

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Lučka BRULC

**ZEAKSANTIN,  $\beta$ -KRIPTOKSANTIN IN OSTALI  
KSANTOFILI V JAJČNIH RUMENJAKIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Lučka BRULC

**ZEAKSANTIN,  $\beta$ -KRIPTOKSANTIN IN OSTALI KSANTOFILI V  
JAJČNIH RUMENJAKIH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ZEAXANTHIN,  $\beta$ -CRYPTOXANTHIN AND OTHER  
XANTHOPHYLLS IN EGG YOLKS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 12. 10. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje prehrana. Za mentorico je bila imenovana viš. razisk.-raz. sod. dr. Breda SIMONOVSKA s Kemijskega inštituta.

Doktorsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za prehrabeno kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani in z infrastrukturo EN-FIST Centra odličnosti v okviru raziskovalnega programa »Funkcionalna živila in prehranska dopolnila« (P1-0005), katerega nosilka je bila dr. Irena VOVK in projekta »Navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.) kot surovina za izdelavo rastlinskega dodatka z zeaksantinom h krmilom kokoši nesnic« (L4-4322), katerega nosilka je bila dr. Breda SIMONOVSKA.

Mentorica: viš. razisk.-raz. sod. dr. Breda SIMONOVSKA

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: doc. dr. Jasna Bertonec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Članica: prof. dr. Antonija Holcman  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: doc. dr. Iztok Jože Košir  
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za agrokemijo in pivovartvo

Datum zagovora: 14. 7. 2015

Podpisana zagotavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v avtorski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka:  
Lučka Brulc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJA

ŠD Dd  
DK UDK 637.41:547.978.8:543.544(043)=163.6  
KG jajca/jajčni rumenjaki/karotenoidi/ksantofili/zeaksantin/beta-kriptoksantin/analizne metode/kromatografske tehnike/HPLC/navadno volčje jabolko/*Physalis alkekengi*  
AV BRULC, Lučka, univ. dipl. inž. živilske tehnologije  
SA SIMONOVSKA, Breda (mentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje prehrana  
LI 2015  
IN ZEAKSANTIN,  $\beta$ -KRIPTOKSANTIN IN OSTALI KSANTOFILI V JAJČNIH RUMENJAKIH  
TD Doktorska disertacija  
OP XVIII, 127 str., 31 pregl., 37 sl., 1 pril., 209 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Razvili in validirali smo izokratsko HPLC metodo za določanje osmih ksantofilov (lutein, kapsantin, zeaksantin, kantaksantin,  $\beta$ -apo-8'-karotenal, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, citranaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin) v jajčnih rumenjakih, pri čemer smo razvili tudi preprost postopek priprave testnih raztopin vzorcev. Primerjali smo ločbo navedenih ksantofilov na osmih kromatografskih kolonah. Izvedli smo kvalitativno in kvantitativno analizo ksantofilov v 64 vzorcih jajc iz vseh štirih načinov rej (baterijske, hlevske, proste, ekološke), različnih rejcev in blagovnih znamk s slovenskega tržišča. V vseh vzorcih je prevladoval lutein (povprečje 1,91 mg/100 g rumenjaka), precej manj je bilo zeaksantina (povprečje 0,85 mg/100 g rumenjaka),  $\beta$ -kriptoksantin, ki ga je bilo najmanj, je bil pogosto prisoten le v sledovih. V velikem številu vzorcev je bil prisoten tudi kantaksantin (povprečje 0,51 mg/100 g rumenjaka), ksantofil etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat (povprečje 0,21 mg/100 g rumenjaka) pa je vsebovalo manj vzorcev. V jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*) smo določili zeaksantin dipalmitat in  $\beta$ -kriptoksantin palmitat, identificirali tudi nekatere druge sekundarne metabolite, določili vsebnost saharoze, glukoze in fruktoze ter antioksidativno aktivnost ekstraktov po sukcesivni ekstrakciji. Po 10 dneh reje petih kokoši nesnic s krmo, obogateno s 40 g zmletih suhih povečanih čaš in jagod navadnega volčjega jabolka na kilogram krme, smo dosegli v rumenjakih do devetkrat večjo vsebnost zeaksantina in celo do 27-krat večjo vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina v primerjavi s kontrolno skupino petih nesnic ter povprečno intenzivnost barve rumenjaka 13,2 po Rochejevi barvni lestvici. Obogatena jajca so v povprečju vsebovala 2,6 mg zeaksantina in 0,7 mg  $\beta$ -kriptoksantina v 100 gramih rumenjaka, kar je trikrat več zeaksantina in desetkrat več  $\beta$ -kriptoksantina kot jajca s slovenskega tržišča.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 637.41:547.978.8:543.544(043)=163.6  
CX eggs/egg yolk/carotenoids/xanthophylls/zeaxanthin/beta-cryptoxanthin/analytical methods/HPLC/Chinese lantern/*Physalis alkekengi*  
AU BRULC, Lučka  
AA SIMONOVSKA, Breda (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field Nutrition  
PY 2015  
TI ZEAXANTHIN,  $\beta$ -CRYPTOXANTHIN AND OTHER XANTHOPHYLLS IN EGG YOLKS  
DT Doctoral Dissertation  
NO XVIII, 127 p., 31 tab., 37 fig., 1 ann., 209 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB An isocratic HPLC method for the determination of eight xanthophylls (lutein, capsanthin, zeaxanthin, canthaxanthin,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, ethyl-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate, citranaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin) in egg yolks together with a simple procedure for the preparation of sample test solutions was developed and validated. The separations of the titled xanthophylls obtained using eight different HPLC columns were compared. One method was chosen for their qualitative and quantitative analysis in 64 egg samples obtained from four husbandry classes (cage, barn, free range, ecological) of different farmers of laying hens and brands available at the Slovenian market. Lutein (mean: 1.91 mg/100 g egg yolk) was the main xanthophyll found in the samples. The content of zeaxanthin was lower (mean: 0.85 mg/100 g egg yolk), while  $\beta$ -cryptoxanthin was often present only in traces. Canthaxanthin (mean: 0.51 mg/100 g egg yolk) was present in the large number of samples, but few of them contained ethyl-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (mean: 0.21 mg/100 g egg yolk). In the berries and husks of Chinese lantern (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*) zeaxanthin dipalmitate and  $\beta$ -cryptoxanthin palmitate were determined. Additionally, some other secondary metabolites were identified, and the content of sucrose, glucose and fructose was determined. The antioxidant activity of the extracts, obtained by successive extraction, was also measured. After 10 days of 5 hens feeding with the enriched fodder (added 40 g of the ground dry husks and berries of Chinese lantern per kilogram), up to 9 times higher levels of zeaxanthin and up to 27 times higher levels of  $\beta$ -cryptoxanthin in the egg yolks were obtained, compared to the control group. The average yolk colour of 13.2 on the Roche colour scale was achieved. Hundred grams of Enriched egg yolks contained 2.6 mg of zeaxanthin and 0.7 mg  $\beta$ -cryptoxanthin on average. That is three times more zeaxanthin and ten times more  $\beta$ -cryptoxanthin than the respective contents found in the commercial eggs at the Slovenian market.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	XI
Kazalo prilog	XV
Okrajšave in simboli	XVI
Slovarček	XVIII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 IZHODIŠČE RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
1.3 NAMEN IN CILJI RAZISKAVE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 JAJCE	3
<b>2.1.1 Sestava jajca</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Jajce v vsakodnevni prehrani</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3 Obogatitev jajc s karotenoidi</b>	<b>6</b>
2.2 NAVADNO VOLČJE JABOLKO ( <i>Physalis alkekengi</i> L.)	10
<b>2.2.1 Morfološke značilnosti in pridelava</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2 Karotenoidi v navadnem volčjem jabolku</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3 Ostali sekundarni metaboliti v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka</b>	<b>12</b>
2.3 BIOSINTEZA, METABOLIZEM IN BIOLOŠKA DOSTOPNOST KSANTOFILOV	13
<b>2.3.1 Zgradba in biosinteza</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2 Metabolizem</b>	<b>13</b>
<b>2.3.3 Biološka razpoložljivost in dostopnost</b>	<b>14</b>
2.4 KSANTOFILI V VSAKODNEVNI PREHRANI	17
<b>2.4.1 Količina dnevno zaužitih ksantofilov</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2 Vloga zeaksantina in <math>\beta</math>-kriptoksantina v prehrani</b>	<b>17</b>
<b>2.4.3 Viri zeaksantina in <math>\beta</math>-kriptoksantina</b>	<b>18</b>
2.5 DOLOČANJE KSANTOFILOV V RUMENJAKU	18
<b>2.5.1 Določanje barve rumenjaka</b>	<b>18</b>
<b>2.5.2 Priprava testnih raztopin</b>	<b>19</b>
<b>2.5.3 Separacija, detekcija in kvantitativna določitev ksantofilov</b>	<b>20</b>
2.5.3.1 Spektrofotometrično določanje vsebnosti karotenoidov v jajčnem rumenjaku	20

