdečkaste barve. V dolžino doseže največ 25 cm, njena masa se giblje do 60 g. Prehranjuje se s planktonskimi rakci, ribjimi ikrami in zarodom oz. zooplanktonom in fitoplanktonom. V Jadranskem morju se drsti od sredine jeseni do začetka pomladi, kar pomembno vpliva na njeno zamaščenost, saj jo drst zelo izčrpa.



Slika 2: Jadranska sardela (*Sardina pilchardus* Wal.)

Jadranska sardela je pelagična riba ali riba odprtega morja, ki migrira. Pojavlja se v jatah Sredozemskega in Jadranskega morja, vzhodnega Atlantskega oceana ter med Marokom in Britanskim otočjem. Najgosteje jadranska sardela naseljuje severni in srednji Jadran. Jate so podnevi na približno 25 do 55 m globine (tudi 100 m), ponoči pa se dvignejo na okoli 10 do 35 m globine (Teer in sod., 1995).

2.3 RIBJE MESO V PREHRANI

Ribe so pomemben vir hrane, tako v razvitem kot nerazvitem delu sveta. Za razliko od drugih vrst mesa, vsebuje meso rib maščobo, ki je s prehranskega stališča sprejemljiva, saj ima ugodno maščobnokislinsko sestavo. Ribe vsebujejo zelo različne vsebnosti maščobe od 1 % do 30 %, odvisno od vrste, prehrane, spola, sezone in geografskega področja. Glede vsebnosti holesterola ni bistvenih razlik med ribami (40-90 mg/100 g holesterola) in drugimi živalmi (Polak, 2000).

Vsebnost posameznih hranljivih snovi v ribjem mesu je odvisna od vrste rib, zato ni vseeno, katero vrsto rib uporabljamo v prehrani. To velja za rečne kot za sladkovodne ribe. Energijska vrednost je odvisna od vsebnosti maščob. Ribe z manjšo količino maščob imajo manjšo energijsko vrednost in obratno (Debelič in sod., 1998).

Ribe in ribje olje so torej bogat vir večkrat nenasičenih maščobnih kislin n-3 tipa in tudi oleinske kisline, ki zelo ugodno vplivajo na koncentracijo lipidov v krvi. Enkratno ali dvakratno uživanje morskih rib na teden naj bi že imelo varovalni vpliv na zdravje ljudi. Seveda pa na zdravje ljudi vplivajo tudi drugi dejavniki prehrane. Tako so npr. epidemiološke študije pokazale, da je količina rib pri domorodcih na Aljaski razmeroma velika, toda umrljivost za kroničnimi degenerativnimi boleznimi skoraj nič ne zaostaja za drugimi, ki uživajo tudi veliko mesa klavnih živali. Vzrok za omenjeni pojav je verjetno tudi v tem, da je prehrana pri domorodcih na Aljaski preobilna z maščobami, vsebuje pa tudi zelo malo sadja in/ali zelenjave (Pokorn, 1996).

Novejša študija je ugotovila povezavo med številom tedenskih porcij ribjih jedi v prehrani in nivojem triacilglicerolov in HDL-holesterola v krvi preiskovancev. Višja koncentracija HDL-holesterola v krvi je bila v tesni povezavi z večjim številom porcij rib v tedenski prehrani (Pokorn, 1996).

Študije so pokazale, da je dolgotrajno uživanje manjših količin rib v povezavi z manjšo umrljivostjo zaradi koronarne bolezni. Nizozemska študija, ki je zajela obdobje dvajsetih let, je tudi pokazala, da je smrtnost pri več kot 800 moških, ki so že preboleli srčni infarkt in tistih, ki so redno uživali morske ribe, manjša za več kot 50 odstotkov v primerjavi s tisto skupino moških, ki niso jedli rib (Pokorn, 1996).

Poleg maščob v ribah naj bi varovalni vpliv imele tudi beljakovine ribjega mesa, ki imajo povsem samostojni vpliv na zniževanje nivoja holesterola v plazmi. Puste ribe (ribje beljakovine) vzdržujejo visoko raven plazemskega HDL-holesterola, ki ima poseben varovalni vpliv pred nastankom arteroskleroze (Pokorn, 1996).

Ribje meso vsebuje veliko vode in je zato zelo hitro pokvarljivo. Prvi in najpomembnejši pogoj za uporabo tega mesa v prehrani je higienska neoporečnost. Ribje meso se kvari hitreje kot meso klavnih živali (Debelič, 1998).

Za pripravo ribjih jedi je najpomembnejše uporabiti sveže ribe, te pa prepoznamo po naslednjih lastnostih:

- polne, prosojne /bistre/ oči,
- vlažne, svetlo rdeče škrge,
- repna plavut mora biti cela,
- luske naj se tesno prilegajo trupu, sluz je enakomerno razporejena,
- čvrsto in prožno meso, rahel pritisk s prstom ne sme pustiti nobenih sledov,
- svež in prijeten, značilen vonj.

2.4 KEMIJSKA SESTAVA MESA RIB

Meso rib je po kemijski sestavi in hranilni vrednosti podobno mesu klavnih živali in perutnine. V humani prehrani ima ribje meso pomembno vlogo, ker je bogat vir biološko visokovrednih in lahko prebavljivih beljakovin, nenasičenih (tudi esencialnih) maščobnih kislin, vitaminov in mineralov.

Izjemno pestra izbira rib, pridobljenih predvsem z ribolovom (morske, sladkovodne) in vse bolj tudi z vzrejo (akvakultura, marikultura), predstavlja veliko raznolikost sestave in kakovosti njihovega mesa ter številne možnosti njihove predelave in kulinarčne priprave (Žlender, 2000).

Preglednica 1: Približna kemijska sestava mesa sardel in postrvi (Žlender, 2000)

Vrsta	Voda g/100 g	Beljakovine g/100 g	Maščobe g/100 g	Holesterol mg/100 g
Sardela	78,0	15,3	5,2	-
Postrv-šarenka	74,0	19,0	6,0	60

2.4.1 Primerjava kemijske sestave mesa sladkovodnih in morskih rib

V preglednici 2 so navedeni le podatki za tiste vrste rib, ki jih pogosteje najdemo na slovenskem tržišču. Iz njih lahko razberemo, da imajo v povprečju sladkovodne ribe nekoliko več vode in beljakovin od morskih ter manj maščob (Vujković, 1996).

Preglednica 2: Kemijska sestava nekaterih sladkovodnih in morskih rib (g/100 g)

Vrsta ribe	Voda g/100 g	Beljakovine g/100 g	Maščobe g/100 g	Pepel g/100 g
MORSKE RIBE				
Sardela (<i>Sardina pilchardus</i>) _(Kulier, 1996)	73,80	18,40	5,18	1,62
Sardela (<i>Sardina pilchardus</i>) _(Souci, 2000)	74,5	19,4	4,54	1,62
Skuša (<i>Scomber scombrus</i>) _(Kulier, 1996)	68,00	18,70	11,90	1,40
Brancin (<i>Labrax lupus</i>) _(Kulier, 1996)	78,30	18,40	2,01	1,10
Oslič (<i>Merluccius merluccius</i>) _(Kulier, 1996)	80,80	17,20	0,85	1,07
Tun (<i>Thunnus thynnus L.</i>) _(USDA, 2004)	68,09	23,33	4,90	1,18
Pegasti tun (<i>Euthynnus pelamis L.</i>) _(USDA, 2004)	70,58	22,00	1,01	1,30
Rumenoplavuti tun (<i>Thunnus albacares</i>) _(USDA, 2004)	70,99	23,38	0,95	1,34
SLADKOVODNE RIBE				
Soška postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)-NO _(Prošek, 2000)	75,13-76,73	18,70-19,80	0,60-1,37	2,27-2,67
Soška postrv (<i>Salmo marmoratus</i>) _(Prošek, 2000)	66,68-72,40	18,82-19,50	4,79-6,02	1,92-2,23
Kalifornijska p. (<i>Onchorynchus mykiss</i>) _(Prošek, 2000)	70,10-71,22	18,30-19,57	3,12-5,46	1,95-2,10
Krap luskinar (<i>Cyprinus carpio L.</i>) _(Vujković, 1996)	72,93	17,65	8,41	0,97
Sivi tolstolobik (<i>Aristichthys nobilis Val.</i>) _(Vujković, 1996)	77,06	19,14	2,36	1,22

NO-naravno okolje, vse druge sladkovodne ribe so gojene v ribogojnici ali ribniku;

Gojene postrvi imajo optimalnejše pogoje za rast in prehranjevanje od tistih v naravnem okolju, ki ne ponuja vedno optimalnih pogojev za življenje. Kljub temu, da se ribe med seboj razlikujejo znotraj posamezne vrste, sezone, prehrane in drugih dejavnikov, je osnovna kemijska sestava tako sladkovodnih kot morskih rib zelo podobna (Vujković, 1996).

2.4.2 Maščobe

Po kemijski sestavi je meso rib zelo variabilno predvsem v količini maščob, ki je tudi merilo za razvrščanje rib (nemastne do 3 %, srednje mastne do 8 %, mastne nad 8 % maščob).

V literaturi zasledimo več delitev rib glede na količino maščobe:

- ribe uvrščamo med mastne takrat, ko količina maščob preseže več kot 8 %. Exler in sod. (1975) ter Weihrauch in sod. (1977) opredeljujejo ribe kot puste, če vsebujejo pod 5 % maščob in mastne ribe, ko vsebujejo več kot 5 % maščob;
- FSA (2004) označuje za mastne ribe tiste, ki vsebujejo med 5 in 20 % maščob;
- druge delitve razvrščajo ribe, ki imajo nad 15 % maščob, v kategorijo mastni rib.

Ribje maščobe sestavljajo predvsem triacilgliceroli, ki se nalagajo v mišičnini, jetrih in okrog prebavil, ter polarni fosfolipidi v celičnih membranah mišičnega tkiva in mitohondrijih. Ribje maščobe v primerjavi z maščobami klavnih živali vsebujejo veliko več nenasičenih maščobnih kislin, zlasti omega-3, ki so s prehranskega vidika zelo zaželjene. Vsebnost holesterola je v ribjem mesu podobna kot v drugih vrstah mesa (Žlender, 2000).

Slaba stran velike nenasičenosti ribjih maščob pa je občutljivost na oksidacijo med skladiščenjem in predelavo, kar povzroča hitro spremembo arome in barve mesa. Bolj občutljive na kvar so maščobe morskih rib, ker so bolj nenasičene. Stopnja nenasičenosti ribjih maščob je odvisna tudi od vrste rib, letnega cikla, temperature vode in prehrane. Domnevajo, da so v mrzlih vodah maščobe bolj nenasičene (tekoče) zato, da se ribe lažje gibljejo. Nekaterne ribe vsebujejo tudi več naravnih antioksidantov (tokoferol, ubikinon), znano pa je tudi, da so za oksidacijo bolj občutljive maščobe rdečih ribjih mišic, kot pa belih (Žlender, 2000).

2.4.3 Maščobne kisline

Raziskave na področju maščob in MK so jasno pokazale pomembne razlike v sestavi maščob različnega porekla. Ko primerjamo maščobnokislinsko sestavo rib (morskih ali sladkovodnih) hitro ugotovimo, da je precej drugačna od mesa toplokrvnih živali. Razlike so predvsem očitne, ko gledamo skupne količine NMK, ENMK in VNMK. Ribje maščobe vsebujejo med nasičenimi maščobnimi kislinami (NMK) največ palmitinske (C16:0), miristinske (C14:0) in stearinske (C18:0), redkeje se v ribjih maščobah pojavljajo MK z manj kot 14 ogljikovimi atomi in še to v zelo majhnih količinah (Exler in sod., 1975; Ackman, 1992; Vujković, 1996; Bandarra in sod., 1997; Luzia in sod., 2003).

Oleinska (C18:1n-9) in palmitooleinska (C16:1n-7) MK sta enkrat nenasičeni maščobni kislini (ENMK), ki sta prisotni v ribjih maščobah, pojavljata pa se tudi gadoleinska (C20:1n-9) in eruka MK (C22:1n-9) (Bogut in sod., 1996).

Izmed večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) so prisotne MK iz skupin n-3 in n-6 tipa. Arahidonske MK (C20:4n-6) je v ribjem mesu zelo malo. Meso klavnih živali vsebuje več n-6 MK kot meso rib, ki izstopa po količini n-3 MK. Iz skupine n-3 sta najpomembnejši predstavnici EPA (C20:5n-3) in DHA (C22:6n-3), ki sta najpomembnejši MK v ribah (Lobb, 1992).

Preglednica 3: Vsebnost nekaterih MK v lipidih postrvi in sardel (Johansson, 2000)

Maščobna kislina		Vsebnost MK (% od vseh MK)	
		Postrv	Sardela
C14:0	miristinska	4,26	6,09
C16:0	palmitinska	13,03	19,61
C16:1n-7	palmitooleinska	8,54	6,80
C18:0	stearinska	1,95	3,98
C18:1n-9	oleinska	20,26	10,77
C18:2n-6	linolna	4,16	1,33
C18:3n-3	α -linolenska	0,88	4,97
C20:5n-3	EPA	4,46	12,44
C22:5n-3	DPA	1,92	1,63
C22:6n-3	DHA	13,67	16,92
NMK		19,24	33,89
ENMK		53,77	20,83
VNMK		26,94	45,28
n-3		4,61	-
n-6		22,33	-
P/S		1,40	1,34

P/S razmerje je pri ribah tudi do 3-krat večje kot pri drugem mesu in je največkrat več kot 1 (Salobir, 1997).

Z modernim gojenjem rib dobivamo take vrste, ki imajo manjše količine n-3 MK kot ribe, ki rastejo v naravnih rekah, jezerih, morjih (Simopoulos, 2002).

Različno krmljeni brancini v razvoju (različne vrednosti n-3 VNMK v krmi) so različno hitro rasli in imeli različno maščobnokislinsko sestavo mesa. Optimalen dodatek n-3 VNMK v krmi je bil 0,7 g/100 g suhe krme (Skalli in Robin, 2004). Enako Treer in Opačak (1993) poudarjata pomen prehrane rib na maščobnokislinsko sestavo mesa rib, še posebej pomen zadostne oskrbe z α -linolensko MK, ki v vrednosti do 1 % v krmi znatno poveča prirastek in je promotor rasti. Prošek (2000) je ugotovil, da je imela prehrana pomemben vpliv na vsebnost maščob in na maščobnokislinsko sestavo mesa: meso divjih soških postrvi je bilo manj mastno in je imelo bolj ugodno maščobnokislinsko sestavo od gojenih soških in kalifornijskih postrvi.

2.4.4 Beljakovine

Beljakovine so najpomembnejša in po količini najbolj konstantna hranljiva sestavina ribjega mesa (15-24 %). Sestavljajo jih pretežno mišične beljakovine (75 % miofibrilarne, 16-22 % sarkoplazemske) z visoko biološko vrednostjo ter 3-10 % beljakovin veziva (kolagena) (Žlender, 2000).

Po sestavi esencialnih aminokislin so mišične beljakovine ribjega mesa podobne beljakovinam klavnih živali in perutnine, vendar so izredno lahko prebavljive, prav tako pa je tudi ribji kolagen, ki ga je manj kot v mesu klavnih živali, toplotno neobstojeen že pri temperaturi nad 35 °C (goveji in prašičji kolagen hidrolizira šele pri 60 do 70 °C). Beljakovine ribjega mesa tudi zelo hitro zorijo (fermentirajo), kar poleg mehkože žal

spremeni vonj in okus (aromo) v neželjeno smer. Vse to so razlogi, zakaj je ribje meso tako mehko in pri pretirani toplotni obdelavi začne razpadati (Žlender, 2000).

Druge nebeljakovinske dušične snovi so prisotne v ribah (predvsem morskih) v majhnih količinah (okrog 1 %). To so trimetilaminoksid (TMAO), ki se med bakterijskim kvarom rib razgradi v trimetilamin (TMA) in druge snovi, ki so glavni nosilci neprijetne arome pokvarjenih rib. Hrustančnice (morski pes, skat) vsebujejo tudi precej uree (2 %), ki se razgradi v amoniak. Histamini so zdravju škodljive (toksične) dušične snovi, ki se pojavijo med skladiščenjem ohlajenih rib in povzročijo zastrupitev, nastanejo pa z drugimi biogeni amini (putrescin, kadaverin, tiramin) med bakterijskim razkrojem nekaterih aminokislin mišičnih beljakovin (Žlender, 2000).

2.4.5 Sladkorji

V ribjem mesu je manj kot 1 % ogljikovih hidratov, podobno kot v drugih vrstah mesa. Mišični glikogen se po smrti v procesu anaerobne glikolize spreminja v mlečno kislino, posmrtna glikoliza je zaradi manjših rezerv glikogena v ribah razmeroma hitro končana, mlečne kisline je manj kot v mesu drugih živali in zakisanost ribjega mesa je slaba (končni pH 6,4 do 6,8). Razmeroma visok pH ribjega mesa je razlog za njegovo slabo mikrobiološko stabilnost oz. hitro pokvarljivost, zato je treba ribe takoj po ulovu čim hitreje ohladiti na temperaturo okrog 0 °C in jih pri tej temperaturi držati do porabe (5 do največ 7 dni) (Žlender, 2000).

2.4.6 Mineralne snovi, vitamini

Meso rib vsebuje več mineralnih snovi kot meso toplokrvnih živali, izstopa predvsem po količini fosforja, magnezija, natrija, žvepla, ter še posebej po količini kalcija (Plestenjak in Repič, 1988). Vrednosti variirajo med 0,9 in 1,7 % (Bogut in sod., 1996) pa tudi več. Zato je ribje meso bolj primerno za prehrano odraščajočih otrok kot meso klavnih živali (Bogut in sod., 1996; Vujković, 1996). Tudi selena vsebujejo ribe veliko. Skupaj z vitaminom E delujeta sinergistično in zato antioksidacijsko ter tako zavirata nastanek rakastih obolenj (Perović, 2000). Sladkovodne ribe so bolj bogate na mikroelementih boru, bromu in litiju, železa pa vsebujejo vse vrste rib veliko manj kot ga je v rdečem mesu (govedina, konjetina, ovčatina) (Žlender, 2000).

Vitaminov, topnih v maščobah (A, D, E, K) v ribjem mesu ni veliko, so pa ribe pomemben vir v vodi topnih vitaminov B-kompleksa (tiamina–B1, riboflavina–B2, piridoksina–B6 in B12) (Žlender, 2000).

2.5 MAŠČOBE IN MAŠČOBNE KISLINE

Naravni lipidi so kemijsko različne skupine snovi, katerim je skupna lastnost netopnost v vodi. Biološka funkcija lipidov je zelo različna, enako kot njihova kemijska struktura. Glavni obliki shranjevanja maščob v mnogih organizmih sta v obliki masti in olj. Fosfolipidi in steroli so glavni gradniki celične membrane. Drugi specializirani lipidi, četudi prisotni v majhnih količinah, imajo odločilno vlogo kot encimski kofaktorji (vitamin K), pigmenti (retinal, karoten), emulgatorji v prebavnem traktu, hormoni (derivati vitamina D, spolni hormoni) ter znotraj in zunajcelični prenašalci-eikozanoidi (Nelson in Cox, 2005).

Masti in olja so triacilgliceroli oz. estri glicerola z maščobnimi kislinami. MK so karboksilne kisline s 4 do 36 ogljikovih atomov.

Enostavni triacilgliceroli so zgrajeni iz treh enakih maščobnih kislin, ki je vsaka estersko vezana z glicerolom. Večina naravnih triacilglicerolov je mešanih estrov, z dvema ali več različnimi maščobnimi kislinami.

Ker so polarne hidroksilne skupine glicerola in polarne karboksi skupine maščobnih kislin povezane v estersko vez, so triacilgliceroli nepolarne, hidrofobne molekule, ki so netopne v vodi (Nelson in Cox, 2005).

Naravne maščobe gradijo maščobne kisline z večinoma razvejano verigo in s sodim številom ogljikovih atomov. Alkilna veriga je lahko popolnoma nasičena in vsebuje le enojne vezi ali pa nenasičena ter vsebuje eno ali več dvojnih vezi. Pri enkrat nenasičenih maščobnih kislinah je dvojna vez locirana med devetim in desetim ogljikovim atomom. Če molekula maščobnih kislin vsebuje več dvojnih vezi, se te nahajajo med končno metilno skupino in devetim ogljikovim atomom (Nelson in Cox, 2005).

Maščobe kopenskih živali vsebujejo višji delež nasičenih maščobnih kislin in so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Rastlinsko in ribje olje vsebuje več nenasičenih maščobnih kislin in je pri sobni temperaturi tekoče (Love, 1997).

Maščobne kisline so razvrščene v družine, znotraj katerih so biosintetsko povezane. S pomočjo encimskih procesov, nenasičevanja, podaljševanja in skrajševanja verig, se pretvarjajo ena v drugo (Lobb, 1992). So bogat vir energije, aktivno vključene v metabolizem, sestavine bioloških membran, VNMK pa imajo specifično funkcijo regulatorjev in sodelujejo pri sintezi biološko aktivnih snovi.

Priporočila o vnosu maščob se z leti spreminjajo in dopolnjujejo. Enostransko zmanjševanje maščob na jedilniku ni vedno najboljše. Priporočljivo je uravnoteženo uživanje pravih maščob, kar pomeni manj nasičenih maščobnih kislin in *trans* – maščobnih kislin ter več enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin.

Najpomembnejše maščobne kisline so (Salobir, 2001):

- ENMK: oleinska kislina (C18:1, n-9),
- n-6 VNMK: linolna kislina (LK; C18:2, n-3),
- n-3 VNMK : - α -linolenska kislina (ALK; C18:3, n-3),
-eikozapentaenojska kislina (EPK; C20:5, n-3),
-dokozaheksaenojska kislina (DHK; C22:6, n-3).

Oleinska kislina je najbolj razširjena v naši prehrani. Je pomemben vir energije in sestavina membranskih lipidov, vendar ni esencialna tako kot LK in ALK, ki sta nujno potrebni za rast in razvoj ter vzdrževanje zdravja.

EPK in DHK sta dolgoverižni večkrat nenasičeni MK, ki ju vsebujejo mastne ribe in nekateri drugi morski plodovi (npr. alge). Organizem ju lahko v manjši meri sintetizira iz ALK, na učinkovitost pretvorbe vpliva tudi razmerje zaužitih n-3 in n-6 MK. DHK je pomembna funkcionalna sestavina celičnih membran in živčnega tkiva, možganskih in retinalnih lipidov. EPK je prekurzor bioaktivnih sestavin, ki uravnavajo pretok krvi in imunski odziv (Field, 2003).

2.5.1 Esencialne maščobne kisline

Esencialne MK ali njihovi derivati so snovi, ki jih potrebujemo za normalno rast in razvoj ter jih naše telo ne more sintetizirati oz. jih sintetizira v premajhni količini. Tako sta pravi esencialni MK linolna in α -linolenska.

Obe esencialni MK sta potrebni za izgradnjo in normalno funkcioniranje celičnih membran in kot predstopnja eikozanoidov, ki imajo zelo pomembno vlogo pri uravnavanju intenzivnosti fizioloških procesov (Salobir, 2001). Zato je prisotnost esencialnih MK odločilna. Iz njiju nastajajo arahidonska (C20:4n-6) in EPA (C20:5n-3), ki sta matični sestavini za produkcijo eikozanoidov (Simopoulos, 2002). Brez npr. vira arahidonske MK (C20:4n-6) bi bila sinteza prostaglandinov ogrožena, kar bi resno vplivalo na normalne metabolične procese (Tapiero in sod., 2002).

Linolna (C18:2n-6) in α -linolenska MK (C18:3n-3) tekmujeta med seboj za skupne encime. Linolna MK (C18:2n-6) bolje izrabi skupne encime od α -linolenske (C18:3n-3) in se tako v organizmih sesalcev tvori več produktov linolne MK (C18:2n-6) (de Lorgeril in sod., 2001; Kupnik, 2001; Seppänen-Laakso in sod., 2002).

DHA (C22:6n-3), ki nastaja iz α -linolenske MK (C18:3n-3), in arahidonska MK (C20:4n-6), ki nastaja iz linolne MK (C18:2n-6), sta bistveni za razvoj centralnega živčnega sistema pri sesalcih, saj približno 60 % možganskega tkiva predstavljajo maščobe, izmed katerih je največ VNMK in holesterola. Najpomembnejši in najpogostejši MK v živčnem tkivu in izredno pomembni za razvoj osrednjega živčevja pri plodu in otroku (še posebej v zadnjem trimesečju nosečnosti in prvih mesecih po rojstvu) sta DHA (C22:6n-3) in arahidonska MK (C20:4n-6) (Kupnik, 2001).

2.5.2 Razmerje med n-6 in n-3 maščobnimi kislinami

Ko je bil človek pred 10.000 leti še nabiralec in lovec je bila prehrana popolnoma drugačna, razmerje med n-6/n-3 MK je bilo okoli 1. V današnji t.i. zahodni prehrani je to razmerje od 15/1 do 16/1. Intenzivno kmetijstvo je privedlo do povečanja n-6 MK v hrani, medtem ko so naši geni programirani tako, da se odzivajo na razmerje n-6/n-3 okoli 1. Pretirane količine n-6 VNMK in veliko razmerje n-6/n-3 v zahodni prehrani pospešujejo nastanek veliko bolezni: kardiovaskularnih, raka, vnetnih in avtoimunskih bolezni, medtem ko povečane količine n-3 VNMK in majhno n-6/n-3 razmerje kažejo zaviralen učinek (Simopoulos, 2002).

WHO (1994) je pred leti pripravila priporočila tudi o oskrbi z esencialnimi MK: razmerje med n-6 in n-3 MK naj bo med 5:1 do 10:1. Če osebe uživajo prehrano z večjim razmerjem kot 10:1, jih je treba vzpodbujati, da uživajo več hrane bogate z n-3 MK, kot so zelena listnata zelenjava, stročnice, ribe in druga hrana iz morja.

Preventivna prehrana pri kardiovaskularnih boleznih z razmerjem 4:1 je povezana s padcem skupne umrljivosti za 70 %. Razmerje 2,5:1 zmanjša rast rakastih rektalnih celic, medtem ko razmerje 4:1 z enako količino n-3 VNMK ni imelo učinka. Manjše razmerje med n-6 in n-3 v hrani pri ženskah z rakom na dojki je bilo povezano z manjšim tveganjem. Razmerje 2:1 - 3:1 zavira vnetja pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, razmerje 5:1 ima dobrodejne učinke na bolnike z astmo, medtem ko ima razmerje 10:1 obratne posledice. Tako velja, da so terapevtske doze n-3 MK odvisne od stopnje resnosti bolezni, ki so genetsko pogojene. Nižje razmerje med n-6 in n-3 MK je primernejše pri zmanjševanju tveganja za mnoge kronične bolezni, ki so razširjene v zahodnem svetu in v državah v razvoju in se širijo v preostali svet (Simopoulos, 2002).

2.5.3 Razmerje P/S, indeks aterogenosti

Za oceno primernosti maščob uporabljamo razmerje med VNMK in NMK, ki ga označimo kot P/S razmerje. Kadar imajo posamezne maščobe P/S razmerje manjše od 0,5, so manj primerne za prehrano ljudi, saj se pri takih maščobah poveča tveganje za kardiovaskularna obolenja. Pri tem je pomembno, koliko maščob posamezno meso vnaša v obrok in s tem vpliva na razmerje maščobnih kislin v skupnem obroku. S pustim mesom vnesemo le malo maščob in tako malo vplivamo na skupno razmerje MK. Razmerje P/S je sorazmerno staro in je iz časa, ko ugoden vpliv ENMK na nivo holesterola v krvi in na pogostnost bolezni obtočil še ni bil znan.

V novejšem času namesto razmerja P/S uporabljamo indeks aterogenosti (IA). Postavila sta ga Ulbricht in Southgate leta 1991 (Salobir, 1997) in tako pravičneje ocenila kakovost maščob z vidika zdravja. Indeks aterogenosti upošteva specifične vplive posameznih MK na koncentracijo holesterola v krvi. Pri izračunu indeksa aterogenosti upoštevamo MK, ki povečujejo koncentracijo holesterola v krvi (lavrinska, miristinska, palmitinska in *trans*-MK) ter VNMK, oleinsko MK (C18:1n-9) in druge ENMK, ki koncentracijo holesterola zmanjšujejo. Ker je vpliv miristinske MK (C14:0) najmočnejši, ga pomnožimo s faktorjem 4 (Salobir, 1997).

$$IA = \frac{\text{lavrinska MK (12 : 0)} + 4 * \text{miristinska MK (14 : 0)} + \text{palmitinska MK (16 : 0)} + \text{trans - MK}}{\text{VNMK} + \text{oleinska MK (18 : 1)} + \text{druge ENMK}}$$

S prehranskega stališča so ugodne maščobe, ki imajo IA manjši od 0,5.