2.5.3.2	Določanje vsebnosti karotenoidov s tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti	20
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>25</b>
3.1	MATERIALI	25
<b>3.1.1</b>	<b>Vzorci jajc</b>	<b>25</b>
3.1.1.1	Jajca s slovenskega tržišča	25
3.1.1.2	Jajca iz študije vpliva dodatka delov rastline navadnega volčjega jabolka v kokošjo krmo	28
<b>3.1.2</b>	<b>Vzorci navadnega volčjega jabolka</b>	<b>28</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Kemikalije</b>	<b>29</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Aparature in sistemi</b>	<b>30</b>
3.1.4.1	Aparature	30
3.1.4.2	TLC sistemi	30
3.1.4.3	HPLC sistem	31
3.2	METODE ZA ANALIZO KSANTOFILOV V RUMENJAKU	31
<b>3.2.1</b>	<b>Razvoj HPLC metode</b>	<b>31</b>
3.2.1.1	Priprava standardnih raztopin ksantofilov in določanje njihove točne koncentracije	31
3.2.1.2	Optimizacija priprave testne raztopine iz rumenjaka za HPLC analizo	33
3.2.1.3	Optimizacija pogojev HPLC analize	34
3.2.1.3.1	Optimizacija mobilne faze	34
3.2.1.3.2	Optimiziranje količine pufra v mobilni fazi	34
3.2.1.3.3	Optimizacija temperature kolone	34
3.2.1.3.4	Primerjava kolon s poroznimi delci (»full-porous«) in delno poroznimi delci (»core-shell«) za analizo ksantofilov	35
<b>3.2.2</b>	<b>Analizni postopek »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku« in njegova validacija</b>	<b>36</b>
3.2.2.1	Analizni postopek	36
3.2.2.1.1	Priprava testnih raztopin iz rumenjaka	36
3.2.2.1.2	Vsebnost celokupnih karotenoidov (spektrofotometrična analiza)	36
3.2.2.1.3	HPLC analiza	37
3.2.2.2	Validacijski protokol	37
3.2.2.2.1	Ponovljivost sistema	37
3.2.2.2.2	Ponovljivost metode in izkoristek dodatka standarda	37
3.2.2.2.3	Linearnost, meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ)	38
3.2.2.2.4	Selektivnost in robustnost	38
<b>3.2.3</b>	<b>Razvoj TLC metode za kvalitativno določanje ksantofilov v rumenjaku</b>	<b>38</b>
3.3	METODE PRI ŠTUDIJAH KSANTOFILOV V RUMENJAKIH	39
<b>3.3.1</b>	<b>Določanje razlik v vsebnosti ksantofilov v kupljenih jajcih</b>	<b>39</b>

<b>3.3.2</b>	<b>Določanje vsebnosti ksantofilov v jajcih s slovenskega tržišča</b>	<b>39</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Obogatitev jajčnega rumenjaka z zeaksantinom in <math>\beta</math>-kriptoksantinom z dodatkom jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka v kokošjo krmo</b>	<b>40</b>
3.4	METODE ZA ANALIZO IN KARAKTERIZACIJO NAVADNEGA VOLČJEGA JABOLKA	42
<b>3.4.1</b>	<b>Določitev zeaksantin dipalmitata in <math>\beta</math>-kriptoksantina palmitata v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka</b>	<b>42</b>
<b>3.4.2</b>	<b>TLC presejalna metoda za določanje triterpenoidov na površini povečanih čaš in jagod</b>	<b>43</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Kvantitativna TLC določitev sladkorjev</b>	<b>44</b>
<b>3.4.4</b>	<b>TLC presejalna metoda za detekcijo flavonoidov in spojin, ki reagirajo z reagentom DPPH</b>	<b>44</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Spektrofotometrične metode za določitev antioksidativne aktivnosti ekstraktov</b>	<b>46</b>
3.4.5.1	Metoda Folin-Ciocalteu	46
3.4.5.2	Določanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov z reagentom DPPH	46
3.4.5.3	Sposobnost redukcije ionov $\text{Fe}^{3+}$ v $\text{Fe}^{2+}$	47
3.5	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	47
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO</b>	<b>48</b>
4.1	KSANTOFILI V RUMENJAKU	48
<b>4.1.1</b>	<b>Razvoj HPLC metode za določanje karotenoidov v rumenjaku</b>	<b>48</b>
4.1.1.1	Optimizacija priprave testnih raztopin	48
4.1.1.2	Optimizacija mobilne faze	49
4.1.1.3	Vpliv temperature kolone	53
4.1.1.4	Primerjava kolon za ločbo karotenoidov	56
4.1.1.4.1	Primerjava kolon $\text{C}_{30}$ s poroznimi delci (»fully porous«)	57
4.1.1.4.2	Primerjava kolon nove generacije z delno poroznimi delci	62
<b>4.1.2</b>	<b>Validacijsko poročilo za analizni postopek »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku«</b>	<b>67</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Razvoj kvalitativne TLC metode za določanje ksantofilov v jajcu</b>	<b>69</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Razlike v vsebnosti ksantofilov v kupljenih jajcih</b>	<b>73</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Ksantofili v jajcih s slovenskega tržišča</b>	<b>73</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Ksantofili v jajcih nesnic krmljenih z dodatkom navadnega volčjega jabolka</b>	<b>87</b>
4.2	ANALIZE ZA KARAKTERIZACIJO POVEČANIH ČAŠ IN JAGOD NAVADNEGA VOLČJEGA JABOLKA	92
<b>4.2.1</b>	<b>Določitev zeaksantin dipalmitata in <math>\beta</math>-kriptoksantina palmitata</b>	<b>92</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Kvantitativna TLC določitev sladkorjev</b>	<b>95</b>
<b>4.2.3</b>	<b>TLC presejalna metoda za detekcijo triterpenoidov na površini povečanih čaš in jagod</b>	<b>96</b>



<b>4.2.4</b>	<b>Metode za določanje antioksidativne aktivnosti</b>	<b>97</b>
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>106</b>
6.1	POVZETEK	106
6.2	SUMMARY	108
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>110</b>
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

		str.
Preglednica 1	Nekatera pomembna makro- in mikrohranila v jajcu (USDA, 2014)	5
Preglednica 2	HPLC metode za analizo karotenoidov v rumenjaku	22
Preglednica 3	Seznam analiziranih vzorcev jajc iz baterijske (3), hlevske (2), proste (1) in ekološke reje (0) za določitev razlik v vsebnosti ksantofilov v kupljenih jajcih	25
Preglednica 4	Seznam vzorcev jajc iz baterijske reje	26
Preglednica 5	Seznam vzorcev jajc iz hlevske reje	27
Preglednica 6	Seznam vzorcev jajc iz proste reje	27
Preglednica 7	Seznam vzorcev jajc iz ekološke reje	28
Preglednica 8	Specifični absorpcijski koeficienti ksantofilov ( $A_{1\%, 1\text{ cm}, \lambda}$ )	32
Preglednica 9	Seznam testiranih HPLC kolon	35
Preglednica 10	Sestava popolne krmne mešanice za kokoši nesnice (NSK) (Jata Emona, Slovenija)	41
Preglednica 11	Hranilna vrednost popolne krmne mešanice za kokoši nesnic (NSK) (Jata Emona, Slovenija)	42
Preglednica 12	Resolucija med dvema sosednjima kromatografskima vrhovoma pri uporabi RP kolon $C_{30}$ s poroznimi delci (glej slike 13, 15 in 16)	60
Preglednica 13	Asimetrija – faktor repanja (TF) kromatografskih vrhov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (7), $\beta$ -kriptoksantina (8) pri uporabi RP kolon $C_{30}$ s poroznimi delci	61
Preglednica 14	Meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ) ksantofilov MIX5 pri uporabi RP kolon $C_{30}$ s poroznimi delci	61
Preglednica 15	Resolucija med dvema sosednjima kromatografskima vrhovoma pri uporabi RP kolon $C_{18}$ z delno poroznimi delci	66
Preglednica 16	Asimetrija – faktor repanja (TF) kromatografskih vrhov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (7), $\beta$ -kriptoksantina (8) pri uporabi RP kolon $C_{18}$ z delno poroznimi delci	67
Preglednica 17	Regresijske premice ( $n = 3$ ) in meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ) petih ksantofilov MIX5	68
Preglednica 18	Rezultati izkoristka ( $n = 3$ ) za pet ksantofilov	69
Preglednica 19	Variabilnost vsebnosti karotenoidov 5 pakiranj jajc ( $n = 6$ ) iz različnih načinov rej: ekološke (0), proste (1), hlevske (2) in baterijske reje ( $3^a$ in $3^b$ )	73

Preglednica 20	Ksantofili v rumenjakih jajc iz baterijske reje	75
Preglednica 21	Ksantofili v rumenjakih jajc iz hlevske reje	76
Preglednica 22	Ksantofili v rumenjakih jajc iz proste reje	76
Preglednica 23	Ksantofili v rumenjakih jajc iz ekološke reje	77
Preglednica 24	Parametri opisne statistike za vsebnost luteina (1), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), $\beta$ -kriptoksantina (8) in barva rumenjaka v rumenjakih jajc na slovenskem trgu (n = 64)	78
Preglednica 25	Parametri opisne statistike za vsebnost luteina (1), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), $\beta$ -kriptoksantina (8) in barvo rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev (n = 46)	79
Preglednica 26	Analiza variance 64 rumenjakov različnih blagovnih znamk in rejcev s slovenskega tržišča (baterijska – 3, hlevska – 2, prosta – 1, ekološka – 0)	82
Preglednica 27	Analiza variance 46 vzorcev jajc kokoši slovenskih rejcev različnih blagovnih znamk (baterijska – 3, hlevska – 2, prosta – 1, ekološka – 0)	85
Preglednica 28	Parametri opisne statistike za vsebnosti luteina, zeaksantina in $\beta$ -kriptoksantina po stabilizaciji njihove vsebnosti (po 10. dnevu) v rumenjakih jajc pri kontrolni skupini (krma NSK) in pri poskusni skupini (40 mg navadnega volčjega jabolka na kg krme NSK)	90
Preglednica 29	Parametri opisne statistike vsebnosti celokupnih karotenoidov, barve rumenjaka, mase jajca in rumenjaka po stabilizaciji vsebnosti ksantofilov (po 10. dnevu) pri kontrolni (krma NSK) in pri poskusni skupini (40 mg navadnega volčjega jabolka/kg krme NSK)	91
Preglednica 30	Vsebnost ksantofilov v posušenem navadnem volčjem jabolku	95
Preglednica 31	Vsebnost saharoze, glukoze in fruktoze v suhih delih navadnega volčjega jabolka	96

## KAZALO SLIK

		str.
Slika 1	Sestava jajca (povzeto po Nys in Guyot, 2011)	3
Slika 2	Strukturne formule 8 ksantofilov, ki so dovoljeni dodatki h krmi perutnine (Brulc in sod., 2013)	9
Slika 3	Jagode in povečane čaše navadnega volčjega jabolka – <i>Physalis alkekengi</i> L. (Foto: Brulc L.)	11
Slika 4	Struktura dveh najpomembnejših estrov v navadnem volčjem jabolku	12
Slika 5	Stopnje v absorpciji karotenoidov in prehranski dejavniki, ki vplivajo na absorpcijo (van het Hof in sod., 2000)	15
Slika 6	Rochejeva barvna pahljača (Foto: Brulc L.)	19
Slika 7	Shema študije vpliva dodatka jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka na vsebnost zeaksantina in $\beta$ -kriptoksantina v rumenjaku s prikazanimi časi vzorčenj	40
Slika 8	Vpliv ekstrakcijskega topila in časa na vsebnost celokupnih karotenoidov v rumenjaku	49
Slika 9	HPLC kromatograma ksantofilov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7), $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilna faza aceton:voda (93:7, v/v) (A); mobilna faza aceton:0,5 M TEAA pH 7 (93:7, v/v) (B)	50
Slika 10	HPLC kromatogrami ksantofilov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7), $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol (1:4, v/v) s pretokom 1,5 mL/min pri različnih temperaturah	51
Slika 11	Povečanje ploščine kromatografskih vrhov na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), kot posledica dodatka različnih koncentracij TEAA pufra pH 7 k mobilni fazi aceton:metanol:voda (14:5:1, v/v/v), T = 25 °C, pretok 1 mL/min	52
Slika 12	Vpliv temperature na retencijski čas ksantofilov (A) in van't Hoff-ova krivulja (B) na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1 v/v/v), pretok 1 mL/min	54
Slika 13	HPLC kromatogram ksantofilov MIX8 na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 27 °C; pretok 1 mL/min	55