2.5.4 *Trans*- maščobne kisline

Trans - MK niso zdravju primerne iz več razlogov:

- povečujejo količino lipoproteinov z majhno gostoto (LDL),
- povečujejo telesno maso,
- zmanjšujejo ali zavirajo vključevanje drugih MK v celično membrano,
- zmanjšujejo količino lipoproteinov z veliko gostoto (HDL),
- zavirajo delovanje $\Delta 6$ -desaturaze (oviranje podaljševanja in desaturacije esencialnih MK: arahidonske (C20:4n-6), EPA (C20:5n-3) in DHA (C22:6n-3),
- zmanjšujejo maso novorojenčkov in drugo (Kupnik, 2001; Simopoulos, 2002; Nelson in Cox, 2005).

Večina v naravi prisotnih nenasičenih MK ima dvojno vez v *cis*-konfiguraciji. *Trans*-izomere maščobnih kislin naj bi bile razlog povečanja količine lipoproteinov z majhno gostoto ali slabega LDL holesterola in razlog zmanjšanja lipoproteinov z veliko gostoto ali dobrega HDL holesterola. Zato *trans*-izomere MK veljajo kot dejavnik tveganja pri nastanku bolezni srca in ožilja. V manjših količinah so prisotne v mlečnih izdelkih, mesu, masti, margarini in hidrogeniranih rastlinskih oljih (pri hidrogenaciji nastajajo *trans*-MK) (Nelson in Cox, 2005).

2.6 HOLESTEROL IN OKSIDI HOLESTEROLA

2.6.1 Holesterol

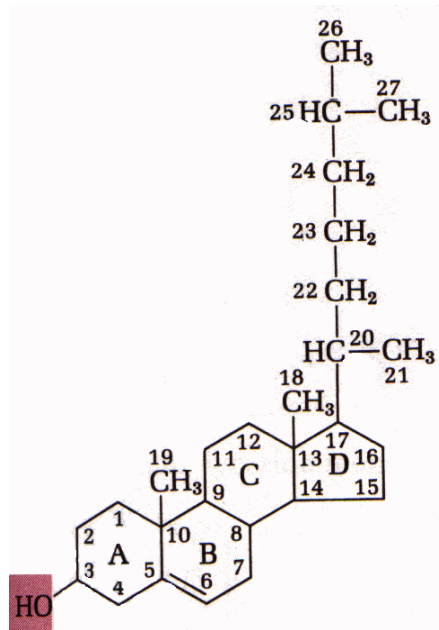
Holesterol je lesketajoča, bela, kristalinična snov. Najprej so ga odkrili v žolčnih kamnih in njegovo ime izhaja iz grških besed *kholé*, kar pomeni žolč in *stereos*, kar pomeni trdno.

Holesterol ne sodi med metabolična goriva tako kot triacilgliceroli, ampak je sestavina membran in izhodna spojina za sintezo žolčnih soli, steroidnih hormonov idr. Holesterol v človekovi prehrani je predvsem v maščobah živalskega izvora, žolču, živčnih tkivih, krvi, možganih, jajčnem rumenjaku in plazmi.

Določanje holesterola v živilih in serumu ima pomembno vlogo zaradi vpletenosti v etiologijo ateroskleroze in bolezni srca in ožilja (Arnold in Kwiterovich, 2003).

2.6.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti holesterola

Holesterol je alkohol, ki ga zaradi lipidnega značaja prištevamo k lipidom, kljub temu da se strukturno precej razlikuje. Kemijsko ga uvrščamo v skupino sterolov, sodi med neumljive snovi. Z višjimi maščobnimi kislinami lahko tvori estre preko OH skupine. Ima eno samo dvojno vez, na katero se lahko vežeta dva atoma halogena. Empirična formula molekule je $C_{27}H_{45}OH$, kemijsko pa ga poimenujemo holest-5-en-3 β -ol (slika 3). Molekulska masa holesterola je 386,7 g/mol. Temperatura tališča za brezvodni holesterol je 148,5 °C, temperatura vrelišča pa 360 °C pri tlaku 1 atm (Sheppard in sod., 1993; Hegarty, 1995).



Slika 3: Holesterol (holest-5-en-3β-ol) (Chandan, 1997)

Holesterol ima na enem koncu steroidno ogrodje s hidroksilno skupino (glava) in na drugem fleksibilen, kratek, nepolaren ogljikovodikov konec (rep). Takšna zgradba vpliva na njegove lastnosti (Chandan, 1997).

Holesterol se praktično ne topi v vodi in zelo slabo v etanolu. Močno je topen v nepolarnih topilih, kot so eter, kloroform, piridin, benzen, heksan, petroleter (preglednica 4). Topi se še v oljih, maščobah in vodnih raztopinah žolčnih soli. Kristalizira se iz absolutnega alkohola, očetne kisline in etra v obliki brezbarvnega romba (Sheppard in sod., 1993).

Preglednica 4: Topnost holesterola v različnih topilih (Shepard in sod., 1993)

Topilo	Topnost (mg/100 ml)
voda	0,2
alkohol (20 °C)	1,29
96 % alkohol (80 °C)	28000
kloroform	22222
eter	35714
piridin	66667

2.6.1.2 Vloga holesterola v organizmu

V človeškem organizmu ima holesterol pomembno vlogo, saj je:

- glavna komponenta celične membrane, ki določa njeno permabilnost in fluidnost,
- sestavni del žolčnih kislin, ki vplivajo na razgradnjo in absorpcijo maščob,
- prekursor steroidnih hormonov v korteksu nadledvične žleze, v spolnih hormonih in vitaminu D,
- esencialen za rast in razvoj mladih sesalcev.

Holesterol v človeškem organizmu predstavlja približno 0,2 % celotne človeške mase. V črevesje pride holesterol iz hrane (v povprečju prispeva 300-400 mg dnevno), žolča (prispeva 750-1250 mg dnevno) in črevesne stene (minimalen prispevek).

V telesu povprečnega odraslega človeka je približno 150 g holesterola. Za nadomeščanje fekalnih in drugih izgub pa ga mora organizem dnevno sintetizirati od 700 do 1500 mg (Sieber, 1993).

V krvi so maščobe v lipoproteinih, sestavljene iz hidrofobnega jedra triacilglicerolov in estrov holesterola, obdanih s plaščem apoproteinov, fosfolipidov in prostega holesterola.

Lipoproteini so glede na centrifugalno usedanje in hitrost elektroforeze razvrščeni v štiri kategorije:

- hilomikroni, ki so največji in najlažji (sestavljene so iz 80 - 95 % triacilglicerolov, 2 - 7 % holesterola, 3 - 6 % fosfolipidov in 1 - 2 % beljakovin) in prenašajo dietne maščobe iz črevesja v limfo, ter preko tkiv v jetra, kjer jih odložijo;
- lipoproteini zelo nizke gostote ali VLDL (55-65 % triacilglicerolov, 10-15 % holesterola, 15-20 % fosfolipidov in 5-10 % beljakovin) prenašajo endogeno nastalo maščobo iz jeter;
- lipoproteini nizke gostote ali LDL (10 % triacilglicerolov, 45 % holesterola, 22 % fosfolipidov in 45-50 % beljakovin) nastanejo z razpadom VLDL;
- lipoproteini visoke gostote ali HDL (20 % holesterola, 30 % fosfolipidov in 45-50 % beljakovin) se izločajo iz jeter in črevesja (Arnold in Kwiterovich, 2003).

LDL in HDL so glavni prenašalci holesterola. LDL (prenašalec škodljivega holesterola), prenaša holesterol na periferijo (iz mesta sinteze v jetrih na mesto porabe), HDL (prenašalec koristnega holesterola) pa ga prenaša v jetra, kjer se razgradi (Popsil, 2000).

2.6.1.3 Metabolizem holesterola

Metabolizem holesterola je kompleksen. Holesterol zaužijemo s hrano (eksogeni holesterol), sintetizira pa se tudi v celicah (endogeni holesterol). Porast nivoja holesterola v krvi nastane zaradi visokega vnosa živil, bogatih s holesterolom, nasičenih maščob ali presežka kalorij. Največ endogenega holesterola se tvori v jetrih. Sinteza je regulirana z vnosom eksogenega holesterola, z biosintezo holesterola, sekrecijo holesterola iz plazemskih lipoproteinov, s pretvorbo holesterola v žolčne soli in ponovnim kroženjem žolčnega holesterola iz črevesja v jetra. Jetra so vključena tako v samo sintezo kot tudi v predelavo holesterola in ostalih lipidov, ki se absorbirajo iz živil.

Dnevno se v telesu odraslega človeka sintetizira 9 mg holesterola na kilogram telesne mase, in sicer največ v jetrih, sledijo prebavni trakt, koža, progaste mišice in kostni mozeg. Holesterol v intestinalnem lumnu izvira iz zaužite hrane (250 do 500 mg) in žolča (600 do 1000 mg). Iz hrane se absorbira približno 50 % holesterola. Na LDL holesterol v krvi vplivajo dietni holesterol, nasičene maščobe, sinteza v celicah in zamenjava oz. kroženje holesterola. Nasičene maščobne kisline s 14 ali 16 ogljikovimi atomi vplivajo na porast nivoja škodljivega holesterola, večkrat nenasičene maščobne kisline pa nivo znižujejo.

Holesterol in njegovi metaboliti se izločajo v obliki žolčnih soli v črevesju, kjer se deloma resorbirajo preko enterohepatičnega kroženja. Sterolni obroč se s pomočjo različnih encimov v jetrih metabolizira v v vodi topno obliko, ki olajša izločanje (Arnold in Kwiterovich, 2003).

2.6.2 Oksidi holesterola

Oksidi holesterola spadajo v skupino sterolov in so toksične spojine. Molekula holesterola vsebuje dodatno funkcionalno skupino – hidroksilno ali epoksidno.

Nahajajo se v lipoproteinski frakciji limfe in krvi. Obstaja velika verjetnost, da sodelujejo pri etiologiji in razvoju bolezni srca in ožilja, aterogenezi in rakastih obolenjih, čeprav njihova vloga in mehanizem delovanja še nista povsem pojasnjena.

Do danes so odkrili več kot 80 različnih oksidov holesterola. V živilih so najbolj razširjeni 7-ketoholesterol, 6-ketoholesterol, 7 α -hidroksiholesterol, 7 β -hidroksiholesterol, 5,6 α -epoksiholesterol, 5,6 β -epoksiholesterol, 25-hidroksiholesterol, 20-hidroksiholesterol in holestantriol (Boselli in sod., 2001).

Presna, nepredelana živila vsebujejo zelo nizke koncentracije oksidov holesterola, s skladiščenjem, termično obdelavo in predelavo pa njihova vsebnost naraste. Nekateri oksidi holesterola lahko nastanejo endogeno v tkivih med samo pretvorbo holesterola v žolčne kisline in steroidne hormone.

Živila z visoko vsebnostjo holesterola (jajca, mlečni in mesni izdelki) so podvržena avtooksidaciji in/ali encimski oksidaciji, tvorijo se oksidi holesterola. Nastanejo lahko med samo pripravo živil, ki so izpostavljena toploti, svetlobi, zraku, radiaciji, eden od možnih vzrokov pa je tudi neprimerno skladiščenje.

Glavni dejavniki, ki vplivajo na tvorbo oksidov holesterola so torej: visoka temperatura, pH, svetloba, kisik, vodna aktivnost in prisotnost nenasičenih maščobnih kislin (Toschi in Caboni, 1992; Tai in sod., 1999; Razzazi-Fazeli in sod., 2000)

Nekateri oksidi holesterola imajo nezaželene biološke učinke na encimskem, celičnem ali tkivnem nivoju: inhibirajo biosintezo holesterola, delujejo mutageno, citotoksično in angiotoksično, kar lahko povzroči bolezni, kot sta ateroskleroza in rak.

Težavo pri določanju v živilih predstavlja dejstvo, da se lahko sintetizirajo umetno, med samo pripravo vzorca: z umiljanjem pri visoki temperaturi (80 °C, 15 min) ali z umiljanjem pri sobni temperaturi 10-12 ur (Boselli in sod., 2001).

Podatki v literaturi o vsebnosti oksidov holesterola v istovrstnih živilih se močno razlikujejo, zato so med seboj težko primerljivi. Njihova kvantitativna določitev je problematična, saj izolacijo posameznega oksida holesterola ovira bistveno višja vsebnost holesterola, triacilglicerolov, fosfolipidov in ostalih lipidov v živilu (Toschi in Caboni, 1992; Tai in sod., 1999; Razzazi-Fazeli in sod., 2000).

2.6.2.1 Oksidacija holesterola

Oksidacija holesterola je podobna oksidaciji lipidov (Boselli, 2001). Sprožita jo prisotnost kisika pri povišani temperaturi in/ali svetloba. Rezultat je oksidacija ali fotooksidacija.

Hitrost oksidacije je naslednja: VNMK>ENMK>NMK>holesterol.

Hidroperoksidi VNMK, ki nastanejo med oksidacijo lipidov, sprožijo tudi oksidacijo holesterola, ki napreduje podobno kot oksidacija maščobnih kislin. Sam holesterol je

stabilen tudi pri visokih temperaturah, kadar pa holesterol segrevamo v prisotnosti triacilglicerolov, nastanejo različni produkti razgradnje. Vsi običajni holesterol oksidi so produkt holesteril esterske oksidacije, vendar pa bistveno kasneje nastanejo v prisotnosti nasičenih maščob.

VNMK (sojino, sončnično, ribje olje) oksidirajo hitreje. Pri segrevanju ribjega olja se holesterol razgradi že po eni uri. Obstaja torej velika verjetnost, da se holesterol v živilih oksidira v prisotnosti maščob (Lercker in sod., 2001; Toschi in Caboni, 1992).

Avtooksidacija nenasičenih maščobnih kislin se sproži na osmem (C-8) ali enajstem (C-11) ogljikovem atomu, pri holesterolu pa na sedmem (C-7) atomu, z odcepitevijo vodika, ki ji sledi spajanje z molekulo kisika.

Primarna produkta oksidacije, ki nastaneta zaradi segrevanja in po odcepitevi –OOH skupine, sta 7 α -hidroksiholesterol, 7 β -hidroksiholesterol ali pa 7-ketoholesterol, ki nastane med segrevanjem z dehidracijo. 7-ketoholesterol lahko nastane tudi z dehidrogenacijo ob prisotnosti radikalov. 5,6 α -epoksiholesterol in 5,6 β -epoksiholesterol se tvorita z avtooksidacijo pri pH vrednosti 8, po treh urah. V prisotnosti O ali O₃ molekule, nastanejo hidroperoksidi in ne epoksiholesteroli. Kadar je holesterol v kristalinični obliki, v raztopini ali disperziji, se tvorijo epoksidi. V kislem mediju se oba epoksiholesterola pretvorita v triol, ki je toksičen. Ob prisotnosti kisika na C-20 in C-25 položaju nastane 20- hidroksiholesterol in 25-hidroksiholesterol, vendar le v primeru, če je holesterol v kristalinični obliki, ne pa v raztopini (Tai in sod., 1999).

2.7 VPLIV HOLESTEROLA IN VEČKRAT NENASIČENIH DIETNIH MAŠČOB NA ZDRAVJE

Visok nivo skupnega holesterola in LDL holesterola ter nizek nivo HDL holesterola, sta dejavnika povezana s tveganjem za razvoj bolezni srca in ožilja. Na nivo holesterola v krvi vplivajo tudi dietne večkrat nenasičene maščobe in sicer:

- NMK zvišujejo nivo skupnega holesterola in LDL holesterola,
- ENMK znižujejo nivo skupnega holesterola in LDL holesterola,
- VNMK znižujejo nivo skupnega holesterola in LDL holesterola (njihov učinek na lipide v krvi je mnogo močnejši v primerjavi z ENMK),
- *Trans* MK zvišujejo skupni holesterol in LDL holesterol ter znižujejo HDL.

Hehsted in Keys s sod. sta že leta 1965 opisala vpliv VNMK maščob in posameznih maščobnih kislin na nivo skupnega holesterola v krvi. Kasneje so izračune dopolnili z vplivom maščobnih kislin na LDL in HDL holesterol. V začetku so merili absolutno spremembo LDL holesterola, modificirana Hegstedova enačba pa je preračunana na odstotek spremembe LDL holesterola na osnovi povprečne vrednosti (Schaefer, 2002).

Schaefer (2002) navaja naslednje vrednosti:

- vsak odstotek zmanjšanja energije na račun NMK prispeva k zmanjšanju LDL holesterola za 1,34 %,
- vsak odstotek povečanja energije na račun VNMK prispeva k zmanjšanju LDL holesterola za 0,59 %,
- če dnevno zaužijemo 100 mg holesterola manj, se zmanjša LDL holesterol za 3,3 %.

Rezultati raziskav opozarjajo na dejstvo, da se morajo prehranska priporočila, ki omejujejo uživanje maščob, olj in sladkorja, dopolniti. Ni pomembna le količina dietnih večkrat nenasičenih maščob, pomembna je tudi izbira pravih maščob (Pokorn, 2000).

2.7.1 Vpliv nasičenih MK na koncentracijo holesterola v krvi

V prehrani sodobnega človeka pokrivajo NMK od 12 do 15 % dnevni potreb po energiji. Najpogosteje zastopana je palmitinska kislina (C16:0), sledijo ji stearinska (C18:0), miristinska (C14:0) in laurinska kislina (C12:0). Seveda ne vplivajo vse NMK na koncentracijo holesterola v krvi v enaki meri. Pri zviševanju holesterola sta najbolj učinkoviti miristinska in palmitinska kislina. Stearinska kislina ima zelo majhen vpliv na plazemski holesterol, kar lahko pripišemo njeni pretvorbi v oleinsko kislino (C18:1n-9). NMK povzročijo porast škodljivega LDL holesterola, vendar mehanizem delovanja še ni pojasnen. Predvidevajo, da ovirajo ekspresijo LDL receptorjev (Grundy, 2003).

2.7.2 Vpliv nenasičenih MK na koncentracijo holesterola v krvi

Glavna ENMK v prehrani je oleinska kislina, ki pokriva 10-20 % dnevni potreb po energiji. V zgodnjih raziskavah iz leta 1960 so ugotavljali, da so ENMK, prav tako kot ogljikovi hidrati, nevtralne, torej brez vpliva na koncentracijo holesterola v plazmi. Kasnejše raziskave so dokazale, da ENMK v primerjavi z NMK, ne znižujejo LDL in HDL holesterola, mnogo bolj učinkovite so VNMK. Živila, ki vsebujejo NMK, vsebujejo tudi ENMK. Vsebnost NMK in ENMK v prehrani je podobna in kadar načrtno zmanjšamo količino NMK, se zmanjša tudi količina ENMK (Schaefer, 2002).

Rezultati raziskav kažejo, da manj nasičenih maščob v prehrani zmanjšuje tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja, n-3 maščobne kisline pa imajo varovalni učinek. Najbolj natančne informacije o vplivu MK na krvne lipide in lipoproteine izvirajo iz humanih metaboličnih raziskav. MK ne moremo kar na splošno razvrstiti v dve skupini, in sicer na tiste, ki znižujejo, in tiste, ki zvišujejo nivo holesterola. Pomembna je tudi količina energije, ki jo posamezne maščobe prispevajo v vsakodnevni prehrani, in sicer v primerjavi z ostalimi hranilnimi snovmi (Simopoulos, 2002).

2.8 METODE DOLOČANJA VSEBNOSTI HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA

2.8.1 Metode določanje vsebnosti holesterola

Določanje vsebnosti holesterola v živilih je postalo pomembno zaradi povezave holesterola z nastankom ateroskleroze in koronarne srčne bolezni.

Vsebnost holesterola v živilih se lahko določa z tankoplastno kromatografijo, kolorimetrično metodo, encimsko metodo ter tekočinsko in plinsko kromatografijo v kombinaciji z masno spektrometrijo in nuklearno magnetno resonanco. Najpogosteje se uporabljata metodi plinske in tekočinske kromatografije, predhodno pa je potrebno pripraviti vzorec z umiljanjem in ekstrahiranjem.

Večina metod za določanje holesterola v živilih temelji na principu ekstrakcije skupnih lipidov, odstranitvi topila, umiljanju lipidov, ekstrakciji neumiljenih komponent (sem spada holesterol) z organskim topilom, nekatere metode pa zahtevajo tudi derivatizacijo, na koncu pa se vsebnost holesterola določi z GC oz. HPLC (Naemi in sod., 1995).

Arneth W. in sod. (1995) so določevali vsebnost holesterola v mišičnem in adipoznem tkivu s HPLC metodo po predhodni ekstrakciji holesterola (estrov) iz vzorca, odcepitvi holesterola iz holesterol estrov (umiljanje), ekstrakciji holesterola s heksanom, vodenju faze heksana na Silica kolono (ločitev molekul holesterola iz faze heksana ter od morebitno prisotnih komponent, ki bi bile moteče pri identifikaciji holesterola s HPLC analizo).

AOAC uradno potrjena metoda iz leta 1999 za določanje holesterola v živilih, je metoda s plinsko kromatografijo, kjer je predhodno potrebno izvesti ekstrakcijo skupnih lipidov in nato umiljanje. Metoda določanja holesterola z neposrednim umiljanjem lipidov pa je podana v (Cholesterol in foods, 1994; Cholesterol in multicomponent foods, 1999).

Naemi in sod. (1995) so objavili hitro in enostavno metodo za določanje holesterola in rezultate primerjali z AOAC. Umiljanje in ekstrakcija holesterola se izvedeta zaporedno v isti epruveti. V supernatantu se nahaja ekstrahirani holesterol, ki se ga analizira z GC. Podatki so bili primerljivi!

Piironen in sod. (2002) so določevali vsebnost holesterola z GC v vzorcih mesa, rib, mleka, jajc in jajčnih proizvodov, in sicer po direktnem umiljanju, ekstrakciji neumiljenih komponent s cikloheksanom in po derivatizaciji.

Študija po Bao-Shyung-u s sod. (2002) opisuje določanje holesterola v masti in olju z uporabo GC, s predhodnim AOAC umiljanjem, BF₃ metilacijo ter ekstrakcijo metiliranih komponent. Rezultati analize so bili brez značilnih razlik, manjša poraba topila in krajši čas analize so razlog za uporabo te metode namesto AOAC.

2.8.2 Metode določanja vsebnosti oksidov holesterola

Določanje oksidov holesterola je problematično zaradi njihove majhne vsebnosti v živilih. Uporabljajo se metode tenkoplastne, tekočinske in plinske kromatografije v kombinaciji z masno spektrometrijo in nuklearno magnetno resonanco.

Večina avtorjev meni, da TLC metoda ni primerna za kvantitativno analizo zaradi nizke občutljivosti in slabe resolucije. Kvantitativna določitev je omejena, negativno pa vpliva (zaradi velike površine) tudi izpostavljenost kisiku, ki lahko pospeši avtooksidacijo med samo analizo.

Najpogosteje se uporabljata metodi plinske in tekočinske kromatografije; tekočinska poteka pri sobni temperaturi, plinska pa pri visoki temperaturi. Vzorce pripravimo z umiljanjem in ekstrakcijo. Številni avtorji ugotavljajo, da daje boljše rezultate hladno umiljanje, ki je časovno manj ugodno.

Pravilnost rezultatov analiziranih oksidov holesterola v vzorcih živil je vprašljiva, saj le-ti lahko nastanejo ali razpadejo med samo analizo:

- triol je razpadni produkt obeh epoksiholesterolov
- posledica umiljanja je lahko razpad 5,6 α -epoksiholesterola ali 7-ketoholesterola (Tsai in Hudson, 1985; Tai in sod., 1999)
- posledica umiljanja je lahko nastanek 20 ppm epoksidov (Fischer in sod., 1985)

Vsebnost oksidov holesterola v živilih običajno predstavlja 1 %, v staranih živilih pa celo do 10 % skupnega holesterola (Sarantinos in sod., 1993).

Garcia in Maraschiello (1996) v svoji študiji opisujeta metodo določanja osmih oksidov holesterola v puranju mesa. Metoda temelji na koncentriranju oksidov holesterola z uporabo ekstrakcije s trdno fazo (SPE, solid-phase extraction) in tankoplastne kromatografije. Skozi Silica kolono se vodi lipidni del (v katerem se nahajajo tudi oksidi holesterola), ki je produkt predhodno izvajane ekstrakcije po Folch-u. Oksidi holesterola se določajo s plinsko kromatografijo s predhodno izvedeno derivatizacijo (trimetilsilil etri).

Vicente in sod. (2005) v svoji študiji opisujejo določanje štirih bistvenih produktov oksidacije holesterola (7 β -hidroksiholesterol, 7 α -hidroksiholesterol, 7-ketoholesterol, 25-hidroksiholesterol) ter določanje holesterola in vode v odvisnosti od toplotne obdelave. Princip določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola je ekstrakcija določenih komponent (holesterola, oksidov holesterola), tretiranje osušenega ekstrakta z mešanico kloroforma in metanola ter destilirano vodo, filtracija organske faze, sušenje filtrata in raztapljanje suhega organskega ostanka v mobilni fazi, ter analiziranje vsebnosti komponent s HPLC.

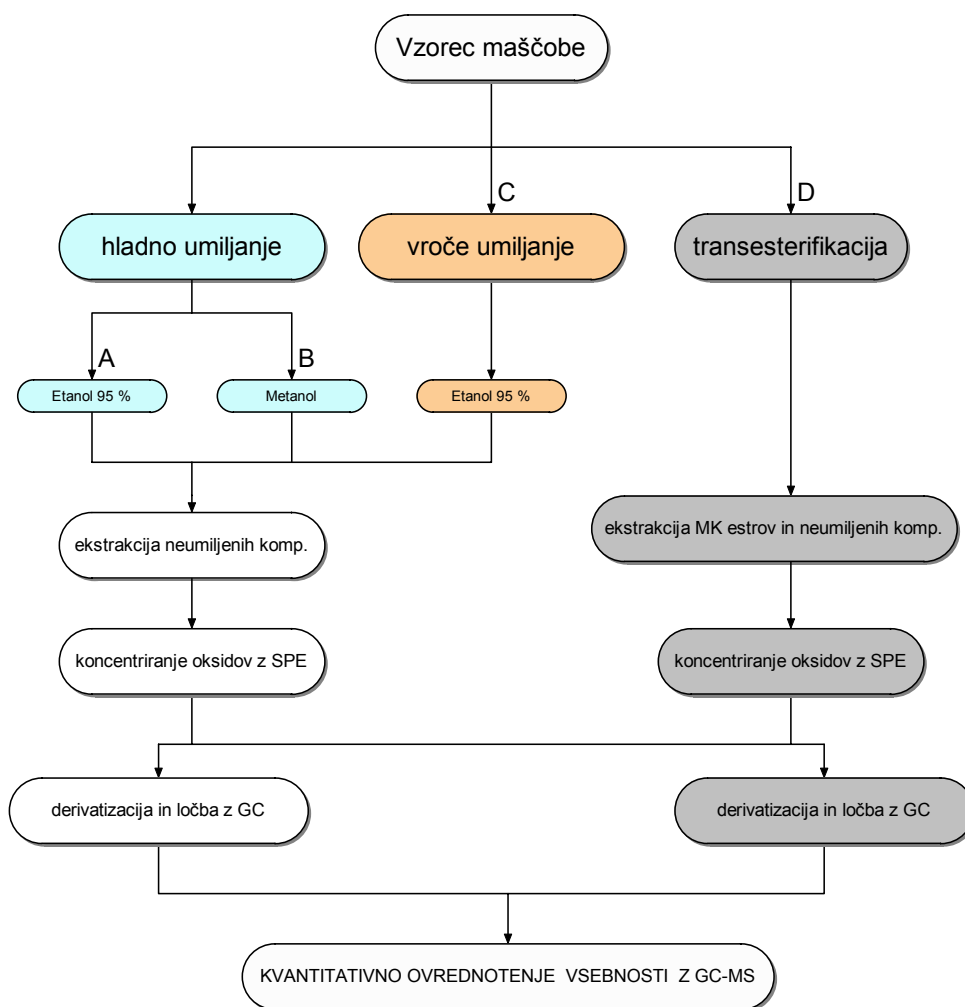
V zaključku študije je navedeno, da je vsebnost oksidov holesterola v surovih izdelkih majhna, medtem ko v obdelanih vzorcih (prvotno brez vsebnosti oksidov holesterola) zasledijo manjši porast količine oksidov holesterola, kot v vzorcih shranjenih na temperaturi hladilnika za štiri mesece.

Cilj metode po Sampaio s sod. (2006) je bil določiti prisotnost oksidacijskih produktov holesterola v vzorcu (slani-sušeni rakci). Metoda določanja oksidov holesterola je podobna metodi iz predhodne študije po Vincente-u s sod. (2005). Določili so naslednje okside: 7 β -hidroksiholesterol, 7 α -hidroksiholestrol, 7-ketoholesterol, 25-hidroksiholesterol.