Slika 14	PDA spektri luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7), $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), ki so bili posneti med HPLC ločbo z uporabo mobilne faze aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v), T = 27 °C, pretok 1 mL/min	56
Slika 15	HPLC kromatogram ksantofilov iz MIX8 na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 3 $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 25 °C; pretok 1 mL/min	58
Slika 16	HPLC kromatogram ksantofilov iz MIX8 na koloni Acclaim C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilna faza aceton:acetonitril: 0,5 M TEAA pH 7 (10:9:1, v/v/v); T = 15 °C; pretok 1 mL/min	59
Slika 17	Število teoretskih podov (N) za testirane RP kolone C <sub>30</sub> s poroznimi delci	60
Slika 18	HPLC kromatograma ksantofilov iz MIX8 na kolonah Accucore C <sub>18</sub> in Accucore XL C <sub>18</sub> (100 × 4,6 mm) velikosti delcev 2,6 $\mu$ m in 4 $\mu$ m, mobilna faza acetonitril:0,5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), T = 28 °C, pretok 1 mL/min.	63
Slika 19	HPLC kromatograma ksantofilov iz MIX8 na kolonah Accucore C <sub>18</sub> in Accucore C <sub>30</sub> (100 × 4,6 mm, 4 $\mu$ m), mobilna faza acetonitril:0,5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), T = 28 °C, pretok 1 mL/min	64
Slika 20	HPLC kromatogrami ksantofilov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4), $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7), $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na kolonah Accucore C <sub>18</sub> (velikost delcev 2,6 $\mu$ m), Ascentis Express C <sub>18</sub> (velikost delcev 2,7 $\mu$ m) in Kinetex C18 (velikost delcev 2,6 $\mu$ m), dimenzije 100 × 4,6 mm, mobilna faza acetonitril:0,5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), pretok 1 mL/min, pri T = 12 °C (A) in T = 28 °C (B)	65
Slika 21	Število teoretskih podov (N) za RP C <sub>30</sub> kolone z delno poroznimi delci	66
Slika 22	Optimizacija topila za razvijanje za ločbo standardov ksantofilov MIX8 na HPTLC RP C <sub>18</sub> silikagel 60 plošči z uporabo različnih topil za razvijanje: metanol:aceton, 7:3, v/v (a), metanol:aceton: <i>n</i> -heksan, 14:5:1, v/v/v (b), metanol:aceton: <i>n</i> -heksan, 12:5:3, v/v/v (c), metanol:aceton:THF, 14:5:1, v/v/v (d), metanol:aceton:petroleter, 2:1:1, v/v/v (e), metanol:aceton:petroleter, 13:5:2, v/v/v (f), metanol (g), acetonitril (h), etanol (i), 1-propanol (j), 2-propanol (k), 1-propanol:etilacetat,4:1, v/v (l), 1-propanol:2-propanol, 1:1, v/v (m), 1-propanol:2-propanol:aceton, 2:2:1, v/v/v (n), 1-butanol (o),	70

	1-propanol:2-propanol:metanol, 2:2:1, v/v/v (p), 2-propanol:metanol, 3:2, v/v (r), metanol:2-propanol,4:1, v/v (s), metanol:1-propanol, 4:1, v/v (t)	
Slika 23	HPTLC kromatogram (plošča: HPTLC RP C <sub>18</sub> silikagel 60) standardov ksantofilov (20 $\mu$ L) in vzorca jajc (100 $\mu$ L), pri uporabi topila za razvijanje: 1-propanol:2-propanol,1:1, v/v, t = 84 min (A) in metanol, t = 28 min (B)	72
Slika 24	Primer HPLC kromatograma testne raztopine vzorca rumenjaka proste reje	74
Slika 25	Porazdelitev vzorcev 64 rumenjakov različnih blagovnih znamk in rejcev s slovenskega tržišča po metodi glavnih osi	83
Slika 26	Vpliv spremenljivk na porazdelitev vzorcev 64 rumenjakov različnih blagovnih znamk in rejcev s slovenskega tržišča po metodi glavnih osi	84
Slika 27	Porazdelitev vzorcev 46 rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev različnih blagovnih znamk po metodi glavnih osi	86
Slika 28	Vpliv spremenljivk na porazdelitev 46 rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev različnih blagovnih znamk vzorcev jajc po metodi glavnih osi	86
Slika 29	Povprečna vsebnost ( $\pm$ SD) zeaksantina (A) in $\beta$ -kriptoksantina (B) v 5 rumenjakih glede na čas krmljenja s 40 g mešanice suhih povečanih čaš in jagod navadnega volčjega jabolka na kg popolne krmne mešanice za kokoši nesnice (NSK)	89
Slika 30	HPLC kromatogram zeaksantin dipalmitata na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilni fazi (A) aceton ter (B) aceton: metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); gradient: 6,8 min 100 % A, 1,2 min 0–100 % B, 16 min 100 % B, 4 min 100 % A; T = 27 °C; pretok 2,5 mL/min	93
Slika 31	HPLC kromatogram testne raztopine povečanih čaš (A) in jagod (B) navadnega volčjega jabolka na koloni ProntoSIL C <sub>30</sub> (250 $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu$ m), mobilni fazi (A) aceton ter (B) aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); gradient: 6,8 min 100 % A, 1,2 min 0-100 % B, 16 min 100 % B, 4 min 100 % A; T = 27 °C; pretok 2,5 mL/min	94
Slika 32	Kromatogram presejalne analize 13 triterpenoidov testnih raztopin jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka pri osvetlitvi z belo svetlobo in UV <sub>366</sub>	97
Slika 33	Vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena z mg galne kisline (GA) na 1 g suhih povečanih čaš navadnega volčjega jabolka (n = 3)	98
Slika 34	Moč redukcije, izražena kot naklon premice (CR), ki predstavljajo odvisnost A <sub>740 nm</sub> od koncentracije testne raztopine v reakcijski zmesi	99

Slika 35	HPTLC kromatogram (plošča: HPTLC RP C18 silikagel 60; topilo za razvijanje: aceton:metanol: <i>n</i> -heksan, 1:1:1, v/v/v) standardov karotenoidov (4 $\mu$ L) in testnih raztopin suhih povečanih čaj navadnega volčjega jabolka (4 $\mu$ L) pred (A) in po (B) derivatizaciji z DPPH	100
Slika 36	HPTLC kromatograma (plošča: HPTLC silikagel 60; topilo za razvijanje: etilacetat:mravljična kislina:voda, 85:10:15, v/v/v) standardov flavonoidov (0,1 $\mu$ g) in testnih raztopin (4 $\mu$ L) pri UV <sub>366</sub> detekciji (A) in po derivatizaciji z DPPH (B)	101
Slika 37	TLC kromatogram (plošča: HPTLC silikagel 60; topilo za razvijanje: <i>n</i> -heksan: etilacetat, 5:1, v/v) standarda $\beta$ -amirina (0,6 $\mu$ g), $\beta$ -sitosterola (0,5 $\mu$ g) in testnih raztopin pred (A) in po (B) derivatizaciji z DPPH	102

## KAZALO PRILOG

Priloga A      Toplotni graf (heatmap)



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADI	sprejemljiv dnevni vnos (angl. Acceptable Daily Intake)
ANOVA	analiza variance
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
DHK	dokozaheksaenojska kislina
DPPH	1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil
EPK	eikozapentaenojska kislina
GC	plinska kromatografija (angl. Gas Chromatography)
HDL	lipoproteini visoke gostote (angl. High Density Lipoproteins)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Thin-layer Chromatography)
LC x LC	dvodimenzionalna tekočinska kromatografija
LC	tekočinska kromatografija (angl. Liquid Chromatography)
LDL	lipoproteini nizke gostote (angl. Low Density Lipoproteins)
LOD	meja zaznavnosti (angl. Limit of Detection)
LOQ	meja določanja (angl. Limit of Quantification)
MAKS	največje število
MIN	najmanjše število
MIX2	mešanica standardov dveh ksantofilov (lutein in zeaksantin)
MIX5	mešanica standardov petih ksantofilov (lutein, zeaksantin, kantaksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, $\beta$ -kriptoksantin)
MIX8	mešanica standardov osmih ksantofilov (lutein, kapsantin, zeaksantin, kantaksantin, $\beta$ -apo-8'-karotenol, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, citranaksantin, $\beta$ -kriptoksantin)
MS	masna spektrometrija
NP	normalna faza (angl. Normal Phase)
NSK	popolna krmna mešanica za kokoši nesnice
PCA	metoda glavnih osi (angl. Principal Component Analysis)
PDA	detektor z nizom diod, (angl. Photodiode Array detector)
PVDF	hidrofoben poliviniliden diklorid
RDA	priporočeni dnevni vnos (angl. Recommended Dietary Allowance)
RDI	priporočeni prehranski vnos (angl. Recommended Dietary Intake)
RP	reverzna faza (angl. Reversed Phase)
RSD	relativni standardni odklon (angl. Relative Standard Deviation)
RYCF	barvna pahljača (angl. Roche Yolk Colour Fan)
SD	standardni odklon (angl. Standard Deviation)
TBHQ	<i>tert</i> -butilhidrokinon

TBME	<i>tert</i> -butil metil eter
TEAA	triethylamonijev acetat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. Thin-layer Chromatography)
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote (angl. Very Low Density Lipoproteins)

## SLOVARČEK

- Derivatizacija kemijska reakcija, ki poteče med molekulami določene spojine in določenim reagentom, s katerim uvedemo tako skupino, ki povzroči, da molekule absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine.
- Rochejeva barvna lestvica intenziteta barve rumenjaka določena z Rochejevo barvno lestvico z vrednostmi od 1 (najmanjša) – 15 (največja).

## 1 UVOD

### 1.1 IZHODIŠČE RAZISKAVE

V naravi so doslej odkrili več kot 600 karotenoidov, ki so derivati izoprena, najpogosteje s skeletom C<sub>40</sub>. Delimo jih na karotene, ki so čisti ogljikovodiki, in ksantofile, ki imajo v molekuli različno število atomov kisika. Človeško telo karotenoidov ne more sintetizirati, tako kot to lahko storijo rastline, zato jih moramo podobno kot živali dobiti s hrano. Zavedanje o njihovi pomembnosti v prehrani ljudi pa je iz dneva v dan večje. Tako luteinu in zeaksantinu pripisujejo vse večji pomen pri ohranjanju zdrave očesne mrežnice in preventivo pred nekaterimi nevarnimi očesnimi obolenji, ki ogrožajo vid predvsem v starosti, nadalje za zaščito kože pred sončnimi žarki ter za zmanjševanje tveganja nastanka nekaterih kroničnih obolenj. Znano je, da nekateri karotenoidi prehajajo v kri. V krvi je zeaksantina manj kot luteina, kar je posledica njegove manjše vsebnosti v vsakodnevni sodobni prehrani. V področju rumene pege pa je prisoten v večji koncentraciji kot lutein in kjer ima verjetno bolj pomembno funkcijo od luteina.

Jajce je prehransko polnovredno živilo z visoko biološko vrednostjo. Zaradi relativno enostavnega prenosa prehransko pomembnih snovi v jajca preko krme, se na trgu pojavljajo jajca s povečano vsebnostjo vitamina E, n-3 maščobnih kislin, luteina, selena, itd. Biološka dostopnost teh spojin iz rumenjaka je mnogo večja kot iz živil rastlinskega izvora. Ker pa je vsebnost luteina v rastlinskih živilih relativno velika, je kljub nižji biološki dostopnosti vnos s hrano mnogo manj problematičen kot vnos z zeaksantinom.

Da bi obogatili jajce z zeaksantinom, bi lahko uporabili dele rastline navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.), ki se goji kot okrasna rastlina. Ker poleg zeaksantina vsebuje relativno veliko  $\beta$ -kriptoksantina, ki je provitamin A, je možno, da bi se povečala tudi vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina v rumenjakih. Za detekcijo in določanje teh spojin je potrebno razviti hitre in enostavne kvalitativne in kvantitativne analize metode na osnovi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC – High-Performance Liquid Chromatography) za določanje vsebnosti ksantofilov v jajcu, kot tudi v navadnem volčjem jabolku.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Za kvantitativno analizo ksantofilov v jajčnem rumenjaku je mogoče razviti enostavnejšo HPLC metodo, kot so že objavljene.
- Izbrani deli rastline navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.) imajo ustrezno sestavo in vsebnost ksantofilov zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, da bi lahko iz njih izdelali prehransko dopolnilo.
- Vsebnost zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina v jajčnem rumenjaku se lahko poveča z dodatkom delov rastline navadno volčje jabolko v prehrano kokoši nesnic.

### 1.3 NAMEN IN CILJI RAZISKAVE

Cilj dela je povečanje vsebnosti zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina v jajcu z dodatkom delov navadnega volčjega jabolka v krmo. Pregled vsebnosti ksantofilov v jajcih s tržišča Republike Slovenije je bil potreben za to, da lahko obogatena jajca primerjamo in tako lažje ocenimo vrednost dosežka – obogatitve rumenjaka z zeaksantinom in  $\beta$ -kriptoksantinom. Poleg tega pa je to pomembna informacija o prehranski vrednosti jajc, ki jih uživajo slovenski potrošniki.