Študija po Baggio-u s sod. (2005) temelji na istočasnem določanju holesterola in njegovih oksidov v lipidnem ekstraktu. Osušen lipidni ekstrakt se hladno umilja, neumiljene komponente se ekstrahirajo z dietiletrom, ekstrakt se osuši z dušikom ostanek pa raztopi v mobilni fazi. Določane komponente se kvantitativno analizirajo s HPLC analizo. Izmed oksidov so določili le 7-ketoholesterol in β -epoksiholesterol.

2.8.3 Metoda določanja holesterola in oksidov holesterola, na kateri je temeljilo naše analitično delo

Študija Ubhayasekera s sod. (2004), za določanje oksidacijskih produktov z uporabo plinske kromatografije, opisuje več različnih načinov določanja vsebnosti oksidov holesterola v vzorcu maščobe, ki se razlikujejo predvsem po postopku faze umiljanja (slika 4).



Slika 4: Shema štirih različnih analitičnih načinov določanja oksidacijskih produktov holesterola (Ubhayasekera, 2004)

Postopki umiljanja:

✚ A: Hladno umiljanje z raztopino 1 M KOH v 95 % etanolu:

200 mg odtehto maščobe se raztopi v 3 ml diklorometana in dobro premeša. Doda se 7 ml 1 M raztopine KOH v 95 % etanolu, ponovno se dobro premeša ter pusti čez noč na sobni temperaturi. Po končanem umiljanju se doda 10 ml diklorometana, 10 ml vode ter temeljito premeša, da je ekstrakcija čim boljša. Odstrani se vodna faza, organska faza pa se izpira s 5 ml 0,5 M raztopine KOH v vodi, ob dodatku nekaj kapljic nasičene vodne raztopine NaCl. Zatem se organska faza izpira le z vodo, dokler vodna faza ni popolnoma bistra. Po ločitvi obeh faz, se odpari organsko topilo s prepihavanjem z dušikom, neumiljive suhe komponente pa se raztopi v 1 ml raztopine heksan/dietil eter v volumskem razmerju 75 : 25.

Frakcija oksidov se obogati z SPE postopkom opisanim v nadaljevanju!

✚ B: Hladno umiljanje z raztopino KOH v metanolu

Podoben postopek kot pod točko A, vendar brez uporabe diklorometana, namesto 95 % etanola pa se uporablja metanol.

✚ C: Vroče umiljanje z raztopino KOH v 95 % etanolu

Postopek vročega umiljanja je ravno tako podoben postopku A, brez uporabe diklorometana, ter z enourno inkubacijo pri temperaturi 60 °C na vodni kopeli. Reakcija umiljanja se prekine z ohladitvijo mešanice vzorca pod tekočo mrzlo vodo.

✚ D: Transesterifikacija

Za transesterifikacijo se doda 200 mg odtehti maščobe, 2 ml 10 % raztopine Na-metilata raztopljenega v tetra-butil metil etru (MTBE) v volumskem razmerju 4:6. Mešanico se temeljito premeša in pusti stati 1 uro na sobni temperaturi. Po reakciji transesterifikacije se doda 2 ml vode in 5 ml kloroforma, premeša in tako ekstrahira organske komponente približno 1 minuto. Mešanica se centrifugira, da se ločita obe fazi, nato se vodna-gornja faza odstrani. Organska faza se z dodatkom 2 ml 1 % raztopine citronske kisline v vodi nevtralizira. Mešanica se ponovno centrifugira, vodna faza se odstrani, ekstrat kloroforma pa se evaporira z dušikom.

Tudi pri tem postopku se frakcija oksidov obogati z SPE postopkom, opisanim v nadaljevanju!

Koncentriranje oksidov holesterola z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE za postopke A, B in C):

Suhe neumiljive komponente po evaporaciji se raztopijo v raztopini, pripravljene iz 1 ml n-heksana in dietiletra v volumskem razmerju 75:25, in tako raztopljene se uvajajo na Silica kolono, ki je predhodno kondicionirana s tremi ml n-heksana. Zatem se v kolono uvajajo mešanice topil n-heksan/dietileter v dveh različnih volumskih razmerjih, in sicer: 75:25; 60:40. Eluate topil se zavrže, za izločanje oksidov pa se uvaja raztopina aceton/metanol v razmerju 60:40, katere eluat se nadalje evaporira z dušikom do TMS-etrov za GC in GC-MS analizo.

Koncentriranje oksidov holesterola z SPE za postopek D:

Na vrh amino faze SPE kolone se nasuje nekaj brezvodnega natrijevega sulfata, da nase veže vodo. Nato se kolona kondicionira s petimi ml heksana, transesterificirani lipidi se raztopijo v 250 μ l kloroforma ter uvajajo na kolono, ki se nato izpira z dvakrat po 2,5 ml heksana. Prosti holesterol in ostale nepolarne komponente se izločijo s 5 ml heksana, 5 ml razt. heksan/MTBE v volumskem razmerju 5:1 in 5 ml razt. heksan/MTBE (3:1). Polarne komponente pa se izločajo s 7 ml acetona, eluat se ulovi ter evaporira in derivatizira do trimetilsilil-etrov za GC in GC-MS analizo.

Priprava trimetilsilil etrov (TMS-eter) (derivatizacija):

Po evaporaciji se preostale suhe komponente raztopi z dodatkom 100 μ l tri-silil reagenta predhodno pripravljenega iz 100 ml heksametildisilazana in 50 ml klortrimetilsilana. Raztopino se nato inkubira 45 minut pri temperaturi 60 °C, evaporira, suhe komponente pa raztopi s 100 μ l heksana. Dobljene suhe komponente se raztopi z uporabo nadzvočne kopeli, centrifugira nato pa se filtrat shrani pri temperaturi -20 °C za en teden do določanja z GC in GC-MS.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

V poskus so bile vključene:

- jadranske sardele, ulovljene na dan 11.05.2005, Jadransko morje
- postrvi (šarenka), gojene v različnih ribogojnicah in različnih starosti:
Gameljne, 14 mesecev
Ilirska Bistrica, 18 mesecev

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava vzorcev

Vzorci svežih postrvi in sardel smo za kemijske analize pripravili le iz užitnega dela rib:

- postrvi smo očistili, kar pomeni, da smo jim najprej odstranili drobovino, nato luske, nakar smo fileje (brez glave in kosti) narezali na kose in homogenizirali s kuhinjskim sesekljalnikom do pastozne mase
- sardele smo očistili, odstranili luske ter glavo in drobovino, kar pomeni, da pri sardeli predstavljajo užitni del tudi kosti in le-tega smo nato narezali na kose in homogenizirali s kuhinjskim sesekljalnikom do pastozne mase.

Tako pripravljene vzorce smo pakirane v polietilenske vrečke hranili zamrznjene (-18 °C) do začetka analiz vsebnosti holesterola in oksidov holesterola, maščobno kislinse sestave ter vode, beljakovin, maščob in pepela.

3.2.2 Določanje vsebnosti holesterola

Hladno umiljanje

V erlenmajerico s teflonskim pokrovčkom smo odtehtali 1,5 g ($\pm 0,001$ g) homogeniziranega in zamrznjenega vzorca. Dodali smo 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2) in 7 ml 1 M raztopine KOH v 95 % etanolu ter vse skupaj prepihali z dušikom. Vse skupaj smo temeljito premešali nato pa pustili vsebino mešati še na magnetnem mešalu 18 – 20 ur na sobni temperaturi. S tem postopkom smo izvedli fazo hladnega umiljanja. Po končanem umiljanju smo vsebino prefiltrirali skozi filtrirni papir v lij ločnik in pričeli z ekstrakcijo holesterola.

Ekstrakcija holesterola

V lij ločnik, v katerem je bil prisoten filtrat, smo dodali 10 ml dietiletra in 10 ml destilirane H_2O , ter vse skupaj temeljito premešali. Lij ločnik smo pustili stati, da sta se ločili nepolarna in polarna faza, nato pa smo spodnjo, vodno fazo, odstranili. Preostalo - nepolarno fazo smo nato spirali z dodatkom 5 ml 0,5 M KOH v destilirani vodi in nekaj kapljic nasičene raztopine NaCl, ter temeljito premešali. Ob ločitvi obeh faz, smo ponovno odstranili spodnjo vodno fazo, gornjo nepolarno fazo pa ponovno spirali, tokrat s 5 ml destilirane vode. Nato smo obe še pomešani fazi pretočili v centrifugirko z navojem in centrifugirali 10 min pri 1000 g. Po ločitvi faz, smo 5 ml gornje faze (polovico dodanega organskega topila), previdno odpipetirali v epruveto, ter vsebino prepihovali z dušikom, da

smo odstranili topilo. Suhi ostanek smo nato raztopili v 1 ml raztopine heksan/dietileter (75:25) in s tem pripravili naš vzorec za postopek ločevanja holesterola z SPE postopkom.

SPE postopek

Kolono Strata SI-1 smo najprej kondicionirali s 3 ml heksana (eluat zavržemo), nato smo na kolono uvajali 1 ml raztopljenega suhega ostanka vzorca v raztopini heksan/dietileter (75:25) in pazili da le-ta počasi potuje skozi kolono, zaradi boljše vezave holesterola na nosilec (eluat zavržemo). Sledilo je izpiranje neželenih komponent, in sicer z uvajanjem 3 ml heksana in 3 ml raztopine heksan/dietileter (75:25) (eluat zavržemo). Po izpiranju s tema dvema topiloma smo kolono osušili, tako da smo za 1 min spustili pretok zraka skozi kolono. Na koncu smo na kolono uvajali še 2 ml mobilne faze, mešanice acetonitrila in izopropanola v volumskem razmerju 55:45 in ta eluat lovili v epruveto. Tega smo prenesli v penicilinke. Vzorec je bil pripravljen za določanje holesterola s HPLC analizo. Do analize smo penicilinke hranili v hladilniku pri temperaturi -7°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

3.2.2.1 Priprava umeritvene krivulje

o Umeritvena krivulja 1 (UK 1)

Za kvantitativno določanje holesterola s HPLC smo uporabili standard 5-cholesten-3 β -ol (Sigma, C-8667). Pripravili smo umeritveno krivuljo, ki prikazuje odnos površine pod vrhom holesterola glede na koncentracijo holesterola.

Priprava standardne raztopine

V 25 ml bučko smo odtehtali 0,05572 g standarda holesterola in dopolnili s heksanom do oznake.

Različne volumne (200, 400, 600, 800, 1000 μl) standardne raztopine smo prenesli v temne vialne. Heksan smo iz vsake vialne odstranili s prepihanjem z dušikom in suhe preostanke raztopili v mobilni fazi ter vse skupaj vodili na HPLC.

Tako smo se izognili morebitnim napakam pri kromatografiji, ne pa tudi napakam, ki lahko nastanejo pri ekstrakciji holesterola iz vzorca ter SPE postopku!

o Umeritvena krivulja 2 (UK 2)

Za izničenje napake, ki nastane pri ekstrakciji in SPE postopku, smo standardno raztopino holesterola, pripravljeno s standardom 5-cholesten-3 β -ol (SIGMA, C-8667), podvrgli še celotnemu postopku določanja vsebnosti holesterola (hladno umiljanje, ekstrakcija, SPE postopek), skupaj z vzorci ribjega mesa.

Priprava standardne raztopine

V 10 ml bučko smo odtehtali 0,03929 g kromatografsko čistega holesterola in ga raztopili v 6,57372 g heksana ter bučko napolnili s heksanom do oznake.

V pet erlenmajeric z obrusom smo odtehtali 0,5 g ($\pm 0,001$ g) naključno izbranega vzorca ribjega mesa, ter v vsako odpipetirali različne volumne standardne mešanice (200, 400, 600, 800, 1000 μl). Nadaljevali smo s postopkom umiljanja. V erlenmajerico z navojem in standardno raztopino smo torej dodali 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2) in 7 ml 1 M raztopine KOH v 95 % etanolu, premešali in filtrirali v lij ločnik. Nadaljevali smo s fazo ekstrakcije, SPE postopkom (opisano v poglavju 1.2.2.3) in HPLC analizo.

o Umeritvena krivulja 3 (UK 3)

Za primerjavo z umeritveno krivuljo 2, smo pripravili še umeritveno krivuljo na tretji način. Postopali smo enako kot pri UK 2, le da tokrat nismo dodali ribjega mesa.

3.2.2.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Vsebnost holesterola smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), s kromatografom znamke Knauer. Kromatografski pogoji so bili:

- razplinjevalnik: X-Act, Jour Research
- črpalka: Maxi Star K-1000, Knauer
- kolona: Hypersil ODS 5 μm , 150 mm x 4,6 mm, Thermosyl
- temperatura kolone: sobna temperatura ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- mobilna faza: izopropanol/acetonitril v volumskem razmerju 45:55
- pretok mobilne faze: 1,000 ml/min
- avtomatski podajalec vzorcev z grelno komoro: Marathon-XT, Spark Holland
- volumen injiciranja: 20 μl
- detektor: UV-VIS, 212 nm, Knauer
- zapis signala: Instrument Eurochrom 2000

3.2.2.3 Določanje vsebnosti holesterola v vzorcu

Holesterol smo identificirali na podlagi podatkov retenzijskih časov navedenih v literaturi. Navedeni so bili zelo različni izločitveni časi holesterola, kar je seveda zelo odvisno od pogojev, načina izvajanja HPLC ter vrste kromatografske kolone. V naši analizi smo pričakovali, da se bo holesterol izločil v času nekje od 3,5 - 4 minute, v kar smo se tudi prepričali pri izvajanju umeritvene krivulje s standardno raztopino kromatografsko čistega holesterola (5-cholesten-3 β -ol, čistost 99+ %), iz katere smo lahko odčitali vsebnost holesterola v analiziranih vzorcih v odvisnosti od površine.

Količino holesterola (mg/100 g) v naših vzorcih smo izračunali iz površine posameznih kromatografskih vrhov holesterola v posameznem vzorcu, mase vzorcev ter odčitane faktorja iz umeritvene krivulje.

Vsebnost holesterola smo računali po naslednji formuli:

$$m_{\text{hol}} = \frac{A_{\text{hol}}}{m_{\text{vz}} * 100 * F} \quad \dots (1)$$

- A_{hol} površina kromatografskega vrha holesterola
 F faktor umeritvene krivulje
 m_{vz} masa odtehtanega vzorca
 V_{vz} odpipetirani volumen vzorca, ki smo ga vodili na SPE

3.2.3 Določanje oksidov holesterola

Vsebnost oksidov holesterola v vzorcih smo določili s plinsko kromatografijo preko derivatov oksistreolov. Za to analizo je bilo potrebno predhodno pripraviti trimetilsilil etre (TMS-eter), kar smo dosegli z derivatizacijo vzorcev z derivatizacijskima reagentoma (heksamethylsilan, FLUKA 52619; chloromethylsilan, MERCK 1.02333). Vsak vzorec je bil analiziran v paralelki.

Za določanje oksidov holesterola smo uporabili modificirano metodo po S.J.K.A. Ubhayasekera (2004). Metodo sestavlja faza hladnega umiljanja, ekstrakcije, SPE postopek (solid phase extraction), derivatizacija do trimetilsilil etra (TMS-eter), ter ločba oksidov holesterola s plinsko kromatografijo (GC).

3.2.3.1 Interni standard

Kot interni standard smo uporabili 4-Cholesten-3-on (MERCK, C-841471).

V 10 ml bučko smo odtehtali 0,01352 g internega standarda, 0,00241 g 25 α -hidroksiholesterola (SIGMA, H-1015), 0,00075 g 20 α -hidroksiholesterola (SIGMA, H-6378), 0,00086 g 7 β -hidroksiholesterola (SIGMA, H-6891). Tako natehtani standard in okside smo raztopili v 6,49231 g ($\pm 0,00001$ g) heksana in bučko dopolnili s heksanom do oznake.

Standard smo derivatizirali na identičen način kot vzorce, le da smo derivatizirali samo 200 μ l internega standarda, zaradi večje koncentracije oksidov holesterola.

Postopek metode določanja oksidov holesterola je popolnoma identičen postopku določanja vsebnosti holesterola, razlika je le v zaključni fazi identifikacije vsebnosti komponent, torej v kromatografiji.

Okside holesterola s HPLC analizo ne moremo določiti, zato smo za identifikacijo uporabili plinsko kromatografijo (GC). Pred GC analizo smo morali izvesti še postopek derivatizacije.

3.2.3.2 Derivatizacija (priprava TMS – etrov, derivatov holesterol oksidov)

0,5 ml eluata, ki smo ga ulovili po SPE postopku, smo prenesli v plastične centrifugirke s pokrovčkom (1ml), prepihali smo ga z dušikom (do suhega), nato pa suhi ostanek raztopili s 150 μ l SI – reagenta (raztopina heksamethylsilana in chloromethylsilana v volumskem razmerju 2:1). Centrifugirke z vsebino smo segrevali 45 minut na $T = 60$ °C, po segrevanju smo ponovno prepihovali z dušikom, da smo dobili bel suh ostanek, ki smo ga raztopili v 300 μ l heksana, centrifugirali 10 minut (1400 min^{-1}). Bister produkt smo previdno prenesli v temne penicilinke in jih shranili pri -20 °C (± 1 °C) do analiz na GC.

3.2.3.3 Plinska kromatografija

Okside holesterola smo določili s pomočjo plinske kromatografije z uporabo plinskega kromatografa Agilent Technologies 6890, s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID), kapilarno kolono HP -5 ms (30m x 0,32mm x 0,25 μ m).

Ločevanje in detekcija je potekala pri naslednjih pogojih:

- temperaturni program: 290 °C (10 min); 3 °C/min do 310 °C, 310 °C (0 min)
- temperatura injektorja: 290 °C
- temperatura detektorja: 310 °C
- injektor: split:splitless: 1:30, volumen 0,5 µl
- nosilni plin: He 1,5 ml/min
- 'make-up' plin: N₂ 45 ml/min
- plin skozi detektor: H₂ 40 ml/min, sintetični zrak (21 % O₂), 450 ml/min

3.2.3.4 Določanje vsebnosti oksidov holesterola v vzorcu

Okside holesterola smo identificirali s primerjavo retenzijskih časov komponent standarda (holesterola in treh oksidov holesterola (25 α -hidroksiholesterol (SIGMA, H-1015), 20 α -hidroksiholesterol (SIGMA, H-6378) in 7 β -hidroksiholesterol (SIGMA, H-6891)), ki smo ga predhodno pripravili, ga vodili na proces derivatizacije ter identificirali s plinsko kromatografijo.

Količino posameznega oksida holesterola (mg_i/100 g vzorca) smo izračunali iz površin kromatografskih vrhov holesterola in oksidov holesterola ter mase holesterola (masa, ki smo jo določili s HPLC analizo za posamezen vzorec) in faktorja odzivnosti za posamezen oksid holesterola.

Vsebnost oksidov holesterola smo računali po naslednji formuli:

$$m_{ok,h} = \frac{A_{hol} * m_{hol}}{A_{ok,h} * F} \quad \dots (2)$$

A_{hol} površina hromatografskega vrha holesterola
m_{hol} masa holesterola, ki smo jo določili s HPLC
A_{ok,h} površina kromatografskega vrha oksidov holesterola
F faktor odzivnosti

3.2.4 Določanje maščobnokislinske sestave

Maščobnokislinsko sestavo vzorcev smo določili s plinsko kromatografijo. Za to analizo je bilo potrebno predhodno pripraviti metilne estre maščobnih kislin (MEMK). Vsak vzorec je bil analiziran v paralelki.

Za določanje MEMK na naših vzorcih smo uporabili metodo *in situ transesterifikacije*, modificirane po Parku in Goinsu (1994), kjer ni potrebna predhodna ekstrakcija maščob iz vzorca.

3.2.4.1 Interni standard

Kot interni standard smo uporabili nonadekanojsko kislino (19:0, Sigma). Za to kislino smo se odločili, ker je v ribjem mesu ni oz. je pod mejo detekcije (<0,01 % od skupnih MK).

Priprava internega standarda

V 10 ml bučko smo odtehtali 0,05 g ($\pm 0,00001$ g) kromatografsko čistega (99,8 %) internega standarda nonadekanojske kisline (Sigma N 4129). Kisline smo raztopili v mešanici metanola (4,6 g $\pm 0,00001$ g) in heksana (2,6 g $\pm 0,00001$ g) ter bučko s heksanom dopolnili do oznake. Raztopino internega standarda smo hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) do analiz vzorcev.

Vsaki paralelki vzorca smo dodali 100 μl internega standarda in z njim določili vsebnost posameznih MK.

3.2.4.2 Ekstrakcija MEMK

V epruvete z navoji (Hach-ove epruvete, 10 ml) smo odtehtali 100 μl internega standarda in 0,4 - 0,5 g ($\pm 0,001$ g) predhodno homogeniziranega in zamrznjenega vzorca. Epruvete smo prepihali z dušikom. Dodali smo 300 μl metilen klorida (CH_2Cl_2) in 3 ml 0,5 M sveže pripravljene raztopine NaOH v metanolu. Epruvete smo ponovno prepihali z dušikom, tesno zaprli s pokrovčkom ter premešali. Dobro premešane vzorce smo segrevali v termobloku pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, približno 50 min (da se nam je vzorec v celoti raztopil) in jih vmes večkrat premešali. Po segrevanju smo epruvete hitro ohladili v ledeni vodi. Ohlajeni zmesi smo dodali 3 ml 14 % raztopine BF_3 v metanolu, prepihali z dušikom in ponovno segrevali v termobloku 10 minut pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končanem segrevanju smo epruvete ohladili na sobno temperaturo in dodali 3 ml 10 % raztopine NaCl za povečanje ionske jakosti (lažje ločenje vodne in heksanske faze) ter 1 ml heksana. Raztopino smo močno stresali 1 minuto, da je prišlo do čim boljše ekstrakcije MEMK iz vodne v nepolaro heksansko fazo, nato pa smo 10 minut centrifugirali. Po centrifugiranju smo previdno odpipetirali heksansko fazo v temne penicilinke in jih shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) do analiz na GC.

3.2.4.3 Plinska kromatografija

Delež MEMK smo določili s plinsko kromatografijo z uporabo plinskega kromatografa Agilent Technologies 6890, s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID) in kapilarno kolono HP-88 (100 m x 0,25 mm x 0,20 μm).

Ločevanje in detekcija sta potekali pri naslednjih pogojih:

- temperaturni program: $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 min); $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0 min)
- temperatura injektorja: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$
- temperatura detektorja: $280\text{ }^{\circ}\text{C}$
- injektor: split:splitless: 1:30, volumen 0,5 μl
- nosilni plin: He 2,3 ml/min
- 'make-up' plin: N_2 45 ml/min
- plin skozi detektor: H_2 40 ml/min, sintetični zrak (21 % O_2), 450 ml/min

3.2.4.4 Določanje vsebnosti MK v vzorcu

MEMK smo identificirali s primerjavo retencijskih časov metilnih estrov maščobnih kislin standardne mešanice (NuCheck 85, 68 D, 411, 546 Prep. Inc.) in standardi Sigma MIX 37 (MEMK CLA 18:2 9C11T in 18:2 10T12C). S standardno mešanico NuCheck 85, 68 D, 411, 546 Prep. Inc., smo določili faktor odzivnosti detektoraja (response factor - Rf_i) za posamezno maščobno kislino.

Utežni delež maščobnih kislin v vzorcu smo določili s faktorjem odzivnosti detektoraja in faktorjem pretvorbe MEMK v MK ter površin za posamezen MEMK.

Količino posamezne maščobne kisline (mg MK_i/100 g vzorca) smo izračunali iz površin kromatografskih vrhov posameznih MEMK in internega standarda (19:0) ter mase vzorcev in internega standarda (19:0). Pri drugem načinu izračuna pa smo mg MK_i/100 g vzorca izračunali s pomočjo vsebnosti maščob in s faktorjem pretvorbe iz maščob v skupne MK (TFA – total fatty acids), ki znaša za mastne ribe 0,90 (Weihrauch in sod., 1977; Fatty acids, 1999).

Faktor odzivnosti FID (Rf)

Za enake koncentracije različnih MK ne dobimo enakih površin kromatografskih vrhov, zato smo morali predhodno določiti faktorje odzivnosti detektoraja (Rf) za posamezne MEMK. Rf smo določili s pomočjo kromatograma in standardne mešanice (NuCheck 85, 68 D, 411, 546 Prep. Inc.).

Za izračun Rf v NuCheck za posamezni MEMK smo uporabili naslednjo enačbo:

$$Rf = \frac{3,03 \text{ ut } \%}{RPMEMK \text{ ut } \%} \quad \dots(3)$$

RPMEMK relativna površina posameznega metilnega estra maščobne kisline
3,03 ut % utežni delež posameznega MEMK v NuCheck-u, ki je znašal 3,03 razen za
16:0, ki je znašal 6,06

Izračun utežnih deležev MK

Za izračun smo potrebovali poleg Rf in površin kromatografskih vrhov MEMK še konverzijski faktor (FA_i), povzet po AOAC Official Method 996.06. Fat (Total, saturated and monosaturated) in Foods (1999), s katerim se iz količine MEMK preračuna količina posamezne MK (preglednica 5).

Preglednica 5: Konverzijski faktorji (FA_i) za preračun MEMK v MK (AOAC Official Method 996.06. Fat (Total, Saturated and Monosaturated) in Foods, 1999: 18B)

MAŠČOBNA KISLINA	KEMIJSKO IME	SLOVENSKO TRIVIALNO IME	(FA_i)
C12:0	DODEKANOJSKA K.	LAVRINSKA K.	0,934579
C13:0	TRIDEKANOJSKA K.		0,938596
C14:0	TETRADEKANOJSKA K.	MIRISTINSKA K.	0,942149
C14:1n-5	9-TETRADECENOJSKA K.	MIRISTOOLEINSKA K.	0,941667
C15:0	PENTADEKANOJSKA K.	PENTADEKANOJSKA K.	0,945313
C16:0	HEKSADEKANOJSKA K.	PALMITINSKA K.	0,948148
C16:1n-7	9-HEKSADECENOJSKA K.	PALMITOOLEINSKA K.	0,947761
C17:0	HEPTADEKANOJSKA K.	MARGARINSKA K.	0,950704
C17:1n-7	10-HEPTADECENOJSKA K.		0,950355
C18:0	OKTADEKANOJSKA K.	STEARINSKA K.	0,95302
C18:1n-9	9-OKTADECENOJSKA K.	OLEINSKA K.	0,952703
C18:2n-6	9,12-OKTADEKADIENOJSKA K.	LINOLNA K.	0,952381
C18:3n-6	6,9,12-OKTADEKATRIENOJSKA K.	γ -LINOLENSKA K.	0,952055
C18:3n-3	6,9,15-OKTADEKATRIENOJSKA K.	α -LINOLENSKA K.	0,952055
C18:4n-3	6,9,12,15-OKTADEKATETRAENOJSKA K.	STERAIDONSKA K.	0,951724
C20:0	EIKOZANOJSKA K.	ARAHIDINSKA K.	0,957055
C20:1n-9	11-EIKOZAENOJSKA K.	GADOLEINSKA K.	0,95679
C20:2n-6	11,14-EIKOZADIENOJSKA K.		0,956522
C20:3n-9	5,8,11-EIKOZATRIENOJSKA K.		0,95625
C20:4n-6	5,8,11,14-EIKOZATETRAENOJSKA K.	ARAHIDONSKA K.	0,955975
C20:5n-3	5,8,11,14,17-EIKOZAPENTAENOJSKA K.	EPK	0,955696
C22:0	DOKOZANOJSKA K.	BEHENSKA K.	0,960452
C22:1n-9	13-DOKOZAENOJSKA K.	ERUKA K.	0,960227
C22:3n-6	10,13,16-DOKOZATRIENOJSKA K.	DOKOZATRIENOJSKA K.	0,95977
C22:4n-6	7,10,13,16-DOKOZATETRAENOJSKA K.	DOKOZATETRAENOJSKA K.	0,959538
C22:5n-6	4,7,10,13,16-DOKOZAPENTAENOJSKA K.	DPK	0,959302
C22:6n-3	4,7,10,13,16,19-DOKOZAHEKSAENOJSKA K.	DHK	0,959064
C23:0	TRIKOZANOJSKA K.		0,961957
C24:1n-9	15-TETRAKOZAENOJSKA K.	NEVRONSKA K.	0,963158

Za MK, ki niso imele že izračunanega FA_i , (22:3, 22:4) smo konverzijski faktor izračunali po formuli:

$$FA_i = \frac{Mr_{MK_i}}{Mr_{MEMK_i}} \quad \dots (4)$$

- i i-ta MK
 FA_i konverzijski faktor za MK_i
 Mr relativna molska masa MK_i ali $MEMK_i$

Enačba za izračun utežnega deleža maščobnih kislin (%) je naslednja:

$$ut. \% MK_i = \frac{(Rf_i * FA_i * A_i) * 100}{\sum_{i=1}^n (Rf_i * FA_i * A_i)} \quad \dots (5)$$

- i i-ta MK
 A_i površina kromatografskega vrha posamezne MK_i
 FA_i konverzijski faktor za posamezno MK_i
 Rf_i faktor odzivnosti detektorja za posamezno $MEMK_i$

3.2.4.5 Določanje vsebnosti posameznih MK računsko

Za izračun mg MK v 100 g vzorca smo potrebovali poleg deleža posamezne MK_i še vsebnost skupnih maščob ter faktor pretvorbe iz surove maščobe v skupne MK, ki za mastne ribe znaša 0,90 (Fatty acids, 1998).