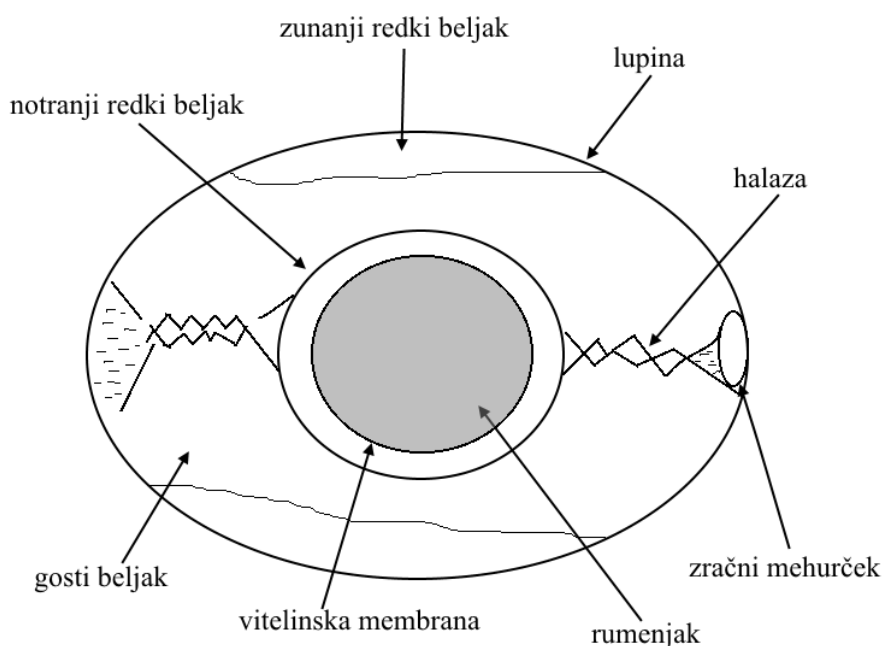
Karakterizacija jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka nekoliko bolj osvetli kemijsko sestavo, saj ta vpliva na stabilnost ksantofilov in nesnost kokoši. Tako je bila določena sestava in vsebnost ksantofilov ter identifikacija nekaterih ostalih glavnih komponent, kot so npr. triterpenoidi, flavonoidi, steroli v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 JAJCE

#### 2.1.1 Sestava jajca

Znano je, da potrebuje kokoš za izdelavo jajca okoli dva tedna, od tega samo rumenjaki nastaja 10–12 dni (Stadelman, 1990). Rumenjaki se nahaja v osrednjem delu jajca (slika 1) in predstavlja 25–33 % (okoli 17,3 g/60 g jajca) mase celega jajca (Nys in Guyot, 2011). Sestavljen je iz latebre, germinalnega diska in svetlih ter temnih plasti rumenjaka, ki se razlikujeta po tipu lipoproteinskih emulzij. Temni rumenjaki se nalaga podnevi, svetli pa ponoči (Okubo in sod., 1996). Vse skupaj je ovito s troslojno vitelinsko ali rumenjarkovo membrano. Značilno rumeno-oranžno barvo dajejo rumenjaku ksantofili, saj imajo karoteni majhno učinkovitost nalaganja v rumenjaki (Handelman in sod., 1999; Hammershøj in sod., 2010). Med ksantofili, ki predstavljajo 90 % vseh karotenoidov v rumenjaku (Nys in Guyot, 2011), sta najbolj zastopana lutein in zeaksantin, nekaj pa je tudi  $\beta$ -kriptoksantina (Seuss-Baum in sod., 2011).



Slika 1: Sestava jajca (povzeto po Nys in Guyot, 2011)

Figure 1: Egg composition (adapted from Nys in Guyot, 2011)

Beljak obdaja rumenjaki in predstavlja 57–65 % (37 g/60 g jajca) celotnega jajca (Nys in Guyot, 2011). Sestavljen je iz treh (Stadelman, 1990), nekateri pravijo tudi iz štirih (Nys in Guyot, 2011) slojev, ki se razlikujejo po gostoti (vsebnosti beljakovin). Rumenjaki obdaja

sloj gostega beljaka ali halaziferna plast, ki na polih prehaja v dve spiralno zviti halazi, ki zadržujeta rumenjaka v osrednjem delu. Sledi plast notranjega redkega beljaka in (zunanjega) gostega ali čvrstega beljaka ter zunanjega redkega beljaka. Beljak obdajata dve membrani, notranja in zunanja, med katerima se na širšem delu nahaja zračni mehurček.

Lupina predstavlja 8,5–10,5 % jajca (Nys in Guyot, 2011) in je sestavljena predvsem iz kalcijevega karbonata. To je najbolj zunanji del jajca, ki ščiti jajce pred poškodbami in vdorom mikroorganizmov.

### **2.1.2 Jajce v vsakodnevni prehrani**

Kokošje jajce skupaj z mlekom in kruhom povsod po svetu uvrščajo v skupino osnovnih živil. Na leto se priredi 1,24 milijarde kokošjih jajc, od tega v Evropi priredimo 14,5 % svetovne prireje (FAOSTAT, 2014). Navkljub številnim negativnim reklamam v preteklosti, predvsem na račun vsebnosti holesterola, pa svetovna prireja in poraba jajc raste, v zadnjem desetletju kar za 55 % (FAOSTAT, 2014). Največji rejec jajc je Kitajska, sledita ji Amerika in Indija. Vsak prebivalec ZDA in Evrope po podatkih poje 230–240 jajc letno (Magdelaine, 2011). V Sloveniji, kjer je prebivalec leta 2013 pojedel le 171 jajc (SI-STAT, 2013), je anketa pokazala, da okoli polovica študentov zaužije 2–3 jajca na teden (Keser, 2009; Tisaj, 2011). Razlog za manjšo porabo jajc je po vsej verjetnosti neozaveščenost Slovencev o prehranski vrednosti jajc (Tisaj, 2011).

Jajce je živilo z odlično prehransko vrednostjo, saj vsebuje veliko kakovostnih proteinov, vitaminov in mineralov (preglednica 1) ter malo maščob v primerjavi z mnogimi drugimi živali. Z enim jajcem (53 g) zaužijemo le okoli 76 kcal/264 kJ, a obenem zagotovimo več kot 15 % priporočenega dnevnega vnosa (RDA - Recommended Dietary Allowances) vitamina D, riboflavina ( $B_2$ ), tiamina ( $B_1$ ) in  $B_{12}$ , folne kisline in selena (glede na Commission Directive 90/496/EEC, 2008). Z dvema jajcema pa pokrijemo več kot 15 % RDI vitamina A in pantotenske kisline. Po podatkih raziskave vsak prebivalec ZDA z rednim uživanjem 4–5 jajc na teden vnese < 10 % priporočenega prehranskega vnosa (RDI – Reference Dietary Intake) energije in vitamina  $B_6$ , 10–20 % RDI folata in nasičenih ter večkrat nenasičenih maščobnih kislin ter 20–30 % RDI vitaminov A, E, in  $B_{12}$  (Song in Kerver, 2000).

Jajca ne vsebujejo vitamina C, saj ga lahko kokoši proizvedejo same in zato ni potreben za razvoj zarodka. Vsebnosti večine vitaminov in mineralov v jajcu se spreminjajo s sestavo krme (Stadelman in Pratt, 1989; Leeson in Caston, 2003), zato se vrednosti vitaminov in mineralov v prehranskih tabelah med seboj razlikujejo (Seuss-Baum in sod., 2011).