Vsebnost posamezne MK (mg MK_i/100 g vzorca) smo izračunali po naslednji enačbi:

$$MK_i = \% \text{ skupnih maščob} * 0,90 * \% MK_i * 10 \quad \dots (6)$$

3.2.4.6 Določanje vsebnosti posameznih MK z internim standardom

Pri tem izračunu smo uporabili interni standard za izračun mase posamezne MK v 100 g vzorca. Interni standard (19:0) smo dodali na začetku priprave vzorcev za maščobnokislinsko določanje.

Vsebnost MK (mg MK_i/100 g vzorca) smo izračunali po enačbi:

$$\text{vsebnost } MK_i = \frac{A_i * Rf_i * FA_i * m_{19:0}}{A_{19:0} * Rf_{19:0} * FA_{19:0} * m_v} * 100 \quad [\text{mg}/100\text{g}] \quad \dots (7)$$

- i i-ta MK_i
- A_i površina posamezne MK_i
- FA_i konverzijski faktor za posamezno MK_i
- Rf_i faktor odzivnosti detektorja za posamezno MEMK_i
- m_{19:0} masa internega standarda (g)
- m_v masa vzorca (g)
- A_{19:0} površina nonadekanojske MK_i
- FA_{19:0} konverzijski faktor za nonadekanojsko MK_i

3.2.5 Določanje vsebnosti vode

Vodo smo določali s sušenjem (AOAC Official Method 950.46 Moisture in Meat, 1999).

Princip:

Homogenizirani vzorec, zmešan s kremenčevim peskom smo sušili pri temperaturi 105 °C do konstantne mase.

Material:

- zamrznjeni homogenizirani vzorci

Pribor:

- stekleni tehtič
- steklena palčka
- kremenčev pesek
- eksikator s silikagelom
- sušilnik

Postopek:

Tehtič s stekleno palčko smo sušili pri temperaturi 105 °C najmanj eno uro, ohladili v eksikatorju in stehali ($\pm 0,001$ g). Nato smo v tehtič zatehtali 10 do 20 g kremenčevega peska in 3 do 5 g ($\pm 0,001$ g) homogeniziranega vzorca. Vzorec smo s pomočjo steklene palčke pomešali s peskom, razširili po dnu tehtiča in sušili v sušilniku do konstantne mase (približno 3 ure). Vsebnost vode smo izrazili z masnimi deleži.

$$\text{vsebnost vode} = \left(\frac{m_i}{m_v} \right) * 100 \quad [\text{g}/100\text{g}] \quad \dots (8)$$

m_v masa vzorca (g)

m_i izguba mase po sušenju (g)

3.2.6 Določanje vsebnosti beljakovin

Beljakovine smo določali z metodo po Kjeldahlu (Golob in Plestenjak, 2000).

Princip:

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

Pri tem potekajo naslednje kemijske reakcije:



Če enačbi (11) in (12) združimo dobimo:



Iz enačbe (13) sledi:

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

Pribor:

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

Reagenti:

- konc. H₂SO₄
- katalizator Kjeltabs Cu / 3,5 (305 g K₂SO₄ + 0,4 g CuSO₄ x 5 H₂O)
- nasičena raztopina H₃BO₃ (ca 3 %)
- 30 % raztopina NaOH
- 0,1 M HCl

Postopek:

Delo razdelimo na tri faze:

- 1) mokri sežig pripravljenega homogeniziranega vzorca
- 2) destilacija
- 3) titracija

▪ Razklop

V sežigno epruveto smo odtehtali ca 1-1,3 g vzorca. Dodali smo 2 tableti bakrovega katalizatorja in 20 ml konc. H₂SO₄. Epruvete smo pokrili s steklenimi zvonci in postavili v ogreto enoto za razklop (Digestion Unit), kjer je bila temperatura 370°C. Z vodno črpalko smo odvajali zdravju škodljive hlape prek enote imenovane Scrubber, kjer se del hlapov utekočini, preostanek pa se nevtralizira v ca 15 % raztopini NaOH in končno vodi preko aktivnega oglja. Sežig je bil končan po eni uri oziroma takrat, ko se vsebina v epruveti preneha peniti in postane bistro zelena.

▪ Destilacija

Vzorec smo ohladili na sobno temperaturo. Epruveto smo postavili v destilacijsko enoto (Distillation Unit), kjer je poteklo doziranje 50 ml destilirane vode in 70 ml baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko podložko smo dozirali 60 ml borne kisline. Nato se je začela uvajati v vzorec para. Destilacija je trajala 4 minute.

▪ Titracija

Raztopino nastalega amonborata v predložki smo titrirali z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija je potekla avtomatsko po vnosu zatehte vzorca (podano v mg) v titracijsko enoto (Titrino). V končni točki titracije smo zabeležili porabo kisline, iz katere smo izračunali % dušika v vzorcu ter % beljakovin v vzorcu (uporabili smo splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine, ki je enak 6,25).

$$\% \text{ beljakovin} = \left(\frac{V_{0,1M \text{ HCl} \times 1,4} (\text{ml})}{m_{(\text{odtehta})} (\text{mg})} \right) * 6,25 * 100 \quad \dots(14)$$

$$\% \text{ beljakovin} = \% \text{ N} \times F \quad \dots(15)$$

$V_{0,1\text{ M HCl}}$	poraba 0,1 M HCl za vzorec (ml)
$m_{(\text{odtehta})}$	masa vzorca (mg)
1,4	ekvivalent (1 ml 0,1 M HCl ustreza 1,4 mg N)
6,25 = F	splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine

3.2.7 Določanje vsebnosti maščob

Maščobe smo določali po Weibull Stoldtovi metodi (AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in Meat and Meat Product, 1999).

Princip:

Vzorec kuhamo v koncentrirani HCl, da razkrojimo beljakovine in vezi med maščobami in na maščobe vezanimi komponentami. Izločeno maščobo odfiltriramo in ekstrahiramo s petroletrom v Soxhletovem aparatu.

Material:

- zamrznjeni homogenizirani vzorci

Pribor in reagenti:

- aparat po Soxhletu
- čaša, 400 ml
- lij za filtriranje
- urna stekla
- merilni valj, 100 ml
- steklene palčke
- filtrirni papir
- koncentrirana raztopina HCl
- petroleter

Postopek:

5 do 10 g ($\pm 0,001$ g) vzorca smo odtehtali v čašo, dodali 100 ml destilirane vode in 80 ml koncentrirane raztopine HCl ter segrevali 15 minut na vreli vodni kopeli. Med segrevanjem smo mešali. Čašo smo nato postavili na kuhalnik, pokrili z urnim steklom in pustili, da je vsebina 30 minut polagoma vrela. Še vročo smo razredčili z vročo destilirano vodo, sprali urno steklo in takoj filtrirali skozi naguban vlažen filtrirni papir. Filter smo spirali z vročo destilirano vodo, s katero smo predhodno izprali čašo, v kateri smo segrevali vzorec, dokler filtrat ni več reagiral na klorove ione (dodatek 2 M raztopine AgNO_3 -bela sirasta oborina-prisotni Cl^- ioni). Nato smo filtrirni papir z vsebino položili na urno steklo, na katerega smo prej položili dvojno plast filtrirnega papirja in sušili 2 do 4 ure pri temperaturi 105 °C. Suh filtrirni papir z vsebino in podložnim filter papirjem smo prenesli v ekstrakcijski tulec, pokrili z vato in tulec vstavili v ekstraktor Soxhletovega aparata. Urno steklo smo izprali s petroletrom, ki smo ga vlili v ekstraktor. Čisto ekstrakcijsko bučko z vrelnimi kroglicami smo sušili eno uro v sušilniku pri temperaturi 105 °C, ohladili v eksikatorju in stehali. V bučko smo vlili petroleter, jo spojili z ekstraktorjem, v katerem je bil filtrirni papir z vsebino, in s povratnim hladilnikom ter previdno segrevali na vodni kopeli (100 °C). Maščobo iz vzorca smo ekstrahirali 6 ur. Po končani ekstrakciji smo topilo oddestilirali, bučko z maščobo pa sušili v sušilniku pri temperaturi 105 °C do

konstantne mase (1 uro). Po hlajenju v eksikatorju smo bučko z maščobo stehali in izračunali vsebnost maščobe.

$$\text{vsebnost maščobe} = \left(\frac{m_{po} - m_{pred}}{m_v} \right) * 100 \quad [\text{g}/100 \text{ g}] \quad \dots (16)$$

m_v masa vzorca (g)

m_{po} masa bučke z maščobo (g)

m_{pred} masa prazne bučke (g)

3.2.8 Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi

Skupne mineralne snovi smo določali po metodi AOAC Official Method 920.153 Ash of Meat (1999).

Princip:

Metoda z direktnim suhim sežigom vzorca, po katerem dobimo anorganski ostanek mesa.

Material:

- zamrznjeni homogenizirani vzorci

Pribor:

- porcelanski žarilni lonček
- žarilna peč
- eksikator
- sušilnik

Postopek:

Žarilni lonček smo najprej posušili, nato pa smo ga 1 uro žarili v peči pri temperaturi sežiga (550 °C). Lonček smo ohladili v eksikatorju in stehali ($\pm 0,001$ g). Nato smo vanj zatehtali 5 do 10 g ($\pm 0,001$ g) homogeniziranega vzorca in ga nekaj ur sušili v sušilniku pri temperaturi 105 °C. Zatem smo vzorec pooglenili nad umirjenim plamenom in ga nato 4 do 5 ur žgali v žarilni peči pri temperaturi 550 °C (po popolnem sežigu mora biti pepel bel ali rahlo siv). Po končanem sežigu smo lonček s pepelom ohladili v eksikatorju in stehali ($\pm 0,001$ g). Vsebnost pepela smo izrazili v g/100 g.

$$\text{vsebnost pepela} = \left(\frac{m_p}{m_v} \right) * 100 \quad [\text{g}/100 \text{ g}] \quad \dots (17)$$

m_p masa pepela (g)

m_v masa vzorca (g)

3.2.9 Statistična obdelava podatkov

V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom Microsoft Excel 2000. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) s postopkom GLM (General Linear Models). Za vsako opazovano lastnost smo izračunali tudi koeficient determinacije (R^2), ki nam pove, koliko variabilnosti za neko lastnost smo uspeli pojasniti z modelom.

Z Duncan testom smo ovrednotili razlike znotraj enega vpliva.

3.2.9.1 Statistični model za določeno kemijsko sestavo (model 1)

V statistični model smo za določeno kemijsko sestavo kot sistematski vpliv vključili vrsto ribe.

$$y_{ijklm} = \mu + R_i + P_k + e_{ijklm} \quad \dots (18)$$

y_{ijklm} opazovana lastnost
 μ povprečna vrednost
 R_i vpliv vrste ribe (i= sardela, postrv)
 P_k vpliv ponovitve (k =1 do 6)
 e_{ijklm} ostanek

3.2.9.2 Statistični model za določeno kemijsko sestavo (model 2)

V statistični model smo za določeno kemijsko sestavo kot sistematski vpliv vključili ribogojnico za postrvi.

$$y_{ijklm} = \mu + K_j + P_k + e_{ijklm} \quad \dots (19)$$

y_{ijklm} opazovana lastnost
 μ povprečna vrednost
 K_j vpliv ribogojnice (j= Ilirska Bistrica, Gameljne)
 P_k vpliv ponovitve (k =1 do 6)
 e_{ijklm} ostanek

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA V RIBJEM MESU

Na osnovi številnih člankov, ki navajajo različne metode določanja holesterola in njegovih oksidov, smo izbrali tiste, ki so se izkazali kot najbolj primerni za osnovo modifikacije metode, ki je prilagojena naši vrsti vzorca (ribje meso).

4.1.1 Metoda 1 – vključuje vroče umiljanje

Za določanje holesterola smo na samem začetku uporabili modificirano metodo po Naeemi-ju (Naeemi in sod., 1995).

Vsebnost holesterola smo kvantitativno določali z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Primerjali smo retencijski čas vrha kromatograma, ki predstavlja holesterol v standardni raztopini z retencijskim časom vrha, ki predstavlja holesterol v vzorcu. Kadar se retencijski čas vrha kromatograma vzorca ujema s časom vrha kromatograma standardne raztopine, sklepamo, da vrh predstavlja holesterol.

Postopek:

Homogenizacija vzorca

Vsak vzorec smo analizirali v dveh paralelkah. Vzeli smo 2 g ($\pm 0,001$ g) predhodno homogeniziranega vzorca in ga po dodatku 10 ml destilirane vode, homogenizirali v steklenem homogenizatorju s teflonskim batom, 1 minuto pri 2500 vrt/min.

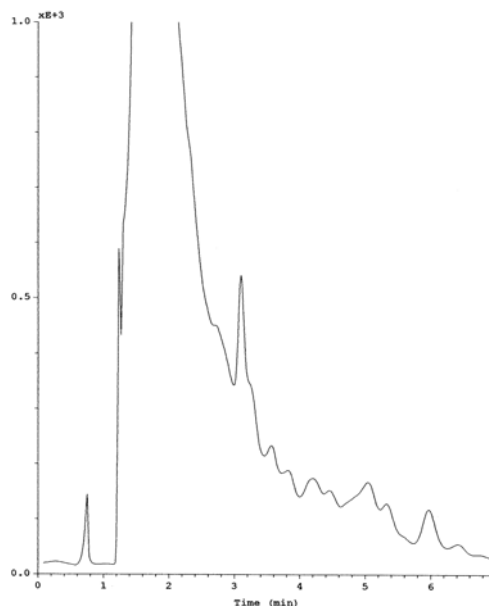
Vročje umiljanje

Po končani homogenizaciji smo vsebino prelili v bučko in dodali 10 ml 50 % KOH ter 20 ml 96 % etanola. Vse skupaj smo segravali 15 min pri 60 °C v vodni kopeli s povratnim hladilnikom.

Ekstrakcija

Po končanem segrevanju smo bučko z nastalo bistro raztopino ohladili na sobno temperaturo in nato vsebino prelili v lij ločnik. Dodali smo 10 ml heksana ter 2 minuti močno stresali. Po ločitvi smo 10 minut centrifugirali (pri $1000 \times g$) zgornjo heksansko fazo, nato pa odpipetirali 5 ml le te v temno vialo. Heksan smo odparili s prepihanjem z dušikom. Suh preostanek smo zamrznili pri -20 °C do analize s HPLC.

- Tekom izvajanja metode smo ugotavljali, da metoda ni najbolj ustrezna, saj vključuje vroče umiljanje maščob. Naš namen je bil, da določimo tako realno vsebnost holesterola, kot tudi vsebnost oksidov holesterola v naših vzorcih ribjega mesa, zato smo domnevali, da rezultati te analize ne bi bili pravilni. Tekom vročega umiljanja se nam del prisotnega holesterola gotovo oksidira (pretvori v okside holesterola) in tako se nam dejanska slika vsebnosti prisotnega holesterola, kot tudi oksidov holesterola povsem spremeni.



Slika 5: Kromatogram neuspešne analize, ki vključuje vroče umiljanje

Na podlagi navedenih ugotovitev in neustreznega kromatograma (slika 5) smo se odločili, da za našo analizo uporabimo metodo, ki vključuje hladno umiljanje.

4.1.2 Metoda 2 – vključuje hladno umiljanje

Pri nadaljnjem delu smo za osnovo določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola tokrat izbrali metodo po Ubhayasekera-ju (Ubhayasekera in sod., 2004).

Metodo sestavlja faza hladnega umiljanja, ekstrakcije holesterola, SPE postopek (solid phase extraction) ter identifikacija oz. določanje vsebnosti holesterola. Vsebnost holesterola smo kvantitativno določali z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Primerjali smo retencijski čas vrha kromatograma, ki predstavlja holesterol v standardni raztopini z retencijskim časom vrha, ki predstavlja holesterol v vzorcu.

Princip metode po Ubhayasekera-ju (Ubhayasekera in sod., 2004):

Hladno umiljanje

V erlenmajerico s teflonskim pokrovčkom smo odtehtali 1,5 g ($\pm 0,001$ g) homogeniziranega in zamrznjenega vzorca. Dodali smo 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2) in 7 ml 1M raztopine KOH v 95% etanolu. Vse skupaj smo temeljito premešali nato pa pustili vsebino mešati še na magnetnem mešalu 18-20 ur na sobni temperaturi. S tem postopkom je bila izvedena faza hladnega umiljanja. Po končanem umiljanju smo vsebino prefiltrirali skozi filtrirni papir v lij ločnik in pričeli z ekstrakcijo holesterola.

Ekstrakcija holesterola

V lij ločnik v katerem je bil prisoten filtrat smo dodali 10 ml diklorometana (CH_2Cl_2) in 10 ml destilirane H_2O , ter vse skupaj temeljito premešali. Lij ločnik smo pustili stati, da sta se polarna in nepolarna faza ločili, nato pa smo spodnjo, polarno – vodno fazo, odstranili. Nepolarno fazo smo nato spirali z dodatkom 5 ml 0,5 M KOH v destilirani vodi in nekaj kapljic nasičene raztopine NaCl, ter temeljito mešali. Ob ločitvi obeh faz, smo ponovno odstranili spodnjo vodno fazo, gornjo nepolarno fazo pa smo spirali, tokrat s 5 ml destilirane vode, dokler ni bila spodnja vodna faza popolnoma bistra. Obe še pomešani fazi

smo pretočili v centrifugirko z navojem in centrifugirali 10 min (pri 1000 x g). 5 ml gornje faze, smo previdno odpipetirali v epruveto, ter vsebino prepihali z dušikom, da je topilo izhlapelo. Suhi ostanek smo nato raztopili v 1 ml raztopine heksan/dietileter (75:25) in s tem smo pripravili vzorec za postopek ločevanja holesterola z SPE postopkom.

SPE postopek

Silica kolono smo najprej kondicionirali s 3 ml heksana (eluat smo zavrgli), nato smo na kolono uvajali 1 ml ustrezno raztopljenega suhega ostanka vzorca v raztopini heksan/dietileter (75:25) in pazili, da le ta počasi potuje skozi kolono (zaradi boljše vezave holesterola), eluat smo tudi tokrat zavrgli. Neželjene komponente smo izpirali z uvajanjem 3 ml raztopine heksan/dietileter (75:25) in 3 ml raztopine heksan/dietileter (60:40) (eluat smo zavrgli). Nato smo odcepili morebitno vezan holesterol in njegove okside iz kolone s 4 ml razt. aceton/metanol (60:40), to frakcijo smo prestregli in topilo odstranili z dušikom. Suhi preostanek smo raztopili v mobilni fazi in vodili na HPLC za določitev vsebnosti holesterola oz. derivatizirli in vodili na GC za določanje oksidov holesterola.

- Tekom izvajanja zgoraj opisane metode, smo v fazi ekstrakcije z diklorometanom, ki je težji od vode (1,33 kg/l) spoznali, da bomo le stežka izvajali postopek ekstrakcije kot opisuje članek tako, da bi tekom postopka prihajalo do čim manjših izgub. Idealno bi namreč bilo izvajati ekstrakcijo s topilom, ki je lažje od vode (bolj kvantitativno ločevanje faz). Odločili smo se, da s primerjanjem izbranih organskih topil z diklorometanom, poiščemo ustrežnejše topilo za ekstrakcijo molekul holesterola.

4.1.2.1 Primerjanje ustreznosti različnih organskih topil

Naša naloga je bila poiskati topilo, v katerem se holesterol najbolj raztaplja, ki je lažji od vode, izvajanje ekstrakcije oz. ločevanje faz (polarna/nepolarna) naj bo enostavno, metoda naj bo izvedena bolj kvantitativno (manj izgub ob prenašanju vzorcev).

Testiranje ustreznosti in učinkovitosti organskih topil holesterola:

Za testiranje topnosti smo izbrali naslednja topila: diklorometan, dietileter, heksan

Testiranja izbranih topil smo izvedli po naslednjem postopku:

Hladno umiljanje

V tri erlenmajerice s teflonskim pokrovčkom smo odtehtali 1,5 g ($\pm 0,001$ g) istega homogeniziranega in zamrznjenega vzorca. Dodali smo 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2) in 7 ml 1M raztopine KOH v 95 % etanolu. Vse skupaj smo temeljito premešali nato pa pustili vsebino mešati na magnetnem mešalu na sobni temperaturi še 18-20 ur.

S tem postopkom smo izvedli fazo hladnega umiljanja. Po končanem umiljanju smo vsebino prefiltrirali skozi črn filtrirni papir v lij ločnik in pričeli z ekstrakcijo holesterola.

Ekstrakcija holesterola

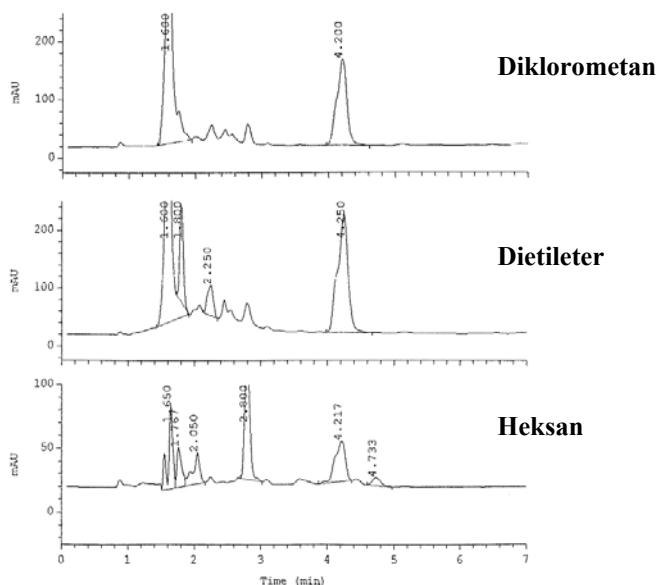
V lije ločnike, v katerih so bili prisotni filtrati paralelk smo dodali v vsakega po 10 ml enega izmed izbranih organskih topil (diklorometan, dietileter, heksan) in 10 ml destilirane H_2O , ter vse skupaj temeljito premešali. Lije ločnike smo pustili stati, da sta se ločili polarna in nepolarna faza, nakar smo vodno fazo odstranili. Nepolarno fazo smo nato spirali z dodatkom 5 ml 0,5 M raztopine KOH v destilirani vodi in nekaj kapljic nasičene raztopine NaCl, ter vse skupaj temeljito premešali. Po ločitvi obeh faz smo ponovno

odstranili vodno fazo, nepolarno fazo pa spirali s 5 ml destilirane vode. Po ponovni ločitvi faz, smo nepolarne faze previdno odpipetirali v epruvete, ter jih prepihovali z dušikom, da smo odstranili topilo. Suhi preostanek smo raztopili v 1 ml mobilne faze sestavljene iz acetonitrila in izopropanola v volumskem razmerju 55:45. Raztopine smo prenesli v penicilinke in tako so bili naši vzorci pripravljene za določanje vsebnosti holesterola s HPLC analizo.

Iz rezultatov tega postopanja smo glede na opažanja med ekstrakcijo in izpiranjem org. faze, ter glede na rezultate (slika 6), določili najbolj učinkovito topilo za holesterol in njegove okside.

Opazanja med procesom ekstrakcije:

- Pri diklorometanu smo imeli poleg problema zamenjanih faz, tudi problem nastanka treh faz. Po centrifugiranju smo namreč dobili gornjo vodno – polarno fazo, srednjo gel fazo in spodnjo nepolarno fazo, ki naj bi jo analizirali. Zaradi prisotnih zgornjih dveh faz, je bil kvantitativen prenos spodnje faze povsem nemogoč (ob vvodu s kapalko sta se zgornji fazi premešali), za pretakanje iz lija v lij pa se nismo odločili, saj smo v takem postopanju uvideli prevelike izgube.
- Z dietiletom je bilo naše delo zelo enostavno. Fazi sta se lepo, predvsem pa hitro ločevali in tudi rezultati HPLC analize so bili najboljši (najvišji pik, torej največja vsebnost holesterola – najmanj izgub tekom postopka, najboljša ekstrakcija) (slika 6).
- Pri heksanu se nam je pri izpiranju organske faze z vodo pojavil nekakšen gel (domnevno želiranje beljakovin oz. primesi in nečistoč), zato nam je bila nadaljnja analiza otežkočena. S centrifugiranjem smo sicer dobili nekaj gornje organske faze (dobili smo ponovno tri faze, srednja faza je gel), ki smo jo potrebovali za HPLC analizo, vendar smo predvidevali, da se je nekaj holesterola poizgubilo z izločitvijo gela, kar lahko razberemo iz slike 6 (najnižji pik).



Slika 6: Primerjava vsebnosti holesterola v vzorcu, po testiranju različnih organskih topil

Na osnovi navedenih ugotovitev smo se odločili, da bomo za določanje vsebnosti holesterola uporabili kot topilo dietileter!

- Naša naslednja naloga je bila podrobneje spremljati postopek ekstrakcije s trdno fazo, oz. poiskati ustrezno kolono za SPE postopek.

4.1.2.2 Ugotavljanje ustreznosti različnih kolon za SPE postopek

Odločili smo se, da SPE postopek natančneje analiziramo, in sicer z lovljenjem in identifikacijo vsakega eluata posebej. Le tako lahko ugotovimo, kako se holesterol dejansko veže na določeno kolono (kolone se razlikujejo po zmogljivosti vezave komponent, odvisno od vrste in tudi proizvajalca) oz. s katerim topilom se nam holesterol najboljše izloči.

Do faze SPE ločevanja smo izvedli postopek umiljanja in ekstrakcije z dietiletom identično, kot je opisano v postopku ugotavljanja ustreznosti različnih organskih topil. Topilo, v katerem je ekstrahirani holesterol smo odstranili s prepihanjem z dušikom, neumiljen suh preostanek pa raztopili v 1 ml raztopine heksan/dietileter (75:25). SPE postopek smo izpeljali zelo sistematično.

Za testiranje smo izbrali kolone: Strata X, C18-VARIAN, Strata SI-1

- Strata X

Sprva smo postopek izvajali s kolono Strata X in lovili vse eluate, za katere smo domnevali, da obstaja verjetnost, da je v njih prisoten izločeni holesterol.

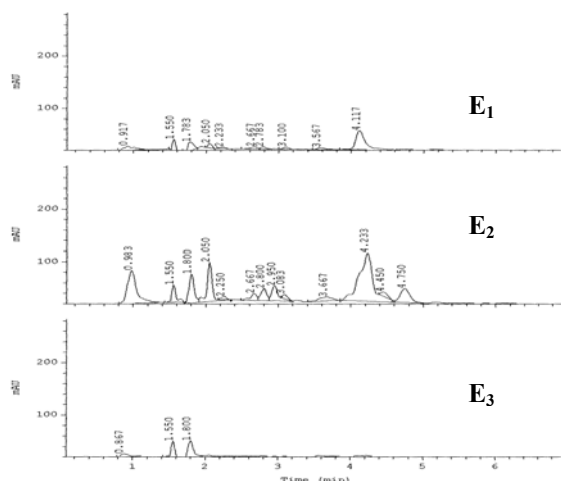
Postopek:

- predhodno kondicioniranje Silica kolone z 3 ml n-heksana
- uvajanje 1 ml razt. vzorca E₁
- uvajanje 3 ml razt. heksan/dietileter (75:25) E₂
- uvajanje 3 ml heksan/dietileter (60:40) E₃
- uvajanje 4 ml razt. aceton/metanol (60:40) E₄

Eluate (E₁, E₂, E₃, E₄) smo vsakega posebej prepihali z dušikom, morebitne suhe preostanke raztopili v mobilni fazi in vodili na HPLC analizo.

Na sliki 7 lahko vidimo, da se nam holesterol sploh ni vezal na kolono Strata X, saj se je začel izločati že kar ob dodajanju vzorca na kolono, preostanek pa se je izločil v drugi eluat. V tretjem in četrtem eluatu ni bilo več niti sledu o prisotnosti holesterola.

Iz rezultatov je razvidno, da kolona Strata X ni primerna za ločevanje holesterola od ostalih komponent pri danem postopku.



Slika 7: Izločanje holesterola, z uporabo kolone Strata X

Možnost uporabe te kolone smo torej izključili in vzeli pod drobnogled kolono C18 VARIAN.

▪ C18 VARIAN

Postopek izvajanja SPE z uporabo kolone C18 Varian. Ponovno smo lovili vse eluate, v katerih je bila verjetnost prisotnosti holesterola.

Postopek:

-predhodno kondicioniranje Silica kolone z 3 ml n-heksana

-uvajanje 1 ml razt. vzorca E₁

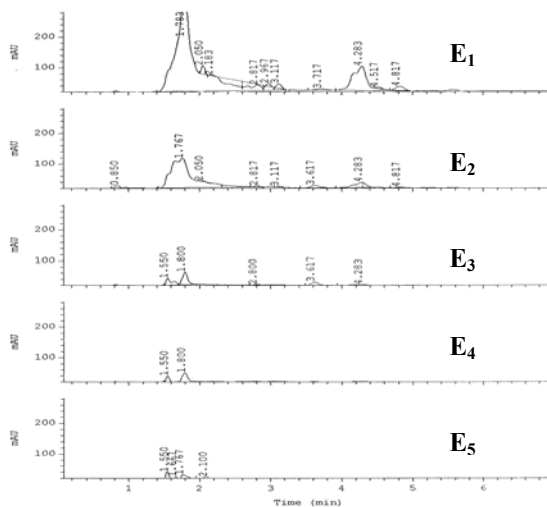
-uvajanje 3 ml metanola E₂

-uvajanje 3 ml razt. heksan/dietileter (75:25) E₃

-uvajanje 3 ml heksan/dietileter (60:40) E₄

-uvajanje 4 ml razt. aceton/metanol (60:40) E₅

Eluate (E₁, E₂, E₃, E₄) smo prepihali z dušikom, morebitne suhe preostanke raztopili v mobilni fazi in vodili na HPLC analizo.



Slika 8: Izločanje holesterola, z uporabo kolone C18 VARIAN

Rezultati te kolone (slika 8) so bili še slabši, kljub temu da smo z uvajanjem 3 ml metanola hoteli doseči morebitno boljšo vezavo holesterola na kolono. Skoraj vsa vsebnost holesterola v vzorcu se je izločila že s prvim eluatom.

Tudi možnost uporabe te kolone smo eliminirali.

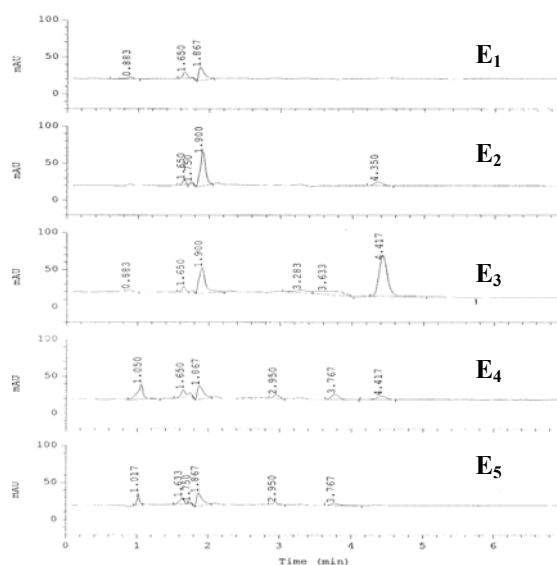
▪ Strata Si-1

Zadnja kolona, ki smo jo imeli na razpolago, je bila kolona Strata Si-1. Z njo smo postopali identično po članku, ki ga navaja Ubhayasekera, le da smo lovili vse eluate in ne samo zadnjega E₄ (po članku), saj smo domnevali, da se nam bo holesterol izločil že nekoliko prej.

Postopek:

- predhodno kondicioniranje Silica kolone z 3 ml n-heksana
- uvajanje 1 ml razt. vzorca E₁
- uvajanje 3 ml razt. heksan/dietileter (75:25) E₂
- uvajanje 3 ml heksan/dietileter (60:40) E₃
- uvajanje 2 ml mobilne faze E₄
- uvajanje 4 ml razt. aceton/metanol (60:40) E₅

Eluate (E₁, E₂, E₃, E₄, E₅) smo prepicali z dušikom, morebitne suhe preostanke raztopili v mobilni fazi in vodili na HPLC analizo.



Slika 9: Izločanje holesterola, z uporabo kolone Strata SI-1

Rezultati kromatograma (slika 9) bi bili zadovoljivi, če se nam bi ves holesterol izločil v enoten eluat oz. z mobilno fazo, vendar pa smo v E₄ zaznali zelo nizek pik, ki je časovno popolnoma enak pikui tretje frakcije; 4,417 min. Iz teh rezultatov je razvidno, da se holesterol izloči v fazi izpiranja.

V našem interesu je bilo izločiti celotno količino prisotnega holesterola v eno samo frakcijo. Glede na to, da je pik E₄ dejansko zelo majhen, bi morebiti lahko postopek ločevanja še kako izboljšali s spremembami tekom SPE postopka.

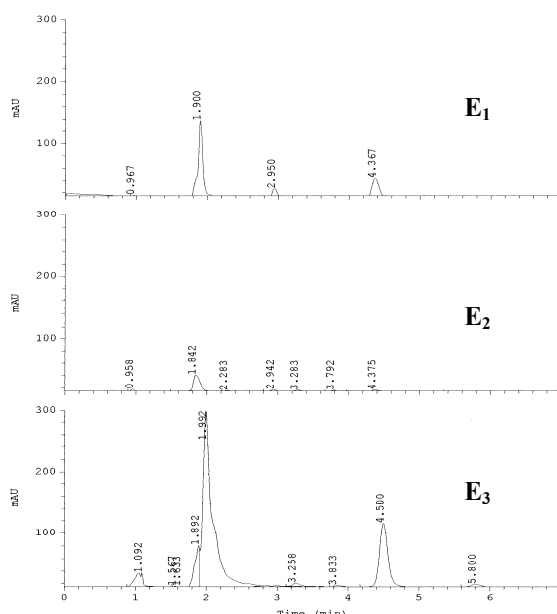
Ker se holesterol ni izločal s heksanom, smo se odločili da kolono izpiramo z večjo količino heksana, ter da uporabimo manjšo količino oz. volumen dietiletra. Že v poizkusih določevanja najustrežnejšega topila smo ugotovili, da se holesterol zelo dobro raztoplja v dietiletru in slabše v heksanu.

- Pri nadaljnjem delu smo poizkusili ugotoviti ustrezno zaporedje in razmerje uvajanih topil, ki bi nam dalo boljše rezultate.

Poizkusili smo z naslednjim postopkom: - kondicioniranje z 3 ml heksana
- uvajanje 1 ml razt. vzorca
- 3 ml heksana E₁
- 3 ml raztopine heksan / dietileter (75:25) E₂
- nato smo osušili kolono
- 2 ml mobilne faze E₃

Lovili smo zadnje tri frakcije in po analizi s HPLC smo ugotovili, da bo tako modificirana metoda ustrezna za naše določevanje holesterola, saj smo tokrat dosegli ustrezno vezavo holesterola na kolono.

Velika večina holesterola se je izločila z mobilno fazo v E₃, kar je bil naš cilj. Mala vsebnost holesterola se je izločila v eluat, ki smo ga lovili ob uvajanju heksana E₁, kar si morebiti lahko pojasnimo kot posledico premajhne kapacitete kolone, v naslednji eluat E₂ pa smo z raztopino heksan/dietileter (75:25) izprali iz kolone še preostali morebitno prisotni nevezani holesterol, katerega vsebnost je komaj zaznavna (slika 10).



Slika 10: Izločanje holesterola z izboljšano SPE metodo

Z rezultati modificiranega postopka smo bili zadovoljni, motilo nas je le še to, da se je manjša količina holesterola izločila že v prvi dve frakciji, kar smo si razlagali s premajhno kapaciteto kolone Strata Si-1. Količina holesterola je bila večja, kot jo je kolona bila

sposobna vezati nase in zato se nam je višek molekul holesterola izločil kar v prvo frakcijo, v drugo frakcijo pa smo izprali še preostanek morebitno nevezanih molekul holesterola, ki so bile prisotne v koloni. Tega pojava bi se morebiti lahko izognili, če bi postopek izvajali z manjšo odtehto vzorca, glede na to da smo določali vzporedno tudi okside holesterola, pa bi potem le te težko določili, kajti njihova vsebnost je tako nizka, da je bila že tokrat komaj zaznavna.

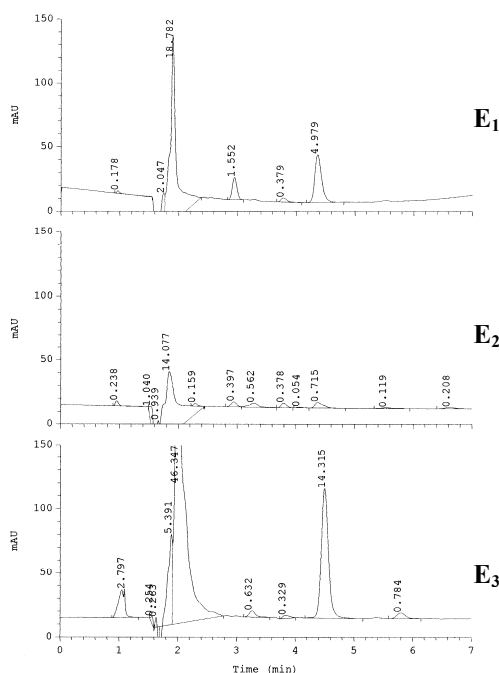
Na podlagi teh rezultatov, smo se odločili da ta postopek oz. modificirano metodo uporabljamo za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v naših vzorcih.

4.2 APLIKACIJA METODE ZA DOLOČANJE HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA V MESU SARDEL IN POSTRVI

Izkoristek metode oz. izgube med izvajanjem postopka modificirane metode za določnje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola smo upoštevali z uporabo faktorja iz umeritvene krivulje (naklon krivulje, slika 12).

Izračunali smo tudi izkoristek modificirane SPE metode, in sicer iz površin izločenega holesterola v vseh treh frakcijah, ki jih lahko vidimo na sliki 11.

Iz slike 11 lahko razberemo, da se je v prvi eluat izločilo kar 24,88 % holesterola, kar si lahko razlagamo z mnogimi dejstvi, kot npr. neustrezno topilo, premajhna kapaciteta kolone, prehitro spuščanje topila skozi kolono in podobno. Delež holesterola v drugem eluatu je bil le 3,57 %, kar kaže na uspešno vezavo molekul holesterola na nosilec kolone. Najpomembneje za nas pa je bilo, da se je večji odstotek vsebnosti holesterola izločila z mobilno fazo, to je v tretji eluat.



Slika 11: Površine izločenega holesterola z izboljšano SPE metodo za izračun izkoristka SPE metode

Izračun izkoristka ekstrakcije s trdno fazo (SPE):

Vsota površin izločenega holesterola vseh treh eluatov: 20,009

Izkoristek = 14,315/ 20,009

Izkoristek modificirane SPE metode je znašal 71,54 %!

4.2.1 Ponovljivost metode določanja holesterola in oksidov holesterola

Ponovljivost znotraj paralelke smo določili tako, da smo šestkrat zaporedoma injicirali isti vzorec (št. 086, sardela), ki smo ga predhodno pripravili po modificirani metodi.

Za ponovljivost znotraj vzorca pa smo analizirali 6 ločeno pripravljenih paralelek enega vzorca (093 I; postrv).

Izračunali smo koeficient variabilnosti (KV) za rezultate holesterola in oksidov holesterola.

Iz preglednice 6 in 7 razberemo, da znaša KV med posameznimi meritvami holesterola manj kot 4 %, kar je zadovoljiv rezultat, na podlagi katerega lahko zaključimo, da je metoda ponovljiva oz. ustrezna za določanje holesterola.

Variabilnost znotraj vzorca je večja od variabilnosti znotraj paralelke, kot smo tudi pričakovali, kajti poleg postopka kromatografske ločbe k variabilnosti prispeva tudi postopek priprave vzorca.

Preglednica 6: Ponovljivost določanja holesterola in oksidov holesterola znotraj paralelke vzorca št. 086 (sardela, Delamaris)

pon.	Holesterol (mg/100 g)	7 β HYHOL (mg/100 g)	20 α HYHOL (mg/100 g)	25 α HYHOL (mg/100 g)
1.	75,67	2,05	1,49	<0,01
2.	72,64	2,13	1,37	<0,01
3.	72,76	2,13	1,23	<0,01
4.	71,91	1,85	1,42	<0,01
5.	73,06	1,91	1,61	<0,01
6.	74,18	-	-	-
SO	1,34	0,13	0,14	-
KV %	1,83	6,38	9,84	-

Preglednica 7: Ponovljivost določanja holesterola in oksidov holesterola znotraj vzorca št. 0931 (postrv, Gameljne)

pon.	Holesterol (mg/100 g)	7 β HYHOL (mg/100 g)	20 α HYHOL (mg/100 g)	25 α HYHOL (mg/100 g)
1.	62,18	0,40	1,49	<0,01
2.	58,55	0,38	1,41	<0,01
3.	58,68	0,35	1,25	<0,01
4.	59,40	0,42	1,58	<0,01
5.	56,10	0,34	1,34	<0,01
6.	57,57	0,39	1,63	<0,01
SO	2,03	0,04	0,14	-
KV %	3,46	7,61	9,94	-

Ravno tako so v preglednicah 6 in 7 predstavljeni rezultati ponovljivosti določanja oksidov holesterola, iz katerih lahko razberemo, da so tokrat KV nekoliko višji, a kljub temu je variabilnost znotraj paralelke za spoznanje manjša od variabilnosti znotraj vzorca.

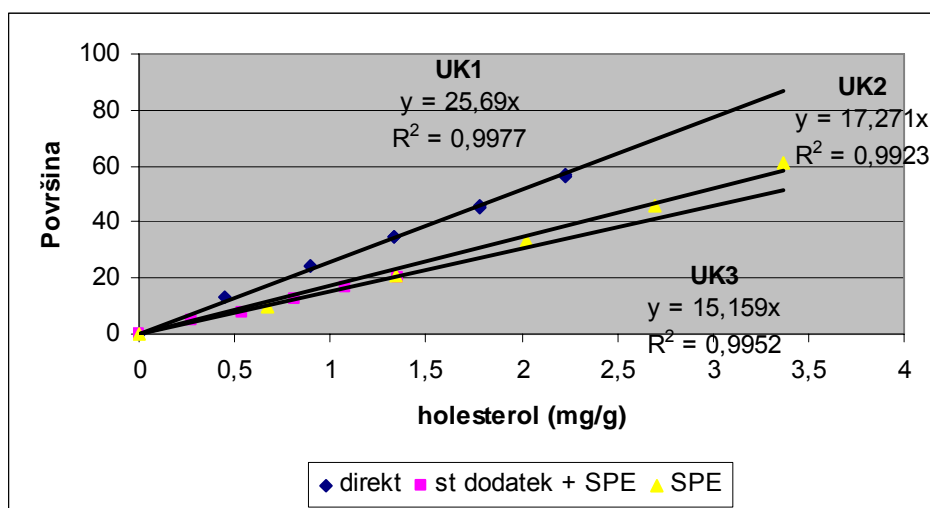
Vsebnosti oksidov holesterola so zelo majhne, tako da smo imeli tekom izvajanja metode težave. Dogajalo se je, da smo pri analizi določenega vzorca v prvi paralelki določili zelo nizko vsebnost oksida holesterola, medtem ko je bila v drugi paralelki istega vzorca vsebnost oksida pod mejo detekcije in oksida nismo zaznali.

Kljub nekoliko višjemu koeficientu variabilnosti, smo zaključili, da je metoda ustrezna za določanje oksidov holesterola .

4.2.2 Linearnost uporabljane kromatografske metode za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola

Za kromatografsko metodo velja, da je linearna, če je determinacijski koeficient (R^2) > 0,98!

Vrednosti R^2 so pri vseh treh krivuljah večje od 0,99, kar pomeni da je bila naša metoda v merjenem območju linearna.



Slika 12: Tri umeritvene krivulje, ki prikazujejo linearnost HPLC določanja vsebnosti holesterola

Iz slike 12 vidimo, da je naklon prve umeritvene krivulje približno za faktor 1,7 višji od naklona UK2, ter za faktor 1,5 višji od UK3. Razlog je v različnih postopkih priprave umeritvenih krivulj:

Prvo umeritveno krivuljo (UK₁) smo pripravili s standardom holesterola, ki smo ga direktno vodili na HPLC.

UK2 smo pripravili le s standardom holesterola, ter vse skupaj podvrgli celotnemu postopku določanja holesterola, kar je tudi vzrok za skoraj 1,7-krat nižji faktor, kajti tekom postopka (hladno umiljanje, ekstrakcija, SPE postopek) prihaja do očitnih izgub.

UK3 pa smo pripravili s standardom holesterola in z vzorci ribjega mesa, ter vse skupaj podvrgli celotnemu postopku ločbe holesterola, kar je privedlo do krivulje z najnižjim faktorjem naklona, kot smo pričakovali.

4.3 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA MESA SARDEL IN POSTRVI

Rezultate sestave mesa sardel in postrvi smo predstavili v dveh delih, in sicer kot osnovna kemijska sestava in maščobnokislinska sestava mesa rib.

4.3.1 Kemijska sestava mesa sardel in postrvi

Ribjemu mesu smo določili vsebnost maščob, beljakovin, vode in pepela, ter vsebnost holesterola in treh oksidov holesterola. Omenjene parametre smo določali tako v vzorcih mesa jadranskih sardel kot tudi v vzorcih mesa postrvi iz dveh različnih ribogojnic, in sicer v dveh ponovitvah.

4.3.1.1 Povprečne vrednosti kemijske sestave mesa rib

Preglednica 8: Povprečna kemijska sestava mesa sardel z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Parameter	n	\bar{x}	min	max	SO	KV (%)
maščoba (g/100 g)	12	4,11	3,30	5,02	0,51	12,49
beljakovine (g/100 g)	12	19,69	19,26	20,40	0,32	1,62
voda (g/100 g)	12	72,36	71,86	73,58	0,51	0,71
pepel (g/100 g)	12	2,69	2,46	3,28	0,24	9,03
Holesterol (mg/100 g)	12	80,92	72,64	84,95	3,84	4,75
HY7 β (mg/100 g)	12	2,30	1,87	3,29	0,35	15,38
HY20 α (mg/100 g)	12	1,33	<0,01	2,00	0,51	38,44
HY25 α (mg/100 g)	12	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	-

n – št. opazovanj; \bar{x} – povprečne vrednosti; **min** – najmanjša vrednost; **max** – največja vrednost; **SO** – standardni odklon; **KV (%)** – koef. variabilnosti

Preglednica 9: Povprečna kemijska sestava mesa postrvi z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

Parameter	n	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
maščoba (g/100 g)	12	4,69	3,13	5,92	0,88	18,70
beljakovine (g/100 g)	12	18,87	17,79	19,79	0,62	3,28
voda (g/100 g)	12	75,09	73,50	78,06	1,47	1,96
pepel (g/100 g)	12	1,26	1,17	1,45	0,10	7,52
holesterol (mg/100 g)	12	57,31	48,82	62,18	3,98	6,95
HY7 β (mg/100 g)	12	0,03	0,00	0,37	0,11	346,41
HY20 α (mg/100 g)	12	0,76	0,00	3,78	1,19	156,03
HY25 α (mg/100 g)	12	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	-

n – št. opazovanj; \bar{x} – povprečne vrednosti; **min** – najmanjša vrednost; **max** – največja vrednost; **SO** – standardni odklon; **KV (%)** – koef. variabilnosti

Opazanja o variabilnosti posameznih parametrov so tako pri sardelah kot tudi pri postrveh podobna, in sicer najmanj variabilen parameter v mesu rib je voda ($KV_{\text{sardel}} = 0,71$; $KV_{\text{postrvi}} = 1,96$), razlike med minimalno in maksimalno vrednostjo so zelo majhne. Nekoliko bolj je variiral delež beljakovin ($KV_{\text{sardel}} = 1,62$; $KV_{\text{postrvi}} = 3,62$), zatem delež holesterola, delež pepela pa je variiral najmočneje pri obeh vrstah rib, v sardelah 9,03 %

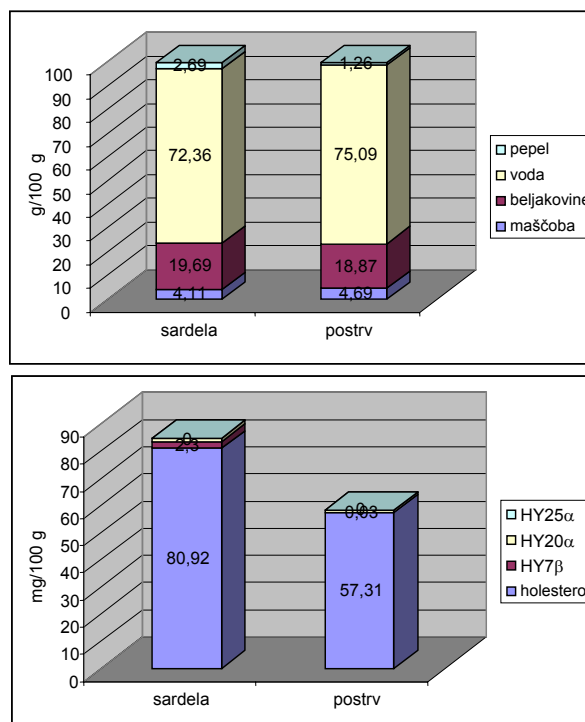
za postrvi pa 7,52 %. Zelo variabilen parameter so bile maščobe, saj so razlike med minimalno in maksimalno vrednostjo dokaj velike. Torej koeficient variabilnosti za meso sardel znaša 12,49 %, za meso postrvi pa kar 18,70 %. Od vseh merjenih parametrov so bili oksidi holesterola tisti, ki so zelo izstopali iz naših rezultatov, njihova vsebnost je bila zelo nizka.

4.3.1.2 Primerjave rezultatov kemijske sestave mesa sardel in postrvi

Preglednica 10: Primerjava povprečne kemijske sestave mesa sardel in postrvi (LSM ± SEM) in značilnost razlike

Parameter	Sardela	Postrv	Razlika med vrstama (P-vrednost)
maščoba (g/100 g)	4.11±0.23	4.69±0.23	-0.58
beljakovine (g/100 g)	19.69±0.16	18.87±0.16	0,82**
voda (g/100 g)	72.36±0.28	75.09±0.28	-2,73***
pepel (g/100 g)	2.69±0.05	1.26±0.05	1,43***
holesterol (mg/100 g)	80.92±1.19	57.31±1.19	23,61***
HY7β (mg/100 g)	2.3±0.08	0.03±0.08	2,27***
HY20α (mg/100 g)	1.33±0.22	0.76±0.22	0,57
HY25α (mg/100 g)	<0,01	<0,01	<0,01

LSM – least square mean – pričakovane srednje vrednosti; SEM – standard error mean – standardna napaka ocene; *** P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; ** P ≤ 0,01 statistično visoko značilna razlika; *P ≤ 0,05 statistično značilna razlika.



Slika 13: Primerjava kemijske sestave mesa sardel in postrvi

Iz slike 13 je vidno, da se meso sardele statistično zelo razlikuje od mesa postrvi v vsebnosti holesterola, vode, pepela ter 7β-hidroksiholesterola.

Vsebnost maščob je pri obeh vrstah rib dokaj podobna, vsebnost beljakovin pa je pri sardelah večja (19,69±0,16 %) od postrvi, razlika je statistično visoko značilna (0,82 %).

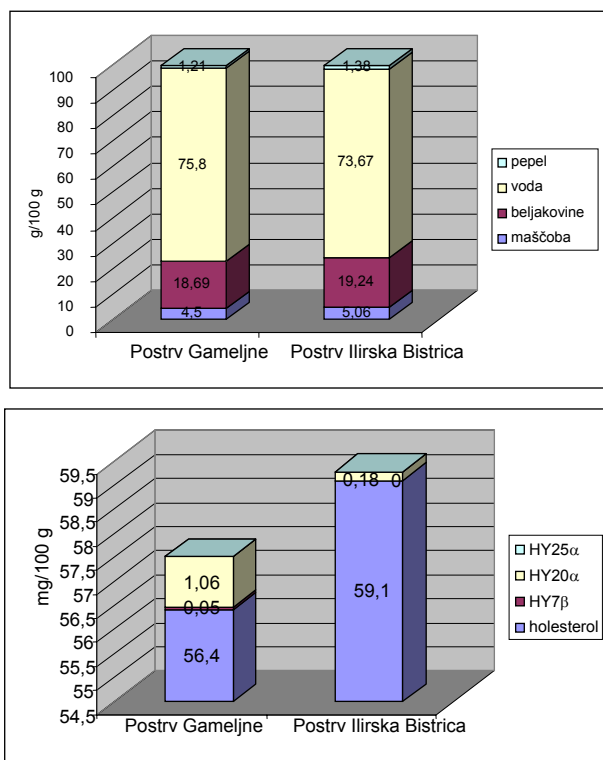
Znatno več vode vsebujejo postrvi 75,09±0,28 %, to je kar za 2,73 % več od mesa sardel, ki pa vsebujejo več kot enkrat večji odstotek pepela (2,69±0,05 %) kot meso postrvi (1,26±0,05 %). Meso sardel pa gotovo najbolj izstopa v vsebnosti holesterola, ki znaša kar 80,92±1,19 mg/100 g, kar je za 23,61 mg/100 g več od mesa postrvi; večje so tudi vsebnosti oksidov holesterola.

4.3.1.3 Primerjava kemijske sestave mesa postrvi, vzgojenih v različnih ribogojnicah

Preglednica 11: Primerjava rezultatov kemijskih analiz mesa postrvi, vzgojenih v različnih ribogojnicah (LSM ± SEM) in značilnost razlike

Parameter	Postrv, Gameljne	Postrv, Ilirska Bistrica	Razlika med ribogojnicama (P-vrednost)
maščoba (g/100 g)	4.50±0.31	5.06±0.44	-0,55
beljakovine (g/100g)	18.69±0.21	19.24±0.29	-0,54
voda (g/100 g)	75.80±0.39	73.67±0.54	2,13***
pepel (g/100 g)	1.21±0.01	1.38±0.01	-0,18***
Holesterol (mg/100 g)	56.41±1.39	59.10±1.97	-2,69
HY7β (mg/100 g)	0.05±0.04	0.00±0.06	0,05
HY20α (mg/100 g)	1.06±0.41	0.18±0.58	0,88
HY25α (mg/100 g)	<0,01	<0,01	<0,01

LSM – least square mean – pričakovane srednje vrednosti; SEM – standard error mean – standardna napaka ocene; ***P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; **P ≤ 0,01 statistično visoko značilna razlika; *P ≤ 0,05 statistično značilna razlika.



Slika 14: Primerjava kemijske sestave mesa postrvi, gojenih v različnih ribogojnicah in različnih starosti (Gameljne, 14 mesecev; Ilirska Bistrica 18 mesecev)

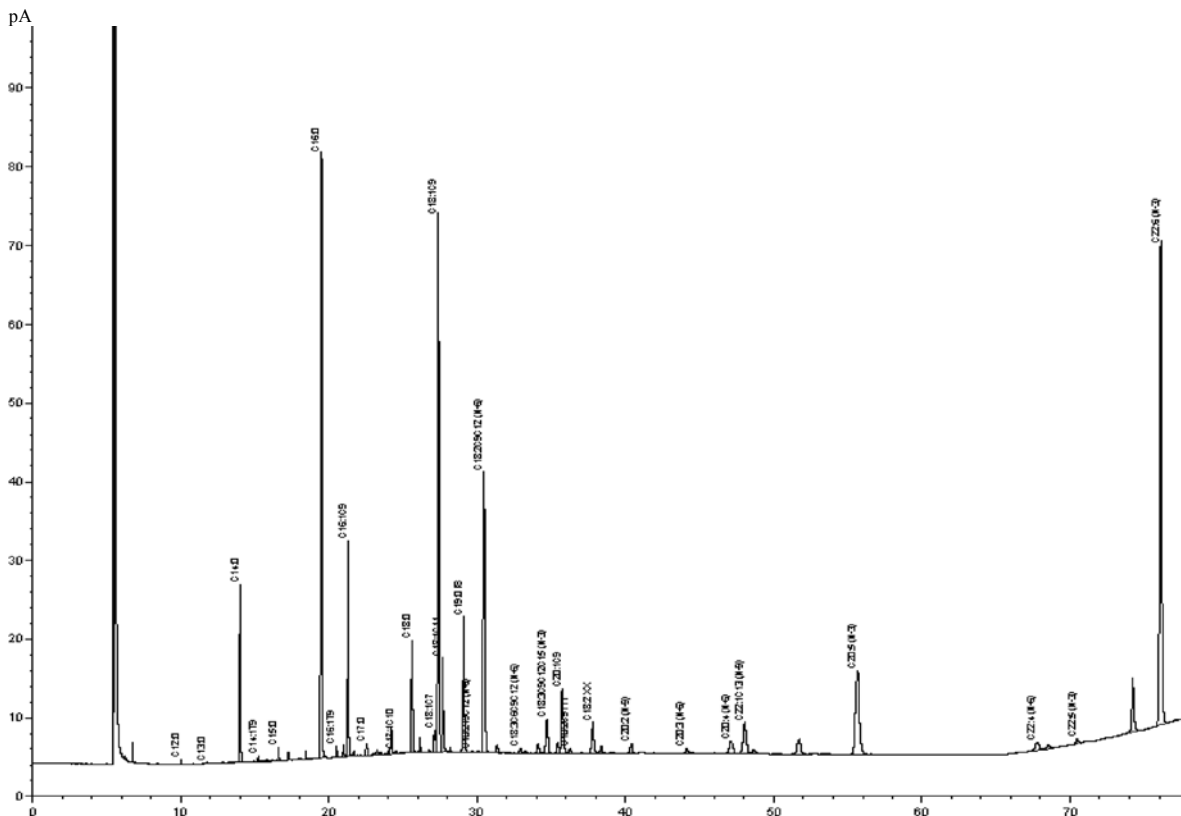
V kemijski sestavi mesa postrvi, gojenih v Gameljnih ter Ilirski Bistrici, zasledimo statistično zelo visoko značilno razliko le pri vsebnosti vode in pepela, vrednosti vseh ostalih merjenih parametrov, tako maščobe, beljakovin kot tudi holesterola in oksidov holesterola so zelo podobne in iz rezultatov ne zasledimo statistično značilnih razlik kljub temu, da so bile ribe različnih starosti (Gameljne, 14 mesecev; Ilirska Bistrica, 18 mesecev) in krmljene z različno prehrano.