Preglednica 1: Nekatera pomembna makro- in mikrohranila v jajcu (USDA, 2014)

Table 1: Some important macro- and micronutrients in the egg (USDA, 2014)

<b>hranilo</b>	na 100 g <b>rumenjaka</b>	na 100 g <b>beljaka</b>	na 100 g <b>celega jajca</b>	
voda	52,3 g	78,6 g	76,2 g	
energijska vrednost	322 kcal/1346 kJ	52 kcal/216 kJ	143 kcal/499 kJ	
maščobe	36,5 g	0,2 g	9,5 g	
od teh				
• nasičene maščobe	9,6 g	0 g	3,1 g	
• enkrat-nenasičene	11,7 g	0 g	3,7 g	
• večkrat-nenasičene	4,2 g	0 g	1,9 g	
• EPK	11 mg	0 mg	0 mg	
• DHK	114 mg	0 mg	58 mg	
• holesterol	1085 mg	0 g	372 mg	
ogljikovi hidrati	4,2 g	1,4 g	1,0 g	
od teh				
• sladkorji	0,6 g	0,7 g	0,4 g	
beljakovine	15,9 g	10,9 g	12,6 g	
prehranska vlaknina	0 g	0 g	0 g	
<b>KAROTENOIDI</b>				
lutein + zeaksantin	1094 $\mu$ g	0 $\mu$ g	503 $\mu$ g	
$\alpha$ -karoten	38 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0 $\mu$ g	
$\beta$ -karoten	88 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0 $\mu$ g	
$\beta$ -kriptoksantin	33 $\mu$ g	0 $\mu$ g	9 $\mu$ g	
<b>VITAMINI</b>				
				<b>% RDA<sup>a</sup></b>
tiamin (B1)	176 $\mu$ g	4 $\mu$ g	40 $\mu$ g	36
riboflavin (B2)	528 $\mu$ g	439 $\mu$ g	457 $\mu$ g	32
pantotenska kislina	2990 $\mu$ g	190 $\mu$ g	1533 $\mu$ g	26
niacin	24 $\mu$ g	105 $\mu$ g	75 $\mu$ g	< 0,1
vitamin B6	350 $\mu$ g	5 $\mu$ g	170 $\mu$ g	12
folat	164 $\mu$ g	4 $\mu$ g	47 $\mu$ g	
vitamin B12	2 $\mu$ g	0,1 $\mu$ g	0,9 $\mu$ g	36
vitamin A (RAE <sup>b</sup> )	381 $\mu$ g	0 $\mu$ g	160 $\mu$ g	20
vitamin E	2,6 mg	0 mg	1,1 mg	9
vitamin D (D2+D3)	5,4 $\mu$ g	0 $\mu$ g	2,0 $\mu$ g	40
vitamin K	0,7 $\mu$ g	0 $\mu$ g	0,3 $\mu$ g	0,4
<b>MINERALI</b>				
kalcij (Ca)	129 mg	7 mg	56 mg	0,1
magnezij (Mg)	5 mg	11 mg	12 mg	< 0,1
železo (Fe)	2,7 mg	0,1 mg	1,8 mg	12
fosfor (P)	390 mg	15 mg	198 mg	28
kalij (K)	109 mg	163 mg	138 mg	7
natrij (Na)	48 mg	166 mg	142 mg	
cink (Zn)	2300 $\mu$ g	30 $\mu$ g	1290 $\mu$ g	13
baker (Cu)	77 $\mu$ g	23 $\mu$ g	72 $\mu$ g	7
mangan (Mn)	55 $\mu$ g	11 $\mu$ g	28 $\mu$ g	1
selen (Se)	56 $\mu$ g	20 $\mu$ g	31 $\mu$ g	56

<sup>a</sup>RDA (Recommended Dietary Allowances) – priporočen dnevni vnos (Commission Directive 90/496/EEC, 2008)

<sup>b</sup>RAE (Retinol Activity Equivalents) – 1 ekvivalent retinolne aktivnosti (RAE) = 1  $\mu$ g retinola



Jajca so, poleg velike vsebnosti vitaminov in mineralov, bogata tudi z esencialnimi aminokislinami v razmerju, ki so blizu idealnih za ljudi (Surai in Sparks, 2001), poleg tega pa vsebujejo tudi mešanico karotenoidov, predvsem lutein in zeaksantin. Prehrana, bogata z luteinom in zeaksantinom, je koristna za zdravje ljudi, zlasti za preprečevanje degeneracije rumene pege in sive mrežnice, ki sta povezani s staranjem (Schalch in sod., 2009; Ma in Lin, 2010). Referenčna vrednost za vnos karotenoidov še ni določena, kljub temu pa priporočajo dnevni vnos 2 mg (Chew in sod., 2013). V tem primeru bi z enim jajcem dobili okoli 15 % priporočljivega dnevnega vnosa.

Večina hranil v jajcu, med njimi tudi karotenoidi (Chung in sod., 2004), so visoko biološko dostopna (Surai in sod., 2000). To pa ne velja za železo, ki je v jajcu v ferični obliki ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in v interakciji s fosfoproteinom fosfitinom iz rumenjaka (Seuss-Baum in sod., 2011).

Kljub zavedanju o pomembnosti uživanja jajc pa je ovira za povečanje uživanja prehranski holesterol, saj z enim jajcem (53 g) zaužijemo 200 mg holesterola, kar pomeni 2/3 RDI holesterola. V preteklosti je vladalo prepričanje, da jajca zaradi holesterola niso primerna za uživanje, vendar najnovejše raziskave potrjujejo, da prehrana bogata z jajci nima vpliva na aterosklerozo in povečanje rizika za kardiovaskularne bolezni (Gray in Griffin, 2009).

Zaradi visoke biološke dostopnosti hranil iz jajca in lahkega manipuliranja sestave jajca s krmo je jajce odličen medij za prenos hranil. O prvi obogatitvi jajc so poročali leta 1934, ko so skušali spremeniti sestavo maščobnih kislin v jajcu s pomočjo spremenjene sestave krme (Cruickshank, 1934). Kasneje so jajca uspešno obogatili z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (Baucells in sod., 2000), selenom (Bennett in Cheng, 2010; Delezie in sod., 2014), jodom (Opaliński in sod., 2012) vitamini (Leeson in Caston, 2003), karotenoidi (Leeson in Caston, 2004). Zaradi povečane vsebnosti hranil in biološke dostopnosti pa obogatena jajca idealno ustrezajo zahtevam za funkcionalno živilo (Surai in Sparks, 2001; Rajasekaran in Kalaivani, 2013).

### **2.1.3 Obogatitev jajc s karotenoidi**

Barva jajčnega rumenjaka, ki se šteje kot pomemben dejavnik pri določanju sprejemljivosti produkta za potrošnika (Hernandez, 2005; Keser, 2009; Zajec 1995), je odvisna predvsem od krme kokoši, zato je strogo kontrolirana s strani rejca. Potrošnikova izbira intenzitete obarvanosti jajčnega rumenjaka je odvisna od geografske regije, kulture in tradicije (Beardsworth in Hernandez, 2004). Tako imajo Brazilci raje rumeno (intenzivnost barve rumenjaka 9, po Rochejevi barvni lestvici), Hrvati zlato-rumeno (intenzivnost barve rumenjaka 10–12 po Rochejevi barvni lestvici) in Slovenci oranžno-rumeno (intenzivnost barve rumenjaka 14 po Rochejevi barvni lestvici) obarvanost rumenjakov (Sandeski in sod., 2014; Senčić in Butko, 2006; Zajec, 1995). Barva rumenjaka pa ni odvisna le od vsebnosti, ampak tudi od profila karotenoidov. Ugotovljeno je bilo, da je med vsebnostjo celokupnih karotenoidov in barvo nelinearna zveza, saj je bila barva rumenjaka kokoši krmljenih s koncentratom lucerne kljub večji vsebnosti karotenoidov (22,4  $\mu\text{g/g}$

rumenjaka) manj intenzivna, kot barva rumenjakov kokoši krmljenih s paradižnikom v prahu (4,1  $\mu$ g karotenoidov/g rumenjaka) (Karadas in sod., 2006).