4.4 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA LIPIDOV SARDEL IN POSTRVI

Maščobnokislinsko sestavo smo prikazali kot utežni odstotek posameznih MK od vseh določenih MK v maščobi sardel in postrvi. Tak način prikazovanja podatkov se pojavlja v večini literature. Takšni podatki so težje primerljivi med seboj, saj se v različnih raziskavah določa različno število MK. Za prehranske namene je bolj uporabno podajanje podatkov v mg MK na 100 g mesa. Rezultate o vsebnosti MK v mg/100 g mesa smo določili računsko in z uporabo internega standarda (SIGMA C19:0).

4.4.1 Identifikacija maščobnih kislin

MEMK naših vzorcev smo identificirali s primerjavo retencijskih časov MEMK standardne mešanice NuCheck 85, 68 D, 411, 546 ter standardi Sigma MIX 37 (MEMK CLA 18:2 9C11T in 18:2 10T12C).



Slika 15: Plinski kromatogram MK sestave vzorca 092I (sardela, paralelka 1)

V maščobi sardel smo določili **42 MK**. Od tega jih je bilo:

- **10 nasičenih:** lavrinska (C12:0), tridekanojska (C13:0), miristinska (C14:0), pentadekanojska (C15:0), palmitinska (C16:0), margarinska (C17:0), stearinska (C18:0), eikozanojska (C20:0), dokozanojska (C22:0), trikozanojska (C23:0) MK.
- **14 enkrat nenasičenih:** miristooleinska (C14:1n-9C), *trans*-miristooleinska (C14:1n-9T), palmitooleinska (C16:1n-9C), *trans*-palmitooleinska (C16:1n-9T), heptadecenojska (C17:1n-10C), *trans*-heptadecenojska (C17:1n-10T), oleinska (C18:1n-9C), elaidinska (C18:1n-9T), vakcenska (C18:1n-11C), *trans*-vakcenska (C18:1n-11T), gadoleinska (C20:1n-9C), *trans*-gadoleinska (C20:1n-9T), eruka MK (C22:1n-9) in nevronska (C24:1n-9C).
- **18 večkrat nenasičenih:** linolna (C18:2n-6C), 3 konjugirane linolne (C18:2TC; C18:2C9T11; C18:2T10C12), *trans*-linolna (C18:2n-6T), γ -linolenska (C18:3n-6C), α -linolenska (C18:3n-3C), steraidonska (C18:4n-3C), eikozadienojska (C20:2n-9C), eikozatrienojska (C20:3n-9C; C20:3n-6C), arahidonska (C20:4n-6C), eikozapentaenojska-EPK (C20:5n-3C), dokozatrienojska (C22:3n-6C), dokozatetraenojska (C22:4n-6C), dokozatetraendiojska (C22:4n-3C), dokozapentaendiojska-DPK (C22:5n-3C) in dokozahexaenojska kislina-DHK (C22:6n-3).

4.4.2 Ponovljivost metode določanja maščobnih kislin

S plinsko kromatografijo pri danih pogojih smo lahko dobro ločili posamezne MEMK. Ponovljivost injiciranja (znotraj paralelke) smo proučevali na vzorcu 095 (postrv, Gameljne, paralelka 1), ponovljivost znotraj vzorca pa na vzorcu 097 II (postrv, Ilirska Bistrica, paralelka 2).

➤ Ponovljivost znotraj paralelke:

Vzorec smo zaestrili po postopku ISTE in ga nato injicirali 6-krat zaporedoma.

Za 28 opazovanih maščobnih kislin so bili koeficienti variabilnosti < 3 %, za ostale pa med 3 in 6 %, razen pri C15:0 kjer je bil 10,22 % in C17:0 kjer je znašal 10,91 %. Podrobnejši podatki o ponovljivosti znotraj paralelke so prikazani v preglednici 12!

➤ Ponovljivost znotraj vzorca:

Pripravili smo 6 paralelk istega vzorca 097 II in jih zaporedoma injicirali isti dan.

Koeficienti variabilnosti so < 6 % za 28 opazovanih maščobnih kislin, za ostale opazovane MK pa med 5 in 10 %, razen pri C14:1C9 kjer znaša koeficient kar 37,93 % in pri C18:1T9 pa 19,38 %. Podrobnejši podatki o ponovljivosti znotraj vzorca so prikazani v preglednici 13!

V splošnem smo lahko zaključili, da je bila ponovljivost določanja MK znotraj vzorca dobra in da je bila kromatografska kolona HP-88 primerna za ločbo identificiranih MK.

Preglednica 12: Ponovljivost znotraj paralelke vzorca postrvi št. 095 (ut % MK od skupnih MK).

MK	1.PON.	2.PON.	3.PON.	4.PON.	5.PON.	6.PON.	POVP. (ut. %)	SO	KV (%)
C12:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,003	3,42
C13:0	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,00	0,02	0,009	-
C14:0	4,02	3,99	4,04	4,02	4,00	4,06	4,02	0,024	0,59
C14:1, trans-9	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,14	0,006	4,27
C14:1, cis-5	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,002	5,08
C15:0	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,40	0,33	0,034	10,22
C16:0	14,46	14,39	14,60	14,52	14,44	14,41	14,47	0,071	0,49
C16:1, trans-7	0,29	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,001	0,32
C16:1, cis-7	6,15	6,13	6,18	6,15	6,12	6,11	6,14	0,025	0,40
C17:0	0,46	0,45	0,46	0,45	0,45	0,59	0,48	0,052	10,91
C17:1, trans-7	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,003	3,06
C17:1, cis-7	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,88	0,90	0,009	1,05
C18:0	2,63	2,61	2,66	2,64	2,63	2,65	2,64	0,015	0,56
C18:1, trans-9	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,005	5,99
C18:1, cis-11	0,65	0,66	0,64	0,65	0,64	0,65	0,65	0,008	1,23
C18:1, cis-9	17,15	17,19	17,10	17,10	17,11	17,11	17,13	0,032	0,19
C18:1, cis-11	2,82	2,80	2,79	2,81	2,80	2,78	2,80	0,013	0,48
C18:2, trans-9,trans12	0,16	0,16	0,15	0,17	0,17	0,17	0,16	0,007	4,09
C18:2, trans-9,cis-12	0,10	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,003	3,17
C18:2, cis-9, cis-12	10,06	10,15	9,95	9,98	10,03	10,01	10,03	0,066	0,66
C18:3, n-6	0,30	0,30	0,31	0,30	0,30	0,30	0,30	0,002	0,61
C18:3, n-3	1,37	1,38	1,36	1,36	1,37	1,36	1,37	0,007	0,51
C20:0	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,003	2,67
C20:1, trans-11	0,46	0,46	0,45	0,45	0,46	0,46	0,46	0,004	0,93
C20:1, cis-11	2,75	2,75	2,70	2,71	2,76	2,76	2,74	0,024	0,87
C18:2, cis-9,trans-11	0,23	0,22	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,004	1,59
C18:2, trans-10,cis-12	0,00	0,00	0,00	0,03	0,02	0,00	0,01	0,012	-
C18:4, n-3	1,72	1,71	1,72	1,71	1,71	1,70	1,71	0,007	0,44
C20:2, n-9	0,43	0,44	0,43	0,43	0,44	0,43	0,43	0,002	0,52
C20:3, n-3	0,31	0,33	0,31	0,31	0,35	0,32	0,32	0,017	5,20
C20:3, n-6	0,89	0,88	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,006	0,64
C20:4, n-6	2,11	2,09	2,06	2,07	2,13	2,12	2,10	0,027	1,28
C20:5, n-3	7,60	7,55	7,74	7,67	7,59	7,57	7,62	0,065	0,85
C22:0	0,00	0,06	0,00	0,00	0,05	0,00	0,02	0,025	-
C22:1, n-9	0,31	0,30	0,30	0,31	0,32	0,32	0,31	0,009	2,94
C24:1, n-9	0,26	0,26	0,25	0,25	0,26	0,26	0,26	0,002	0,96
C22:3, n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	-
C22:4, n-6	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,001	0,16
C22:4, n-3	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,001	0,50
C22:5, n-3	2,56	2,55	2,56	2,55	2,55	2,54	2,55	0,007	0,26
C23:0	1,22	1,23	1,20	1,22	1,23	1,23	1,22	0,010	0,83
C22:6, n-3	15,85	15,69	15,88	15,96	15,88	15,83	15,85	0,080	0,51

PON - ponovitev; POVP. - povprečne vrednosti (%); SO - standardni odklon; KV - koeficient variabilnosti;

Preglednica 13: Ponovljivost znotraj vzorca postrvi št. 097 II (ut % MK od skupnih MK).

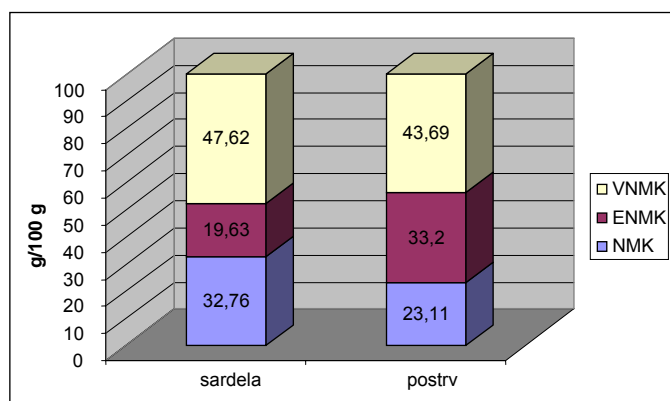
MK	1.PON.	2.PON.	3.PON.	4.PON.	5.PON.	6.PON.	POVP. (ut. %)	SO	KV (%)
C12:0	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	0,03	0,01	-
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
C14:0	3,76	3,78	3,82	3,82	3,76	3,87	3,80	0,04	1,00
C14:1, trans-9	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17	0,00	1,06
C14:1, cis-5	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,10	0,05	0,02	37,93
C15:0	0,35	0,35	0,36	0,35	0,35	0,36	0,35	0,00	0,78
C16:0	13,49	13,35	13,31	13,32	13,28	13,38	13,35	0,07	0,52
C16:1, trans-7	0,30	0,30	0,31	0,31	0,30	0,32	0,31	0,01	2,40
C16:1, cis-7	4,82	4,85	4,87	4,87	4,85	4,90	4,86	0,03	0,51
C17:0	0,48	0,48	0,60	0,49	0,48	0,50	0,51	0,04	8,52
C17:1, trans-7	0,13	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,01	8,89
C17:1, cis-7	0,60	0,62	0,63	0,63	0,63	0,63	0,62	0,01	1,90
C18:0	2,81	2,65	2,58	2,58	2,58	2,60	2,64	0,08	3,14
C18:1, trans-9	0,16	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,11	0,02	19,38
C18:1, cis-11	0,97	0,94	0,96	0,96	0,95	0,95	0,96	0,01	0,78
C18:1, cis-9	20,52	20,36	20,27	20,28	20,29	20,31	20,34	0,09	0,43
C18:1, cis-11	2,82	2,80	2,80	2,79	2,80	2,78	2,80	0,01	0,39
C18:2, trans-9,trans12	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	-
C18:2, trans-9,cis-12	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,01	9,29
C18:2, cis-9, cis-12	8,39	8,35	8,32	8,33	8,33	8,34	8,34	0,02	0,29
C18:3, n-6	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,00	0,98
C18:3, n-3	2,26	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	0,00	0,17
C20:0	0,15	0,15	0,15	0,13	0,14	0,14	0,14	0,01	6,12
C20:1, trans-11	0,86	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,00	0,45
C20:1, cis-11	4,80	4,85	4,86	4,85	4,87	4,85	4,85	0,02	0,46
C18:2, cis-9,trans-11	0,27	0,27	0,27	0,28	0,27	0,27	0,27	0,00	1,22
C18:2, trans-10,cis-12	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	0,03	0,02	-
C18:4, n-3	1,31	1,34	1,34	1,34	1,34	1,33	1,33	0,01	0,65
C20:2, n-9	0,44	0,44	0,44	0,43	0,44	0,43	0,44	0,00	0,76
C20:3, n-3	0,23	0,21	0,19	0,21	0,23	0,20	0,21	0,02	7,50
C20:3, n-6	0,67	0,64	0,64	0,63	0,63	0,64	0,64	0,01	2,27
C20:4, n-6	4,31	4,37	4,36	4,36	4,39	4,35	4,36	0,02	0,53
C20:5, n-3	4,83	4,89	4,90	4,88	4,91	4,89	4,88	0,03	0,54
C22:0	0,05	0,07	0,00	0,08	0,05	0,00	0,04	0,03	-
C22:1, n-9	0,58	0,61	0,59	0,59	0,61	0,58	0,59	0,01	2,01
C24:1, n-9	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,00	0,47
C22:3, n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
C22:4, n-6	0,38	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,46	0,03	7,02
C22:4, n-3	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,23	0,22	0,00	1,00
C22:5, n-3	1,88	1,91	1,91	1,90	1,91	1,89	1,90	0,01	0,52
C23:0	1,08	1,05	1,06	1,09	1,05	1,09	1,07	0,02	1,47
C22:6, n-3	15,17	15,42	15,53	15,55	15,58	15,47	15,45	0,14	0,89

PON - ponovitev; POVP. - povprečne vrednosti (%); SO - standardni odklon; KV - koeficient variabilnosti;

4.4.3 Povprečne vsebnosti maščobnokislinske sestave lipidov sardel in postrvi

Povprečne vsebnosti MK sestave lipidov sardel in postrvi so podrobneje prikazane v preglednici 14.

V povprečju so maščobe sardel vsebovale najmanj ENMK (19,63 %) in so bile najbolj variabilne (KV = 2,51 %), sledile so NMK (32,76 %, KV = 2,42 %) največ pa so maščobe sardel vsebovale VNMK (47,62 %), katerih koeficient variabilnosti je znašal le 1,94 %. Maščobe postrvi so vsebovale najmanj NMK (23,11 %) in so bile tudi najmanj variabilne (KV = 3,17 %), sledile so ENMK (33,20 %, KV = 9,49 %) in največ so maščobe postrvi vsebovale VNMK (43,69 %), katerih koeficient variabilnosti je znašal 6,19 % (slika 16).



Slika 16: Primerjava vsebnosti posameznih skupin MK v lipidih sardel in postrvi

- NMK

Izmed nasičenih maščobnih kislin znaša pri sardelah palmitinska kislina (C16:0) kar 66 % od vseh desetih NMK, ki smo jih analizirali, je pa tudi na drugem mestu od vseh analiziranih MK (21,04 %), medtem ko pri mesu postrvi zastopa tretje mesto od vseh MK (14,34 %), a kljub temu predstavlja kar 62 % vseh desetih NMK. Maščobe obeh analiziranih vrst rib vsebujejo enako zaporedje prvih treh NMK, zaporedje tistih z manjšimi deleži pa se razlikuje. Vendar bistveni so podatki o miristinski in palmitinski kislini, ki najbolj prispevata k zvišanju nivoja holesterola v krvi (Grundy, 2003).

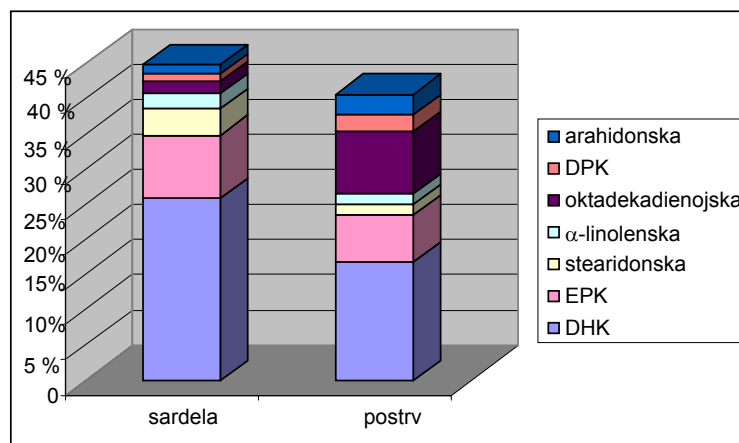
Maščobe sardel zatorej vsebujejo 21,04 % palmitinske kisline od vseh analiziranih MK (KV znaša 2,78%), delež miristinske kisline (C14:0) znaša 5,03 %, stearinske (C18:0) 3,34 %, sledi pa še margarinska (C17:0) z deležem 1,27 % ter ostale z deležem nižjim od 1 %. Maščobe postrvi pa vsebujejo 14,34 % palmitinske kisline od vseh MK, (KV znaša 2,78 %), delež miristinske kisline (C14:0) znaša 3,79 %, stearinske (C18:0) 2,87 %, sledi pa še trikozanojska (C23:0) z deležem 1,11 % ter ostale z deležem nižjim od 1 %.

- ENMK

Pri maščobah postrvi predstavlja največji delež oleinska kislina (C18:1n-9) in sicer 17,99 %, le ta spada v skupino ENMK, sledi ji palmitooleinska (C16:1n-7C) z deležem 5,52 %, eikozaenojska (C20:1C) 3,43 % ter še ostale z manjšimi deleži. Pri sardelah znaša delež oleinske kisline (C18:1n-9) 8,24 %, njen KV pa je drugi največji izmed vseh določenih MK, saj znaša kar 29,41 %. Oleinski kislini sledi palmitooleinska (C16:1n-7C) z deležem 4,0 %, ostale pa z manjšimi deleži.

- VNMK

DHK (C22:6n-3C) predstavlja pri maščobah sardel največji delež od vseh MK, ta znaša 25,86 % v skupini VNMK predstavlja kar 54,3 %, medtem ko pri maščobah postrvi predstavlja drugi največji delež od vseh MK (16,71 %) in tako pomembno prispeva k deležu n-3 MK. Pri sardelah z 8,97 % sledi EPK (C20:5) nato stearidonska (C18:4n-3) z 3,84 %, α -linolenska (C18:3n-3C) 2,16 % ter ostale kisline z deležem manjšim od 1 %, pri postrveh pa je druga med VNMK oktadekadienojska (C18:2n-6C) z 8,88 %, EPK (20:5) 6,73 %, nato DPK (C22:5n-3C) z 2,33 %, α -linolenska (C18:3n-3C) 1,59 %, stearidonska (C18:4n-3) z 1,52 % ter ostale kisline z deležem manjšim od 1 %.



Slika 17: Primerjava deležev pomembnejših VNMK v lipidih sardel in postrvi

Preglednica 14: Primerjava povprečnih deležev MK (% od vseh MK) lipidov sardel in postrvi (LSM ± SEM) in značilnost razlike

MK	Sardela $\bar{x} \pm SO$	Postrv $\bar{x} \pm SO$	Značilnost razlike (P-vrednost)
C12:0	0,07±0,00	0,07±0,00	0,00
C13:0	0,06±0,00	0,01±0,00	0,05***
C14:0	5,03±0,06	3,79±0,06	1,24***
C14:1, trans-9	0,27±0,01	0,14±0,01	0,13***
C14:1, cis-5	0,18±0,00	0,04±0,00	0,14***
C15:0	0,75±0,01	0,32±0,01	0,43***
C16:0	21,04±0,17	14,34±0,17	6,7***
C16:1, trans-7	0,72±0,01	0,29±0,01	0,43***
C16:1, cis-7	4,00±0,13	5,52±0,13	-1,52***
C17:0	1,27±0,02	0,46±0,02	0,81***
C17:1, trans-7	0,21±0,01	0,1±0,01	0,11***
C17:1, cis-7	0,44±0,03	0,76±0,03	-0,32***
C18:0	3,34±0,05	2,87±0,05	0,47***
C18:1, trans-9	0,1±0,00	0,1±0,00	0,00
C18:1, cis-11	0,13±0,03	0,76±0,03	-0,63***
C18:1, cis-9	8,24±0,36	17,99±0,36	-9,75***
C18:1, cis-11	2,23±0,02	2,76±0,02	-0,53***
C18:2, trans-9,trans12	0,05±0,01	0,12±0,01	-0,07***
C18:2, trans-9,cis-12	0,13±0,01	0,08±0,01	0,05***
C18:2, cis-9, cis-12	1,69±0,12	8,88±0,12	-7,19***
C18:3, n-6	0,08±0,01	0,23±0,01	-0,15***
C18:3, n-3	2,16±0,07	1,59±0,07	0,57***
C20:0	0,17±0,01	0,12±0,01	0,05***
C20:1, trans-11	0,2±0,03	0,58±0,03	-0,38***
C20:1, cis-11	1,62±0,18	3,43±0,18	-1,81***
C18:2, cis-9,trans-11	0,16±0,01	0,24±0,01	-0,08***
C18:2, trans-10,cis-12	0,05±0,01	0,01±0,01	0,04***
C18:4, n-3	3,84±0,05	1,52±0,05	2,32***
C20:2, n-9	0,3±0,01	0,44±0,01	-0,14***
C20:3, n-3	0,07±0,01	0,27±0,01	-0,2***
C20:3, n-6	0,72±0,02	0,83±0,02	-0,11***
C20:4, n-6	1,4±0,20	2,9±0,20	-1,5***
C20:5, n-3	8,97±0,28	6,73±0,28	2,24***
C22:0	0,12±0,01	0,03±0,01	0,09***
C22:1, n-9	0,24±0,03	0,41±0,03	-0,17***
C24:1, n-9	1,05±0,02	0,31±0,02	0,74***
C22:3, n-6	0,19±0,01	0,00±0,01	0,19***
C22:4, n-6	0,41±0,02	0,55±0,02	-0,14***
C22:4, n-3	0,52±0,01	0,26±0,01	0,26***
C22:5, n-3	1,02±0,07	2,33±0,07	-1,31***
C23:0	0,91±0,02	1,11±0,02	-0,2***
C22:6, n-3	25,86±0,44	16,71±0,44	9,15***
NMK	32,76±0,22	23,11±0,22	9,65***
ENMK	19,63±0,54	33,2±0,54	-13,57***
VNMK	47,62±0,47	43,69±0,47	3,93***
n-3	38,53±0,52	27,62±0,52	10,91***
n-6	3,16±0,16	10,76±0,16	-7,6***
n-6/n-3	0,08±0,01	0,39±0,01	-0,31***
P/S	1,45±0,02	1,89±0,02	-0,44***
IA	0,69±0,01	0,42±0,01	0,27***

LSM – least square mean – pričakovane srednje vrednosti; SEM – standard error mean – standardna napaka ocene; ***P ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; **P ≤ 0,01 statistično visoko značilna razlika; *P ≤ 0,05 statistično značilna razlika.

V povprečju so maščobe sardel vsebovale od esencialnih MK (EMK), 2,16 % α -linolenske kisline (C18:3n-3) in 1,69 % linolne kisline (C18:2n-6 C) v *cis*- konfiguraciji. Vsebovale so tudi 38,53 % n-3 in 3,16 % n-6 MK, njuno razmerje pa je bilo v povprečju 0,08, razmerje med VNMK in NMK (P/S) pa je bilo v povprečju 1,45. Indeks aterogenosti (IA) je v povprečju znašal 0,69 in je nihal med 0,67 in 0,78.

Maščobe postrvi so od EMK vsebovale 1,59 % α -linolenske kisline in 8,88 % linolne kisline, kar je precejšnja razlika v primerjavi s sardelami. Vsebujejo tudi 27,62 % n-3 MK, kar je manj od maščob sardel, vendar pa vsebujejo zato več n-6 MK (10,76 %), njuno razmerje je posledično temu tudi večje, 0,39 %. Razmerje med VNMK in NMK (P/S) je bilo v povprečju 1,89. Indeks aterogenosti (IA) je pri postrveh znašal 0,42.

Iz navedenih podatkov lahko torej razberemo, da je meso sardel bogatejše z DHK ter EPK, ki sta izredno učinkoviti za zniževanje serumskega VLDL holesterola.

S prehranskega vidika je tako P/S indeks (večji), kot tudi indeks aterogenosti (manjši) ugodnejši pri postrveh.

4.4.4 Primerjava maščobno kislinske sestave postrvi iz različnih ribogojnic

V preglednici 15 je predstavljena primerjava povprečnih deležev MK sestave mesa postrvi, ki so bile gojene v različnih ribogojnicah.

Pri večini MK lahko opazimo statistično zelo visoko značilno razliko, najbolj pa se razlikuje naslednjih 5 MK: oleinska C18:1n-9C (3,70 %), EPK 20:5 (3,00 %), arahidonska C20:4n-3C (2,62 %), DHK C22:6n-3C (2,40 %), eikozaenojska C20:1C (2,35 %). Miristinska (C14:0), miristooleinska (C14:1n-5C), margarinska (C17:0), stearinska (C18:0), eikozadienojska (C20:2) ter trikozanojska kislina (C23:0) so maščobne kisline, ki se v deležih zelo ujemajo pri postrveh iz obeh ribogojnic.

Zanimivo je, da je v povprečju pri postrveh, gojenih v Gameljnih (14 mesecev), največ DHA (17,51 %) sledi ji oleinska kislina (16,76 %), pri postrveh, gojenih v Ilirski Bistrici (18 mesecev), pa ravno obratno (največ oleinske (20,46 %) sledi DHA (15,11 %)). Na podlagi tega smo sklepali, da je vsebnost MK v maščobi gojenih postrvi pogojena eksogeno, s hrano.

Opazimo lahko, da se deleži NMK najboljše ujemajo, saj je razlika med postrvmi le 1,18 %, VNMK odstopajo nekoliko več (4,94 %), najbolj pa se razlikujejo ENMK (6,12 %) in pri zadnjih dveh skupinah sta razliki statistično zelo visoko značilni.

Skoraj identične rezultate lahko zasledimo tudi v IA, razmerju med VNMK in NMK (P/S) ter v razmerju med n-3/n-6 MK, odstotki n-6 MK pa odstopajo za 1,79, n-3 pa kar za 5,40 %, kar smo tudi označili kot statistično zelo visoko značilno razliko.

Preglednica 15: Primerjava povprečnih utežnih deležev MK (% od vseh MK) mesa postrvi, vzgojenih v različnih ribogojnicah (LSM ± SEM) in značilnost razlike

MK	Postrv Gameljne (14 mesecev) $\bar{x} + SO$	Postrv Ilirska Bistrica (18 mesecev) $\bar{x} + SO$	Značilnost razlike (P-vrednost)
C12:0	0.08+0.00	0.04+0.00	0.04***
C13:0	0.01+0.00	0.00+0.00	0.01
C14:0	3.80+0.07	3.75+0.10	0.05
C14:1, trans-9	0.13+0.00	0.16+0.00	-0.03***
C14:1, cis-5	0.05+0.01	0.04+0.01	0.01
C15:0	0.31+0.00	0.35+0.01	-0.04***
C16:0	14.73+0.12	13.56+0.17	1.17***
C16:1, trans-7	0.28+0.00	0.30+0.00	-0.01***
C16:1, cis-7	5.89+0.13	4.77+0.18	1.12***
C17:0	0.45+0.01	0.47+0.01	-0.02
C17:1, trans-7	0.08+0.00	0.14+0.01	-0.06***
C17:1, cis-7	0.85+0.02	0.59+0.03	0.25***
C18:0	2.89+0.07	2.81+0.09	0.08
C18:1, trans-9	0.09+0.01	0.12+0.01	-0.03*
C18:1, cis-11	0.66+0.01	0.98+0.02	-0.32***
C18:1, cis-9	16.76+0.25	20.46+0.35	-3.70***
C18:1, cis-11	2.74+0.02	2.82+0.03	-0.08**
C18:2, trans-	0.16+0.00	0.03+0.00	0.14***
C18:2, trans-9, cis-12	0.09+0.00	0.07+0.01	0.02***
C18:2, cis-9, cis-12	9.26+0.17	8.13+0.25	1.12***
C18:3, n-6	0.28+0.02	0.13+0.02	0.14***
C18:3, n-3	1.30+0.03	2.19+0.04	-0.89***
C20:0	0.10+0.00	0.16+0.00	-0.06***
C20:1, trans-11	0.44+0.01	0.87+0.01	-0.44***
C20:1, cis-11	2.65+0.06	5.00+0.09	-2.35***
C18:2, cis-9, trans-11	0.22+0.00	0.27+0.00	-0.06***
C18:2, trans-10, cis-	0.00+0.00	0.04+0.00	-0.04***
C18:4, n-3	1.62+0.04	1.33+0.06	0.29**
C20:2, n-9	0.44+0.02	0.43+0.02	0.01
C20:3, n-3	0.29+0.01	0.22+0.01	0.07***
C20:3, n-6	0.91+0.01	0.66+0.02	0.25***
C20:4, n-6	2.03+0.08	4.65+0.12	-2.62***
C20:5, n-3	7.73+0.22	4.73+0.31	3.00***
C22:0	0.01+0.01	0.07+0.01	-0.07***
C22:1, n-9	0.30+0.01	0.63+0.02	-0.33***
C24:1, n-9	0.26+0.01	0.40+0.01	-0.15***
C22:3, n-6	0.00+0.00	0.00+0.00	0.00
C22:4, n-6	0.62+0.01	0.42+0.01	0.20***
C22:4, n-3	0.27+0.00	0.22+0.01	0.06***
C22:5, n-3	2.61+0.03	1.77+0.04	0.84***
C23:0	1.12+0.04	1.10+0.05	0.02
C22:6, n-3	17.51+0.64	15.11+0.90	2.40*
NMK	23.50+0.16	22.32+0.23	1.18**
ENMK	31.16+0.34	37.28+0.48	-6.12***
VNMK	45.34+0.44	40.40+0.62	4.94***
n-3	29.42+0.52	24.01+0.73	5.40***
n-6	11.35+0.18	9.57+0.25	1.79***
n-6/n-3	0.39+0.01	0.40+0.02	-0.01
P/S	1.93+0.03	1.81+0.04	0.12*
IA	0.43+0.01	0.41+0.01	0.02

LSM – least square mean – pričakovane srednje vrednosti; SEM – standard error mean – standardna napaka ocene; ***p ≤ 0,001 statistično zelo visoko značilna razlika; **p ≤ 0,01 statistično visoko značilna razlika; * p ≤ 0,05 statistično značilna razlika.

Preglednica 16: Maščobnokislinska sestava določena z internim standardom in z izračunom (mg MK/100 g)

MK	Povprečna MK sestava ribjega mesa – določeno z internim standardom			Povprečna MK sestava ribjega mesa - izračunana		
	Sardela	Postrv Gameljne	Postrv Ilirska Bist.	Sardela	Postrv Gameljne	Postrv Ilirska Bist.
	$\bar{X} \pm SO$ (mg MK/100 g)	$\bar{X} \pm SO$ (mg MK/100 g)	$\bar{X} \pm SO$ (mg MK/100 g)	$\bar{X} \pm SO$ (mg MK/100 g)	$\bar{X} \pm SO$ (mg MK/100 g)	$\bar{X} \pm SO$ (mg MK/100 g)
C12:0	2,87±0,53	2,92±0,96	1,64±0,08	2,66±0,25	3,26±0,20	1,71±0,06
C13:0	2,20±0,36	0,44±0,61	0,00*	2,04±0,15	0,39±0,53	0,00*
C14:0	200±28	138±47	168±4	186±8	154±10	175±9
C14:1, trans-9	10,7±2,1	4,7±1,6	7,35±0,25	9,9±1,1	5,25±0,29	7,68±0,46
C14:1, cis-5	7,0±1,1	1,49±0,30	1,74±0,03	6,51±0,38	1,83±0,70	1,81±0,06
C15:0	29,8±4,2	11,1±3,4	15,75±0,51	27,8±1,2	12,49±0,57	16,5±1,0
C16:0	835±103	529±157	606±11	778±22	597±17	633±30
C16:1, trans-7	28,4±3,4	10,3±3,1	13,43±0,44	26,49±0,93	11,54±0,26	14,04±0,87
C16:1, cis-7	160±26	215±73	215±9	148±8	238±17	224±16
C17:0	50,0±5,3	16,2±4,9	20,86±0,86	46,8±3,2	18,4±1,0	21,8±1,1
C17:1, trans-7	8,2±1,3	3,0±1,0	6,59±0,50	7,66±0,43	3,32±0,28	6,90±0,77
C17:1, cis-7	17,5±2,7	30,8±10,8	26,9±1,4	16,21±0,69	34,2±2,6	28,2±2,5
C18:0	133±16	103±28	124,1±2,6	123±4	117,2±8,9	129±3
C18:1, trans-9	4,10±0,54	3,16±0,99	4,6±1,7	3,83±0,24	3,56±0,16	4,8±1,6
C18:1, cis-11	5,4±2,0	23,3±6,5	43,83±0,80	4,9±1,5	26,6±1,7	45,8±2,5
C18:1, cis-9	327±42	605±188	919±30	305±13	679±34	961±60
C18:1, cis-11	88,8±12,9	98,7±30,6	127±5	82,6±2,5	110,9±2,5	133±10
C18:2, trans-9,trans12	1,81±0,27	5,9±1,6	1,13±0,06	1,69±0,11	6,67±0,22	1,19±0,07
C18:2, trans-9,cis-12	5,3 ±1,9	3,3±1,2	2,88±0,44	4,9±1,4	3,59±0,34	3,01±0,39
C18:2, cis-9, cis-12	66,8±8,0	334±110	366±24	62,3±1,4	375±22	383±35
C18:3, n-6	3,24±0,52	10,3±4,2	6,03±0,15	3,01±0,16	11,2±2,0	6,30±0,37
C18:3, n-3	86,0±13,0	46,6±14,7	98,5±7,0	79,9±2,2	52,5±2,6	103,1±9,9
C20:0	6,69±0,89	3,5±1,2	7,22±0,27	6,24±0,27	3,91±0,27	7,55±0,50
C20:1, trans-11	8,2±2,7	15,6±4,7	39,6±1,4	7,5±1,9	17,7±1,3	41,4±3,1
C20:1, cis-11	65,2±18,5	94,5±27,5	226,5±6,6	59,8±10,5	107,3±6,3	237±15
C18:2, cis-9,trans-11	6,18±0,99	7,8±2,4	12,59±0,62	5,74±0,31	8,80±0,31	13,2±1,2
C18:2, trans-10,cis-12	2,13±0,70	0,00*	1,82±0,10	1,96±0,54	0,00*	1,90±0,13
C18:4, n-3	153±23	59,3±21,1	60,1±2,2	142±5	65,6±6,0	62,8±4,5
C20:2, n-9	11,9±1,5	15,6±3,9	19,5±1,2	11,06±0,17	18,0±2,0	20,4±1,9
C20:3, n-3	2,94±0,45	10,4±3,5	9,86±0,69	2,73±0,11	11,6±1,0	10,31±0,86
C20:3, n-6	28,6±3,7	32,8±9,8	29,9±1,9	26,6±1,2	37,0±1,5	31,3±2,8
C20:4, n-6	57,3±23,5	72,4±20,8	212±11	51,9±17,3	82,3±4,8	221±17
C20:5, n-3	357±54	281±95	215±14	332±11	313±29	225±21
C22:0	4,59±0,93	1,02±0,36	3,57±0,83	4,26±0,58	0,31±0,87	3,74±0,92
C22:1, n-9	9,5±1,9	10,7±2,9	29,1±1,9	8,79±0,65	12,26±0,77	30,5±3,0
C24:1, n-9	41,7±5,4	9,2±2,5	18,4±0,9	38,9±1,8	10,45±0,65	19,3±1,5
C22:3, n-6	7,6±1,3	0,00*	0,00*	7,2±1,2	0,00*	0,00*
C22:4, n-6	16,3±2,3	22,4±7,0	20,0±2,0	15,12±0,42	25,16±0,68	20,9±2,8
C22:4, n-3	20,6±2,1	9,8±2,8	9,8±0,6	19,2±1,3	11,10±0,44	10,27±0,92
C22:5, n-3	40,5±6,3	93,3±26,2	80,8±9,6	37,6±1,1	106±2	85±12
C23:0	36,5±6,5	40,0±12,7	49,9±1,2	33,8±1,8	45,3±4,7	52,2±3,4
C22:6, n-3	1025±124	610±132	687±37	957±38	709±87	694±14
Σ MK	3973,34	3585,57	4507,56	4554,00	4554,15	4689,32

* pod mejo detekcije (< 0,1 mg/100 g vzorca) pri danih pogojih

4.4.5 Primerjava naših rezultatov z literaturnimi

Preglednica 17: Primerjava kemijske sestave mesa sardel in postrvi s podatki iz literature (g/100 g)

vrsta	Voda g/100 g	Beljakovine g/100 g	Maščobe g/100 g	Pepel g/100 g	Holest. mg/100 g
Sardela (Žlender, 2000)	78,0	15,3	5,2	-	-
Sardela (Kulier, 1996)	73,80	18,40	5,18	1,62	-
Sardela (Marin, 2005)	70,79±5,54	20,96±0,98	6,42±6,16	2,50±0,25	-
Postrv-šarenka (Žlender, 2000)	74,0	19,0	6,0	-	60
Soška postrv-gojena (Prošek, 2000)	66,68-72,40	18,82-19,50	4,79-6,02	1,92-2,23	-
Sardela (naši podatki)	72,36	19,69	4,11	2,69	80,92
Postrv (naši podatki)	75,09	18,87	4,69	1,26	57,31

V preglednici 17 smo primerjali kemijsko sestavo mesa sardel in postrvi z literaturnimi podatki in ugotovili, da se podatki ujemajo.

Vsebnosti vode, beljakovin in pepela, ki smo jih določili v ribjem mesu, nekako sovpadajo s podatki, ki smo jih zasledili v literaturi, medtem ko je vsebnost maščob pri sardelah nekoliko manjša od navedenih literaturnih podatkov.

Literaturni podatki o vsebnosti holesterola v sardelah in postrveh so zelo skopi, vendar pa moramo biti do njih dovolj kritični, saj navadno ne navajajo metode, po kateri so prišli do določenih rezultatov. Ravno tako je vprašljiva pravilnost rezultatov analiziranih oksidov holesterola v vzorcih živil, saj lahko le ti nastanejo in razpadejo med samo analizo. Še vedno ostaja odprto vprašanje, katera analizna metoda daje najbolj ustrezne rezultate. Objavljeni rezultati so med seboj težko primerljivi. Celo v primerjalni študiji, ki je zajela 17 različnih laboratorijev in s katero so želeli poenotiti metode določanja, so določili različne vsebnosti oksidov holesterola v istovrstnih živilih (Dutta s sod., 1999).

Preglednica 18: Primerjava povprečnih vrednosti najpomembnejših maščobnih kislin v mesu sardel in postrvi z podatki iz literature (podatki so podani v % od vseh MK)

Maščobna kislina	Vsebnost MK			Naši podatki		
	Postrv (Johansson, 2000)	Sardela (Castrillon, 1997)	Sardela (Marin, 2005)	Postrv	Sardela	
C14:0	miristinska	4,26	6,09	5,94	3,79±0,06	5,03±0,06
C16:0	palmitinska	13,03	19,61	26,24	14,34±0,17	21,04±0,17
C16:1n-7	palmitooleinska	8,54	6,80	4,37	5,52±0,13	4,00±0,13
C18:0	stearinska	1,95	3,98	5,24	2,87±0,05	3,34±0,05
C18:1n-9	oleinska	20,26	10,77	9,59	17,99±0,36	8,24±0,36
C18:2n-6	linolna	4,16	1,33	1,96	8,88±0,12	1,69±0,12
C18:3n-3	α-linolenska	0,88	4,97	2,83	1,59±0,07	2,16±0,07
C20:5n-3	EPA	4,46	12,44	8,12	6,73±0,28	8,97±0,28
C22:5n-3	DPA	1,92	1,63	1,05	2,33±0,07	1,02±0,07
C22:6n-3	DHA	13,67	16,92	22,50	16,71±0,44	25,86±0,44
NMK		19,24	33,89	39,36	23,11±0,22	32,76±0,22
ENMK		53,77	20,83	18,03	33,2±0,54	19,63±0,54
VNMK		26,94	45,28	42,60	43,69±0,47	47,62±0,47
n-3		4,61	-	37,78	27,62±0,52	38,53±0,52
n-6		22,33	-	4,83	10,76±0,16	3,16±0,16
P/S		1,40	1,34	7,57	1,89±0,02	1,45±0,02

- lit. vir ne navaja podatka

Preglednica 18 nam prikazuje primerjavo vsebnosti nekaterih pomembnejših MK s podatki iz literature.

Iz nje lahko razberemo enako zaporedje pomembnejših MK pri postrveh, medtem ko tega ne moremo potrditi pri deležih skupin NMK, ENMK ter VNMK. Naši podatki kažejo, da postrvi vsebujejo največji delež VNMK, sledijo ENMK in NMK, medtem ko v literaturnih podatkih zasledimo, da je vsebnost ENMK skoraj enkrat večja od vsebnosti VNMK. Enako se podatki razlikujejo tudi v odstotkih n-3 in n-6 MK. Johansson s sod. (2000) je določil skoraj 6-krat večjo vsebnost n-6 MK od n-3 MK v postrveh, medtem ko naši rezultati kažejo 2,6-krat večjo vsebnost n-3 MK od n-6 MK.

Pri maščobnokislinski sestavi maščob sardel opazimo razlikovanje podatkov že pri najpomembnejši MK, namreč v maščobah naših sardel smo določili največ DHA, medtem ko v dveh različnih literaturnih virih zasledimo največjo vsebnost nasičene palmitinske MK in DHA. Odstotki preostalih MK so podobni našim, ki manj odstopajo od podatkov, ki jih navaja Marin (2000), vendar pa v razmerju VNMK in NMK oz. P/S opazimo ogromno odstopanje z navedenimi podatki.

Za razliko od postrvi, pri sardelah opazimo, da vsebujejo njihove maščobe veliko več n-3 MK kot n-6 MK. Taka razmerja uvrščajo meso sardel med živila z visoko preventivno vlogo pri mnogih boleznih, še posebej srčno-žilnih.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Testiranje metode za ločbo in kvantitativno analizo vsebnosti holesterola in oksidov holesterola z uporabo metode ekstrakcije s trdno fazo (SPE), ter vse analize smo naredili na zamrznjenih jadranskih sardelah in postrveh (šarenka), ki so bile gojene v različnih ribogojnicah, in različnih starosti (Gameljne, 14 mesecev; Ilirska Bistrica, 18 mesecev). Več avtorjev navaja, da ima zamrzovanje za kratek čas (do enega meseca) majhen vpliv na kemijsko in maščobnokislinsko sestavo (Exler in sod., 1975; Garthwaite, 1997) ter da zamrzovanje ohrani prvotno kakovost ribe (Perović, 2000).

Ker običajno ne zaužijemo cele ribe, temveč samo užitne dele, pri ugotavljanju kakovosti neužitne dele odstranimo in analiziramo samo užitne. Neužitni deli, se lahko izkoristijo za predelavo v krmo za živali ali kot surovina za pridobivanje ribjega olja (Vujković, 1996). Naši rezultati so zato predstavljeni na jedilnem delu mesa rib, to je brez drobovine in glave, v primeru postrvi pa tudi brez kosti.

Tako pripravljene vzorci so bili pripravljene za izvedbo modificirane metode določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola z uporabo metode ekstrakcije s trdno fazo. Iz enako pripravljenih vzorcev smo analizirali tudi vsebnost vode, beljakovin, maščob, pepela ter maščobnih kislin. V maščobah sardel in postrvi smo določili deleže 42-ih maščobnih kislin.

Za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v ribjem mesu smo se sprva nanašali na metodo po Naemi-ju (Naemi in sod., 1995), ki se je izkazala kot neustrezna, ker vključuje vroče umiljanje. Iz literature (Dutta, 1999) je namreč znano, da na vsebnost holesterola in oksidov holesterola vpliva poleg izbrane metode določanja tudi priprava vzorca. Razlike so očitne predvsem pri oksidih holesterola, ki so v vzorcih prisotni v zelo majhnih količinah. Znano je, da je rezultat prisotnosti kisika pri povišani temperaturi oksidacija holesterola. Sam holesterol je sicer stabilen tudi pri visokih temperaturah, ko pa holesterol segrevemo v prisotnosti triacilglicerolov, nastanejo različni produkti razgradnje. Tako rezultati o vsebnosti holesterola in oksidov holesterola ne bi bili pravilni. V nadaljevanju našega dela smo izbrali metodo, ki vključuje hladno umiljanje, metodo po Ubhayasekera-ju (Ubhayasekera in sod., 2004). Metoda poleg hladnega umiljanja opisuje še fazo ekstrakcije holesterola z organskim topilom, ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) ter identifikacijo s HPLC in GC, v primeru določanja oksidov pa je pred GC potrebno izvesti še derivatizacijo do TMS-etrov, derivatov oksidov holesterola.

Tekom izvajanja metode po Ubhayasekera-ju smo naleteli na določene težave, ki smo jih uspeli rešiti. Tako smo priredili fazo ekstrakcije z izborom najbolj ustreznega organskega topila, poleg tega v celoti spremenili SPE postopek (izbor ustrezne kolone in vrste ter količine topil za vezavo in izločanje molekul holesterola na/iz kolone).

Kot najbolj ustrezno organsko topilo smo z vrsto analiz določili dietileter. Pri uporabi le tega smo imeli najmanj težav v analitičnem postopku, najmanjše pa so bile tudi izgube. Poleg tega smo zasledili v literaturi tudi naboljšo topnost holesterola v dietiletru v primerjavi z ostalimi topili, ki smo jih medsebojno primerjali. Poraja pa se nam vprašanje ali bi kakorkoli še lahko izboljšali postopek ekstrakcije in s tem izkoristek modificirane metode. Glede na podatek iz literature, da je topnost holesterola v piridinu skoraj dvakrat

boljša kot v etru (Shepard in sod., 1993), bi bilo vredno poizkusiti tudi s tem topilom; ne vemo pa, če ne bi med postopkom naleteli na moteče komponente, ki bi ovirale ekstrakcijo oz. nadaljnje delo.

Verjetno bi lahko izboljšali tudi postopek ekstrakcije s trdno fazo (SPE), in sicer tako da bi povečali količino izločenega holesterola v zadnji eluat, ki ga analiziramo s HPLC ter GC. V našem primeru smo se sicer zadovoljili s tem, da se je v tretji eluat izločil večji del holesterola (z uvajanjem mobilne faze), čeprav se je majhen delež holesterola izločil v prvi eluat (ob uvajanju heksana). To si razlagamo kot posledica premajhne kapacitete kolone Strata SI-1. Molekul holesterola je bilo veliko več, kot je bilo mest vezave na trdni fazi kolone, zato so se molekule, ki se niso vezale na že zasičeno kolono, izločile s topilom, s katerim smo hoteli izločiti druge oz. moteče komponente. Napako bi verjetno lahko odpravili z večjo kapaciteto kolone. Vendar, ker je to odvisno od proizvajalcev kolone (na kar ne moremo vplivati), bi lahko poizkusili z manjšo odtehto vzorca (1 g namesto 1,5 g). Vprašanje pa je, če ne bi nato naleteli na težavo pri ločbi oksidov holesterola, kajti le ti so prisotni v tako majhnih količinah, da so bili že v naši prvotni odtehti komaj zaznavni.

Z modifikacijo metode po Ubhayasekera-ju smo ločili in kvantitativno ovrednotili vsebnost holesterola ter njegovih oksidov.

Literaturni podatki o vsebnosti holesterola v mesu rib so zelo skopi, naši podatki pa kažejo, da meso sardel vsebuje veliko večji delež holesterola (80,92 mg/100 g), kot meso postrvi (57,31 mg/100 g).

V literaturi le redko zasledimo podatke o kemijski sestavi tako jadranskih sardel kot tudi postrvi šarenk, več podatkov zasledimo za ribje izdelke.

Sardele so imele v naših analizah v povprečju 19,69 % beljakovin, 4,11 % maščob, 72,36 % vode, 2,69 % pepela ter 80,92 mg/100 g holesterola, postrvi pa 18,87 % beljakovin, 4,69 % maščob, 75,09 % vode, 1,26 % pepela in 57,31 mg/100 g holesterola.

Rezultati za vsebnost beljakovin v sardelah (19,69 %) so podobni kot jih navaja literatura. Dobro ujemanje smo ugotovili tudi za vsebnost beljakovin v postrveh (19,0 %). Na osnovi teh podatkov lahko meso obeh vrst rib uvrstimo med beljakovinsko najkvalitetnejše vrste mesa, gledano s prehranskega stališča. Podobne vsebnosti za beljakovine (21 %) ima tudi goveje, prašičje in kunčje meso (Žlender, 1997), vendar je ribje meso s prehranskega vidika bolj zaželeno zaradi lahke prebavljivosti.

Na podlagi rezultatov za vsebnost maščobe (sardele 4,11 %; postrvi 4,69 %) lahko sardele in postrvi glede na delitve v literaturi (Exler in sod., 1975; Weihrauch, 1977) opredelimo kot nemastne ribe (>5 oz. 8 % maščobe), za razliko od literaturnih virov, v katerih lahko zasledimo, da tako postrvi kot tudi sardele spadajo v razred mastnih rib, saj postrvi vsebujejo okoli 6,0 % (Žlender, 2000), sardela pa okoli 6,42 % maščob (Marin, 2005). Razliko si lahko razlagamo z dejstvom, da je vsebnost maščob v sardelah, postrveh kot tudi v drugih divjih živalih, odvisna od dostopnosti hrane in spolne zrelosti ter stanja reprodukcijskega ciklusa oz. sezone ulova.

Naši rezultati analiz pepela v sardelah kažejo večje vsebnosti, kot so za večino morskih rib navedeni v literaturi (Plestenjak in Repič, 1988). Novejši podatki (Marin, 2005) pa za sardele navajajo vsebnosti pepela podobne našim (2,50 %-2,75 %). V obeh primerih so bile analizirane sardele brez glave in drobovine, vsebovale pa so kosti. Ker se kosti med termično obdelavo zmečajo (Pravilnik o kakovosti rib, ribiških proizvodov in izdelkov, ki

so v prometu, 2002), so pri sardelah užitne in so dodatni vir fosforja, kalcija ter drugih mineralnih snovi. V primeru postrvi pa je ravno obratno. V literaturi zasledimo vsebnost pepela od 1,92 % – 2,23 %, medtem ko naši podatki kažejo precej nižjo vrednost, 1,26 %. Naša ugotovitev je, da vsebujejo sardele veliko anorganskih snovi. Te razlike so dobrodošle s prehranskega stališča, saj meso klavnih živali in postrvi ter drugih vrst rib vsebujejo le okoli 1 % pepela (Bogut in sod., 1996, Perović, 2000).

Rezultati o vsebnosti vode v mesu sardel niso bistveno odstopali od splošne sestave ribjega mesa, v literaturi pa navajajo mnogi avtorji, da je količina vode in maščobe, tako pri ribjem kot tudi pri drugih vrstah mesa, v obratnem sorazmerju. Če gledamo vsebnost maščob po sezonah ulova, so pozimi in spomladi sardele puste ribe in poleti ter jeseni mastne. Zaradi variabilnosti deleža skupnih maščob je pomembno, da ob navedbi rezultata, navedemo tudi sezono (Marin, 2005).

Študij maščobnokislinske sestave rib je pomemben in razširjen zaradi poznanih vplivov na zdravje potrošnikov (Love, 1997), zato kakovost maščob ocenjujemo na podlagi maščobnokislinske sestave. Največkrat govorimo o relativnih deležih MK, ki pa so za prehransko svetovanje premalo. Potrebujemo podatek o vsebnosti MK v g ali mg/100 g mesa ali vsaj podatek o skupni količini maščob v živilu. S prehranskega stališča so pomembna tudi razmerja med skupinami MK (n-6/n-3, P/S, IA).

Vrednosti posameznih MK smo izrazili v mg MK/100 g mesa, in sicer na dva načina. Pri prvem načinu smo mg posameznih MK/100 g mesa izračunali z množenjem deležev posameznih MK in faktorja za pretvorbo, 0,90 (Fatty acids, 1998), pri drugem načinu pa smo mg MK/100 g določili s pomočjo dodanega internega standarda (nonadekanojska kislina, C19:0). Izbira, katero metodo uporabiti, je predvsem pogojena z ekonomskim vidikom. Časovno je krajša metoda z uporabo internega standarda, ki zahteva natančno delo v vseh fazah priprave vzorcev in same določitve. Metoda s preračunom pa zahteva dve analizi: vsebnost skupnih maščob (po Weibull in Stoldt-u), nato pa še določitev posameznih MK (Polak, 1999).

Večina virov predstavlja maščobnokislinsko sestavo ribjih maščob z utežnimi odstotki posameznih MK v maščobi. Ker taki podatki zelo malo povedo o resnični prehranski vrednosti ribjih maščob oz. mesa, je potrebno deleže posameznih MK izraziti v g ali mg na 100 g mesa. Tako predstavljene podatke tudi najpogosteje zasledimo v prehranskih tabelah.

Maščobnokislinsko sliko maščob rib smo predstavili po skupinah MK in po posameznih MK.

Vsebnost NMK je znatno večja v mesu sardel (32,76 %) kot v postrveh (23,11 %) za razliko od ENMK, katerih delež je 33,2 v primeru postrvi in 19,63 % v primeru sardel.

V povprečju so maščobe sardel vsebovale od esencialnih MK (EMK) 2,16 % α -linolenske kisline (C18:3n-3) in 1,69 % linolne kisline (C18:2n-6 C). Vsebovale so tudi 38,53 % n-3 in 3,16 % n-6 MK, njuno razmerje pa je bilo v povprečju 0,08, razmerje med VNMK in NMK (P/S) pa je bilo v povprečju 1,45.

Indeks aterogenosti (IA) upošteva specifične vplive posameznih MK na koncentracijo holesterola v krvi in bolj realno oceni kakovost maščob z vidika zdravja (Salobir, 1997). Le ta je v povprečju znašal 0,69 in je nihajal med 0,67 in 0,78. To dejstvo nas je nekoliko presenetilo, saj IA večji od 0,5 s prehranskega stališča ni zaželen. Meso mlade pitane govedu in bedra ter prsi piščancev imajo IA med 0,5 in 0,43 (Polak, 1999; Verbič, 2001),

kar je znatno nižje od IA v lipidih mesa sardel. Ker IA upošteva MK, ki povečujejo holesterol v krvi (predvsem lavrinska (C12:0), miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0) in trans- MK) in ker so sardele vsebovale veliko palmitinske (C16:0) in miristinske kisline (C14:0, vpliv slednje pa je največji, saj se pomnoži s faktorjem 4 (Salobir, 1997)), je IA pri sardelah s prehranskega stališča neugoden.

Maščobe postrvi so od NMK vsebovale 1,59 % α -linolenske in 8,88 % linolne kisline, kar je precejšnja razlika v primerjavi s sardelami. Vsebujejo tudi 27,62 % n-3 MK, kar je manj od maščob sardel, vendar pa vsebujejo zato več n-6 MK (10,76 %), njuno razmerje je posledično temu tudi večje (0,39 %). Razmerje med VNMK in NMK (P/S) je bilo v povprečju 1,89, literaturni viri pa navajajo, da je razmerje P/S optimalno, če je večje od 0,5 (Salobir, 1997). V primerjavi z drugimi vrstami mesa, z govedino in piščančjimi prsmi in bedri, ki kažejo nizke vrednosti indeksa 0,17 in 0,53-0,56 (Polak, 1999; Verbič, 2001), so tako postrvi kot tudi sardele optimalne za zmanjšanje tveganja za srčno-žilna obolenja. Indeks aterogenosti (IA) je pri postrveh znašal 0,42, kar je s prehranskega stališča boljše kot pri sardelah, zaradi nižjih vrednosti palmitinske, predvsem pa miristinske kisline v lipidih mesa postrvi.

5.2 SKLEPI

Na podlagi uporabe modificirane metode za ločbo in kvantitativno določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola z metodo ekstrakcije s trdno fazo (SPE), analize osnovne kemijske sestave in maščobnokislinske sestave svežih morskih (jadranska sardela) in sladkovodnih rib (postrv Šarenka-gojena) lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Modifikacija metode določevanja holesterola in oksidov holesterola z metodo ekstrakcije s trdno fazo (SPE) je ustrezna z uporabo topila dietileter, ki ekstrahira holesterol iz neumiljive faze, po predhodnem hladnem umiljanju, ter kolone Strata SI-1, ki nam loči molekule holesterola in oksidov holesterola od ostalih motečih komponent.
- Izkoristek modificirane metode SPE je znašal 71,54 %.
- Meso sardel je v povprečju vsebovalo 4,11 % maščob, 19,69 % beljakovin, 72,36 % vode, 2,69 % pepela, 80,92 mg/100 g holesterola ter 2,30 mg/100 g 7 β -hidroksiholesterola, 1,33 mg/100 g 20 α -hidroksiholesterola.
- Meso postrvi je v povprečju vsebovalo 4,69 % maščob, 18,87 % beljakovin, 75,00 % vode, 1,26 % pepela, 57,31 mg/100 g holesterola ter 0,03 mg/100 g 7 β -hidroksiholesterola, 0,76 mg/100 g 20 α -hidroksiholesterola.
- Maščoba sardel je v povprečju vsebovala 47,62 % VNMK, 32,76 % NMK in 19,63 % ENMK. V povprečju je bilo največ DHA (C22:6n-3, 25,86 %) sledijo palmitinska kislina (C16:0, 21,04 %), EPA (C20:5n-3, 8,97 %) in oleinska (C18:1n-9, 8,24 %).
- Maščoba postrvi je v povprečju vsebovala 43,69 % VNMK, 33,20 % ENMK, 23,11 % NMK. V povprečju je bilo največ oleinske kisline (C18:1n-9, 17,99 %), sledijo DHA (C22:6n-3, 16,71 %), palmitinska kislina (C16:0, 14,34 %), oktadekadienojska (C18:2n-6, 8,88 %) ter EPA (C20:5n-3, 6,73 %).
- Različna načina gojenja in starost postrvi sta statistično značilno vplivala na vsebnost vode, pepela in maščobnokislinsko sestavo lipidov. V postrveh starih 14 mesecev (Gameljne) je največ DHA (17,51 %) sledi oleinska kislina (16,76 %), pri postrveh starih 18 mesecev (Ilirska Bistrica) je največ oleinske (20,46 %) sledi DHA (15,11 %).
- Razmerje n-6/n-3 je bilo v mesu sardel povprečno okoli 0,08, v mesu postrvi 0,39. Razmerje P/S v lipidih sardel je bilo okoli 1,45 v postrveh pa 1,89, kar uvršča meso sardel in postrvi med živila z visoko preventivno vlogo pri mnogih boleznih, še posebej srčno-žilnih.
- Indeks aterogenosti je znašal pri sardelah 0,69, pri postrveh 0,42 ter tako uvrstil meso postrvi med tiste vrste mesa, ki so z varovalnega stališča pri hiperholesterolemiji zaželeni za razliko od mesa sardel.

6 POVZETEK

Prehranski strokovnjaki ugotavljajo, da na aterogeni učinek lipidov bolj kot holesterol, vplivajo oksidi holesterola ter povečan delež nekaterih nasičenih maščobnih kislin, hkrati pa imajo varovalni antiaterogeni in tudi antikancerogeni učinek dolgoverizne n-3 maščobne kisline, npr. DHA. Vloga maščob v prehrani je različna. Maščobe so nosilci rezervne energije, vsebujejo esencialne in večkrat nenasičene MK. Najbolj pomembne MK ribjega mesa so VNMK, še posebej EPA in DHA, ki se v manjših količinah pojavijo tudi v drugi hrani.

Namen naše naloge je bil modificirati metodo določevanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola z metodo ekstrakcije na trdni fazi, ovrednotiti vsebnost holesterola in oksidov holesterola ter določiti osnovno kemijsko in maščobnokislinsko sestavo mesa rib.

V poizkus sta bili vključeni dve vrsti rib, morske (jadranska sardela) in sladkovodne (gojena postrv) iz dveh različnih ribogojnic in različnih starosti (Gameljne, 14 mesecev; Ilirska Bistrica, 18 mesecev).

Sprva smo testirali metodo določanja holesterola po Naeemi-ju (Naeemi in sod., 1995). Metoda vključuje vroče umiljanje, kar je bil glavni razlog za opustitev te metode, saj je bil naš namen določiti tudi vsebnost oksidov holesterola; znano pa je, da ti lahko nastanejo med izpostavljenostjo toploti, svetlobi, zraku. Zato smo kot osnovo naši metodi vzeli metodo po Ubhayasekera-ju (Ubhayasekera in sod., 2004). Metoda sestavlja faza hladnega umiljanja, ekstrakcije holesterola iz neumiljive faze z metilenkloridom, SPE postopek ter identifikacija oz. določanje vsebnosti holesterola z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Metodo smo prilagodili našemu vzorcu s spremembo faze ekstrakcije, in sicer z zamenjavo topila. Ugotovili smo, da je dietileter najprimernejše topilo. Za postopek ekstrakcije s trdno fazo (SPE) pa smo ugotovili, da je primerna uporaba kolone Strata Si-1.

Okside holesterola smo določali le okvirno, saj le ti lahko nastanejo ali razpadejo med samo analizo, težavo pri določanju pa predstavlja tudi njihova izredno majhna vsebnost v vzorcih. Analizirali smo jih po naši modificirani metodi določanja holesterola, le da smo po fazi ekstrakcije na trdni fazi (SPE), eluat prepihali z dušikom in izvedli fazo derivatizacije ter tako okside holesterola identificirali z GC. Določili smo tri okside holesterola: 7 β -hidroksiholesterol, 20 α -hidroksiholesterol, 25 α -hidroksiholesterol. Primerjava s podatki iz literature je skoraj nemogoča, saj so rezultati med seboj težko primerljivi in pravilnost analiziranih oksidov holesterola vprašljiva.

Vsebnosti beljakovin, vode, pepela so bile analizirane po AOAC standardnih metodah, vsebnost maščobe je bila določena z metodo Weibull in Stoldt. Maščobnokislinska analiza je bila izvedena po Parku in Goinsu (1994). Identificirali smo 42 MK (10 NMK, 14 ENMK, 18 VNMK) z *in situ transesterifikacijo* in s pomočjo plinsko-tekočinske kromatografije. Vsebnost vsake MK je bila določena s pomočjo internega standarda (nonadekanojska MK, C19:0). Vsi rezultati so bili obdelani s statističnim paketom SAS.

Ker največkrat ne zaužijemo cele ribe, temveč samo njene užitne dele, moramo poznati skupno kakovost ravno teh, jedilnih delov ribe. V obeh primerih je pomembno, da poznamo MK sestavo in količino maščob, holesterola ter drugih sestavin mesa, zato so naši rezultati predstavljeni na jedilnem delu rib, to je brez drobovine in glave.

Meso postrvi v povprečju vsebuje 4,69 % maščob in 57,31 mg/100 g holesterola, meso sardel pa 4,11 % maščob in 80,92 mg/100 g holesterola.

Tako maščoba sardel kot maščoba postrvi vsebujeta največ VNMK, tem pa v primeru sardel sledijo NMK in ENMK, pri postrveh pa ravno obratno. Meso sardel je bogatejše z DHK ter EPK, ki sta dolgoveržni večkrat nenasičeni MK in ju vsebujejo mastne ribe. Sta izredno učinkoviti za zniževanje serumskega VLDL holesterola. Meso postrvi vsebuje velik delež n-6 esencialne MK, to je oleinska kislina.

Indeks aterogenosti (IA), je znašal pri sardelah 0,69, pri postrveh 0,42 ter tako uvrstil meso postrvi med tiste vrste mesa, ki so z varovalnega stališča pri hiperholesterolemiji zaželjena za razliko od mesa sardel.

Razmerje n-6/n-3 je bilo pri mesu sardel v povprečju okoli 0,08, pri mesu postrvi 0,39, razmerje P/S pa se je pri sardelah v povprečju gibalo okoli 1,45 pri postrveh pa 1,89. Take vrednosti razmerij uvrščajo meso sardel in postrvi med živila z visoko preventivno vlogo pri mnogih boleznih, še posebej srčno-žilnih.

Uspeli smo določiti vse predvidene parametre in tudi določiti modificirano metodo določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola, ki pa bi jo bilo po našem mnenju potrebno še izboljšati, saj je v postopku prihajalo do nekoliko večjih izgub, ki bi jih bilo za bolj pravilne rezultate potrebno odpraviti.

7 VIRI

- Ackman R. G. 1992. Fatty acids in fish and shellfish. V: Fatty acids in foods and their health implications. Chow C. K. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 153-174
- AOAC Official Method 920.153. Ash of meat. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. 5th rev. Vol. 2. Cunnif P. (ed.). Gaithersburg, AOAC International, chapt. 39: 4-4
- AOAC Official Method 994.10. Cholesterol in foods. Direct saponification-gas chromatographic method. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. 5th rev. Vol. 2. Cunnif P. (ed.). Gaithersburg, AOAC International, chapt. 45: 73-75
- AOAC Official Method 950.49. Moisture in meat. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. 5th rev. Vol. 2. Cunnif P. (ed.). Gaithersburg, AOAC International, chapt. 39:1-2
- AOAC Official Method 991.36. Fat (Crude) in meat and meat product. Solvent extraction (submersion) method. 1999. V: Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. 5th rev. Vol. 2. Cunnif P. (ed.). Gaithersburg, AOAC International, chapt. 39: 3-4
- AOAC Official Method 996.06. Fat (Total, saturated and monosaturated) in foods. 1999. V: AOAC Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. 5th rev. Vol. 2 Cunnif P. (ed.). Gaithersburg, AOAC International, chapt. 41: 18-18D
- Arneth W., Al-Ahamad H. 1995. Cholesterol Its determination in muscle and adipose tissue and in offal using HPLC. *Fleischwirtschaft*, 75, 8:1001 – 1003
- Arnold D. R., Kwiterovich P. O. 2003. Cholesterol. Absorption, function, and metabolism. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. Vol 2. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds). London, Academic Press: 1226 - 1237
- Baggio S. R., Miguel A. M. R., Bragagnolo N. 2005. Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products. *Food Chemistry*, 89, 475 - 484
- Bandarra N. M., Batista I., Nunes M. L., Empis J. M., Christie W. W. 1997. Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Science*, 62, 1: 40 – 42
- Bao-Shyung H., Jih-Terng W., Youk-Meng C. 2003. A simplified method for the quantification of total cholesterol in lipids using gas chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16: 169-178
- Bogut I., Opačak A., Stević I., Bogut S. 1996. Nutritivna i protektivna vrijednost riba s osvrtnom na omega-3 masne kiseline. *Ribarstvo*, 54, 1: 21 – 37
- Boselli E., Valazco V., Caboni M. F., Ledcker G. 2001. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917: 239 – 244
- Castrillón A. M., Navarro P., Álvarez-Pontes E. 1997. Changes in chemical composition and nutritional quality of fried sardine (*Clupea pilchardus*) produced by frozen storage and microwave reheating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 1: 125-132
- Chandan R. 1997. Dairy-based ingredients. St. Paul, Eagan Press Handbook: 137-137

- de Lorgeril M., Salen P., Laporte F., de Leiris J. 2001. Alpha-linolenic acid in the prevention and treatment of coronary heart disease. *European Heart Journal, Supplements*, 3 (Supplement D): D26 – D32
- Debelič O. 1998. Ta dobra zdrava hrana. Ljubljana, Narodna in univerzitetna knjižnica: 102 - 104
- Dutta P. C., Caboni M. F., Diczfalusy U., Dionisi F., Dzeletovic S., Grandgirard A., Guardiola F., Kumpulainen J., Lebovics V. K., Pihlava J-M., Rodriguez-Estrada M. T., Ulberth F. 1999. Measurements of cholesterol oxides in foods: Results of an interlaboratory comparison study. V: *Natural antioksidants and anticarcinogenes in nutrition, health and disease*. Kumpulainen J. T., Salonen J. T. (eds.). Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 309 – 315
- Exler J., Kinsella J. E., Watt B. K. 1975. Lipids and fatty acids of important finfish: New data for nutrient tables. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52: 154 – 159
- Fatty acids: seventh supplement to the fifth edition of McCance and Widdowson's. The composition of foods. 1998. London, Royal Society of Chemistry: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: 209 str.
- FIGIS. Species fact sheet. Fisheries global information system. 2004. Rome, FAO, <http://www.fao.org/figis/servlet/FiRefServlet?ds=species&fid=2910> (16.04.2004): 3 str.
- Field C.J. 2003. Fatty acids. Dietary importance. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. Vol. 4. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds). London, Academic Press: 2317 – 2324
- Fischer s sod. K. H., Laskawy G., Grosch W. 1985. Quantitative Analyse von Autooxidationsprodukten des Cholesterols in tierischen Lebensmitteln. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forchung*, 181: 14 – 19
- FSA. Advice on fish consumption: benefits & risks. 2004. London, Food Standards Agency and Department of Health. www.sacn.gov.uk (15.09.2004): 45 str.
- Garcia J. A. R., Maraschiello C. 1996. Procedure for the determination of eight cholesterol oxides in poultry meat using on-column and solvent venting capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 764: 279 – 293
- Garthwaite G.A. 1997. Chilling and freezing of fish. V: *Fish processing technology*. 2nd ed. Hall G.M. (ed.). London, Blackie Academic & Professional: 93-118
- Gašperlin, L., Rajar A., Satler M. 1995. Navodilo za fizikalno-kemijske vaje iz tehnologije mesa. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1- 4
- Golob T., Plestenjak A. 2000. Analiza kakovosti živil. 2. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 96-98
- Grundy S. M. 2003 Cholesterol. Factors determining blood cholesterol levels. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. Vol 2. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). London, Academic Press: 1237 – 1241
- Hegarty V. 1995. Nutrition, food and environment. St. Paul, Eagan Press: 453 str.
- Johansson L., Kiessling A., Kiessling K.-H., Berglund L. 2000. Effects of alerted ration levels on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Food Quality and Preference*, 11: 247-254
- Kulier I. 1996. Standardne euro tablice kemijskog sastava namirnica. Zagreb, Hrvatski farmer: 115 – 336

- Kupnik D. 2001. Nenasičene maščobne kisline, fetalni razvoj in ateroskleroza. *Medicinski razgledi*, 40, 3: 307 – 312
- Lecker G., Rodriguez-Estrada M.T. 2001. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 4: 625 - 631
- Lobb K. 1992. Fatty acid clasification and nomenclature. V: *Fatty acids in food and their implication*. Chiang Kuang Chow (ed.). New York, Marcel Dekker: 1 - 16
- Love R.M. 1997. Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish. V: *Fish processing technology*. 2nd ed. Hall G.M (ed.). London, Blackie Academic & Professional: 1 - 31
- Luzia L. A., Sampaio G. R., Castellucci C. M. N., Torres E. A. F. S. 2003. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, 83, 1: 93 – 97
- Marin. K. 2000. Kemijska sestava govejega mesa slovenskega porekla. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21, 32
- Marin M. 2005. Vpliv ulova sezone ulova na lipidno sestavo in senzorično kakovost jadranske sardele (*Sardina pilchardus*). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 46, 52, 59
- Naemi E. D., Ahmand N., Al-Sharrah T. K., Behbahani M. 1995. Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. *Journal of AOAC International*, 78, 6: 1522 – 1525
- Nelson D. L. Cox M. M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York, W. H. Freeman: 1119 str.
- Perović S. 2000. Prehrana ribom u zdravlju i bolesti. Zadar, Matica hrvatska, Podružnica Kali: 144 str.
- Petrinja M. 1988. Pridobivanje in poraba morske ribe v svetu in pri nas. V: *Seminar: Morje kot vir hrane*. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za higieno: 17-31
- Piironen V., Toivo J. and A., Lampi M. 2002. New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs amd their products consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 705 - 713
- Plestenjak A., Repič J. 1988. Prehrambena vrednost morskih rib. V: *Seminar: Morje kot vir hrane*. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za higieno: 67-73
- Pokorn, D. 1996. Slovenska miza prihodnosti: alternativna prehrana za zdravo in dolgo življenje. 1. natis. Ljubljana, Narodna in univerzitetna knjižnica: 21-21
- Pokorn D. 2000. Zdravstveni vidiki uživanja maščob in holesterola. V: *Meso in mesnine za kakovostno prehrano*, Portorož, 10. in 11. februar 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 31 – 37
- Polak T. 1999. Vpliv reje na maščobnokislinsko sestavo mesa pitovnih piščancev. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Polak T. 2000. Specifična problematika zmanjšanja maščob in holesterola v predelavi mesa klavnih živali, perutnine in rib. V: *Meso in mesnine za kakovostno prehrano*. 2. posvet o vlogi in pomenu mesa v normalni-zdravi in dietni prehrani. Žlender B., Gašperlin L. (ur). Portorož, 10. in 11. februar 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 79 - 88
- Popsil E. 2000. Holesterol: zdravniški nasveti, odlični recepti in veliko koristnih napotkov za uspešno zniževanje holesterola v krvi. Ptuj, Založba za medicinski program: 6 – 23

- Povž M., Sket B. 1990. Naše sladkovodne ribe. Ljubljana, Mladinska knjiga: 84 - 93
- Pravilnik o kakovosti rib, ribiških proizvodov in izdelkov, ki so v prometu. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 94: 7-39
- Prošek M. 2000. Vpliv okolja in letnega časa na kakovost mesa soške postrvi (*Salmo Marmoratus*). Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 58-58
- Razzazi-Fazeli E., Kleineisen S., Luf W. 2000. Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography, A* 896: 321-334
- Salobir K. 1997. Prehransko fiziološki pomen mesa v ravnotežni prehrani. V: Meso v prehrani in zdravje. Posvet posvečen 50. obletnici Biotehniške fakultete. Radenci, 20. in 21. novembra 1997. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 161-170
- Salobir K. 2001. Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Portorož, 8. in 9. november 2001. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121-135
- Sampaio R. G., Bastos H. M. D., Soares R. A. M., Queiroz Y. S., Torres E. A.F.S. 2006. Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry*, 95, 344 - 351
- Sarantinos J., O'Dea K., Sinclair A. J. 1993. Cholesterol oxides in Australian foods. Identification and quantification. *Food Australia*, 45, 10: 485 - 490
- SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software
- Scafer E. J. 2002. Lipoproteins, nutrition and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 2: 191 - 212
- Seppänen-Laakso. T., Laakso I., Hiltunen R. 2002. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465: 39 - 62
- Sheppard A. J., Pennington J. A. T., O'Dell R. G. 1993. Cholesterol. Properties and determination. V: *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 2. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds). London, Academic Press: 925 - 930
- Sieber R. 1993. Cholesterol removal from animal food-can it be justified? *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 26: 375 - 387
- Simopoulos A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 365-379
- Skalli A., Robin J. H. 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture*, 240, 1-4: 399-415
- Souci S. W., Fachmann W., Kraut H. 2000. Food composition and nutrition tables. 6th ed. Scherz H., Sensler F. (eds.). London, CRC Press: 434-434
- Tai C. Y., Chen Y. C., Chen B. H. 1999. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in food: an overview (part I). *Journal of Food and Drug Analysis*, 7,4: 243-257

- Tapiero H., Nguyen Ba G., Couvreur P., Tew K. D. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 215-222
- Toschi T. G., Caboni M. F. 1992. Cholesterol oxides: biological behaviour and analytical determination. *Italian Journal of Food Science*, 4: 223-228
- Treer T., Opačak A. 1993. Važnost linolenske masne kiseline (18:3w3) u prehrani riba. *Ribarstvo*, 48, 2: 61-66
- Treer T., Safner R., Aničić I., Lovrinov M. 1995. *Ribarstvo*. Zagreb, Nakladni zavod Globus: 464 str.
- Tsai L. S., Hudson C. A. 1985. Cholesterol oxides in commercial dry egg products: Quantitation. *Journal of Food Science*, 50: 229-237
- Ubhayasekera S. J. K. A., Verleyen T., Dutta P. C. 2004. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry*, 84: 149 – 157
- USDA National nutrient database for standard reference. 2004. Washington, Agricultural Research Service: Nutrient data laboratory. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/> (20.04.2004): 10 str.
- Verbič D. 2001. Maščobnokislinska sestava mlade govedine dveh pasem. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.
- Vicente S. J. V., Torres E. A. F. S. 2006. Formation of four cholesterol oxidation products and loss of free lipids, cholesterol and waterb in beef hamburgers as a function of thermal processing. *Food Control*, online 2005, v tisku
- Vujković G. 1996. Proučavanje sastava masnih kiselina lipida slatkovodnih riba. *Doktorska disertacija*. Novi Sad, Tehnološki fakultet: 117 -119
- Weihrauch J. L., Posati L. P., Anderson B. A., Exler J. 1977. Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54, 1: 36-40
- WHO. *Fats and oils in human nutrition: Report of joint expert consultation*. 1994. Rome, WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 147 str.
- Žlender B. 1997. Sestava in prehranska vrednost mesa in mesnih izdelkov. V: *Meso v prehrani in zdravje*. Posvet posvečen 50. obletnici Biotehniške fakultete. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Radenci, 20. in 21. novembra 1997. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95-105
- Žlender B., 2000. Morske in sladkovodne ribe. Sestava in kakovost mesa rib. *Meso in mesnine*, 1, 1: 42 – 43

ZAHVALA

Ob tej priložnosti se zahvaljujem mentorju prof. dr. Božidarju Žlendru, ki mi je bil v veliko pomoč pri izdelavi mojega dela.

Predsednici komisije za oceno in zagovor, prof. dr. Tereziji Golob, hvala za strokovno pomoč in predloge pri pregledu diplomskega dela.

Posebej se zahvaljujem dr. Tomažu Polaku, za strokovno pomoč ter vzpodbudne in prijazne besede, ki sem jih bila deležna med nastajanjem te diplomske naloge.

Hvala ekipi Katedre za tehnologijo mesa: doc. dr. Lei Gašperlin, Mojci Malenšek in Dejanu Došlerju za prijazen sprejem na Katedri in vsako pomoč pri eksperimentalnih in statističnih preprekah.

Moji družini, hvala za razumevanje ter stalno podporo ob izdelavi tega dela.

Vsem, ki jih nisem omenila in so mi pomagali, se toplo zahvaljujem!

HVALA!

PRILOGE

Priloga A: Faktor odzivnosti detektorja (Rf) za posamezno MK

MAŠČOBNA KISLINA	KEMIJSKO IME	SLOVENSKO TRIVIALNO IME	(FA _i)
C12:0	DODEKANOJSKA K.	LAVRINSKA K.	0,934579
C13:0	TRIDEKANOJSKA K.		0,938596
C14:0	TETRADEKANOJSKA K.	MIRISTINSKA K.	0,942149
C14:1, n-5	9-TETRADECENOJSKA K.	MIRISTOOLEINSKA K.	0,941667
C15:0	PENTADEKANOJSKA K.	PENTADEKANOJSKA K.	0,945313
C16:0	HEKSADEKANOJSKA K.	PALMITINSKA K.	0,948148
C16:1, -7	9-HEKSADECENOJSKA K.	PALMITOOLEINSKA K.	0,947761
C17:0	HEPTADEKANOJSKA K.	MARGARINSKA K.	0,950704
C17:1, n-7	10-HEPTADECENOJSKA K.		0,950355
C18:0	OKTADEKANOJSKA K.	STEARINSKA K.	0,95302
C18:1, n-9	9-OKTADECENOJSKA K.	OLEINSKA K.	0,952703
C18:2, n-6	9,12-OKTADEKADIENOJSKA K.	LINOLNA K.	0,952381
C18:3, n-6	6,9,12-OKTADEKATRIENOJSKA K.	γ-LINOLENSKA K.	0,952055
C18:3, n-3	6,9,15-OKTADEKATRIENOJSKA K.	α-LINOLENSKA K.	0,952055
C18:4, n-3	6,9,12,15-OKTADEKATETRAENOJSKA K.	STERAIDONSKA K.	0,951724
C20:0	EIKOZANOJSKA K.	ARAHIDINSKA K.	0,957055
C20:1, n-9	11-EIKOZAENOJSKA K.	GADOLEINSKA K.	0,95679
C20:2, n-6	11,14-EIKOZADIENOJSKA K.		0,956522
C20:3, n-9	5,8,11-EIKOZATRIENOJSKA K.		0,95625
C20:4, n-6	5,8,11,14-EIKOZATETRAENOJSKA K.	ARAHIDONSKA K.	0,955975
C20:5, n-3	5,8,11,14,17-EIKOZAPENTAENOJSKA K.	EPK	0,955696
C22:0	DOKOZANOJSKA K.	BEHENSKA K.	0,960452
C22:1, n-9	13-DOKOZAENOJSKA K.	ERUKA K.	0,960227
C22:3, n-6	10,13,16-DOKOZATRIENOJSKA K.	DOKOZATRIENOJSKA K.	0,95977
C22:4, n-6	7,10,13,16-DOKOZATETRAENOJSKA K.	DOKOZATETRAENOJSKA K.	0,959538
C22:5, n-6	4,7,10,13,16-DOKOZAPENTAENOJSKA K.	DPK	0,959302
C22:6, n-3	4,7,10,13,16,19-DOKOZAHEKSAENOJSKA K.	DHK	0,959064
C23:0	TRIKOZANOJSKA K.		0,961957
C24:1, n-9	15-TETRAKOZAENOJSKA K.	NEVRONSKA K.	0,963158

Priloga B: Podatki, ki pojasnjujejo morebiten vpliv prehrane na MK sestavo (% od vseh MK)

MAŠČOBNA KISLINA	Briketi za ribe Ilirs. Bistr. \bar{x}	Gameljne (14 mes) $\bar{x} \pm SO$	Ilirska Bistrica(18 mes) $\bar{x} \pm SO$
C12:0	0,06	0,08±0,00	0,04±0,00
C13:0	0,03	0,01±0,00	0,00±0,00
C14:0	4,39	3,80±0,07	3,75±0,10
C14:1, trans-9	0,19	0,13±0,00	0,16±0,00
C14:1, cis-5	0,07	0,05±0,01	0,04±0,01
C15:0	0,36	0,31±0,00	0,35±0,01
C16:0	12,57	14,73±0,12	13,56±0,17
C16:1, trans-7	0,29	0,28±0,00	0,30±0,00
C16:1, cis-7	4,05	5,89±0,13	4,77±0,18
C17:0	0,53	0,45±0,01	0,47±0,01
C17:1, trans-7	0,13	0,08±0,00	0,14±0,01
C17:1, cis-7	0,54	0,85±0,02	0,59±0,03
C18:0	1,93	2,89±0,07	2,81±0,09
C18:1, trans-9	0,07	0,09±0,01	0,12±0,01
C18:1, cis-11	0,24	0,66±0,01	0,98±0,02
C18:1, cis-9	20,90	16,76±0,25	20,46±0,35
C18:1, cis-11	2,93	2,74±0,02	2,82±0,03
C18:2, trans-9,trans12	0,03	0,16±0,00	0,03±0,00
C18:2, trans-9,cis-12	0,03	0,09±0,00	0,07±0,01
C18:2, cis-9, cis-12	7,86	9,26±0,17	8,13±0,25
C18:3, n-6	0,07	0,28±0,02	0,13±0,02
C18:3, n-3	3,36	1,30±0,03	2,19±0,04
C20:0	0,28	0,10±0,00	0,16±0,00
C20:1, trans-11	0,76	0,44±0,01	0,87±0,01
C20:1, cis-11	7,23	2,65±0,06	5,00±0,09
C18:2, cis-9,trans-11	0,33	0,22±0,00	0,27±0,00
C18:2, trans-10,cis-12	0,06	0,00±0,00	0,04±0,00
C18:4, n-3	1,93	1,62±0,04	1,33±0,06
C20:2, n-9	0,23	0,44±0,02	0,43±0,02
C20:3, n-3	0,05	0,29±0,01	0,22±0,01
C20:3, n-6	0,47	0,91±0,01	0,66±0,02
C20:4, n-6	9,31	2,03±0,08	4,65±0,12
C20:5, n-3	6,29	7,73±0,22	4,73±0,31
C22:0	0,15	0,01±0,01	0,07±0,01
C22:1, n-9	1,23	0,30±0,01	0,63±0,02
C24:1, n-9	0,69	0,26±0,01	0,40±0,01
C22:3, n-6	0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C22:4, n-6	0,39	0,62±0,01	0,42±0,01
C22:4, n-3	0,14	0,27±0,00	0,22±0,01
C22:5, n-3	0,72	2,61±0,03	1,77±0,04
C23:0	0,52	1,12±0,04	1,10±0,05