Za boljšo obarvanost rumenjaka rejci krmi za nesnice dodajajo naravne ali sintetične ksantofile, saj je barva rumenjaka odvisna tako od ksantofilov naravno prisotnih v krmi, kot tudi od dodanih naravnih in sintetičnih ksantofilov. Krma na osnovi koruze je vir luteina, zeaksantina in v manjših količinah  $\beta$ -kriptoksantina (Nys, 2000). Vendar vsebnost močno variira glede na sorto koruze. Poleg sorte pa na vsebnost karotenoidov v rastlinah vpliva veliko dejavnikov, zato moramo biti pri izbiri primerne rastline, kot vira karotenoidov, pozorni na izbiro primerne različice in sorte, geografske lokacije, letnega časa in klime, agrotehničnih ukrepov ter na zrelost (Maiani in sod., 2009). Kilogram rumene koruze tako vsebuje 7,9–37,1 mg luteina, 1,8–5,0 mg zeaksantina in 0,3–6,5 mg  $\beta$ -kriptoksantina (Weber, 1987; Moros in sod., 2002; Liu in sod., 2012). Liu in sodelavci (2012) so s krmljenjem kokoši samo z rumeno koruzo (7,9 mg luteina/kg, 3,6 mg zeaksantina/kg, 0,7 mg  $\beta$ -kriptoksantina/kg) dobili rumenjaka, ki je v 100 g vseboval 0,9 mg luteina, 0,3 mg zeaksantina in 0,06 mg  $\beta$ -kriptoksantina. Dodatek rumene koruze naj bi celo bolje obarval rumenjaka kot dodatek posušene lucerne (Marusich in Bauernfeind, 1981), ki je bogat vir luteina, v manjših količinah pa sta prisotna tudi zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin (Nys, 2000).

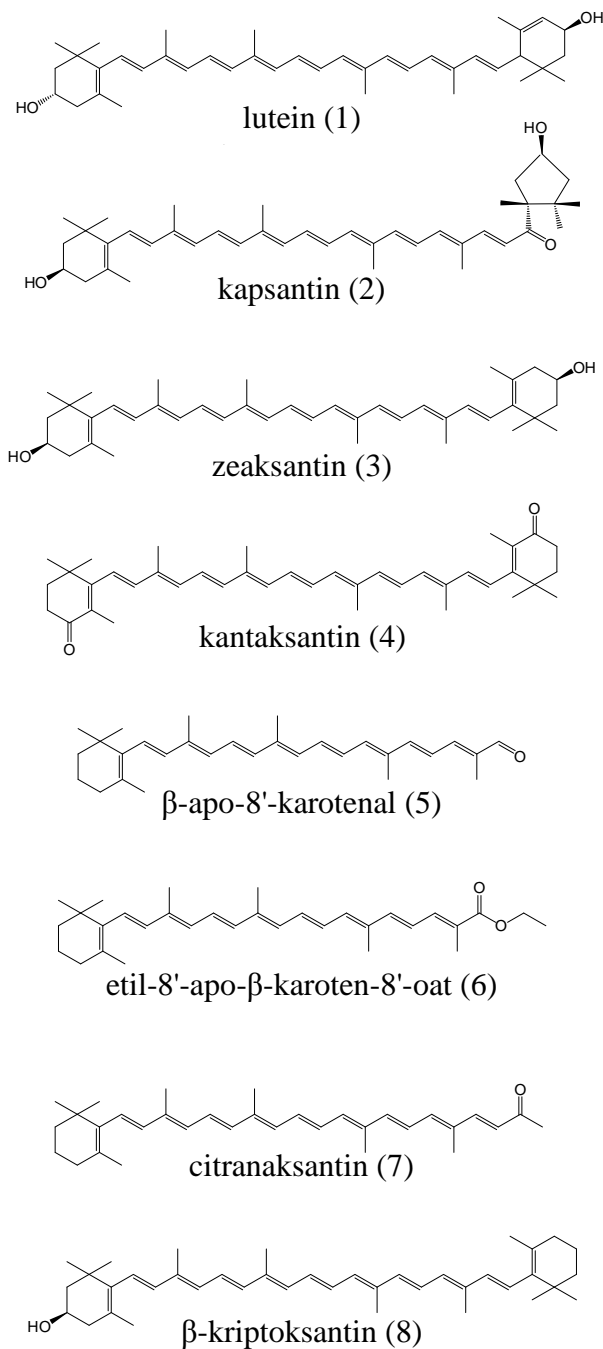
Ker karotenoidi prispevajo tudi k boljšemu zdravju kokoši in piščancev (Surai in Speake, 1998), predstavljajo zaželen in celo nujen del krme. Tipični krmni obrok, ki poleg koruze vsebuje tudi sojo in pšenico, pa ne zagotavlja zadostne vsebnosti karotenoidov, zato se uporabljajo raznovrstni dodatki. Med naravne vire karotenoidov spadajo lucerna – *Medicago sativa* (vir luteina, zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina), rumena žametnica – *Tagetes erecta* L. (vir luteina in zeaksantina) in rdeča paprika – *Capsicum annuum* L. (vir kapsantina, zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina), ki so jih v študijah dodajali kot rastlinske ekstrakte oziroma koncentrate h krmi (Nys, 2000; Lai in sod., 1996; Galobart in sod., 2004; Karadas in sod., 2006; Lokaewmanee in sod., 2011; Santos-Bocanegra in sod., 2004; Niu in sod., 2008). V industriji pa se kot naravni vir karotenoidov uporablja predvsem ekstrakt rumene žametnice in razni komercialni pripravki s sintetičnimi ksantofili (npr. CAROPHYLL® Red, CAROPHYLL® Yellow). Veliko karotenoidov vsebujejo tudi mikroalge (Fredriksson in sod., 2006; Sujatha in Narahari, 2011; Kotrbáček in sod., 2013) in zelene rastline, kot so kopriva (Loetscher in sod., 2013) in vodna kreša (Rathert in sod., 2010), v katerih se nahajata predvsem lutein in zeaksantin. S karotenoidi so bogate tudi nekatere sorte koruze s povečano vsebnostjo  $\beta$ -karotena in  $\beta$ -kriptoksantina (Liu in sod., 2012). Zanimiv vir karotenoidov so tudi razni odpadni produkti industrije, kot so oklepi rakov, ki so bogat vir astaksantina (Pérez-Gálvez in sod., 2008) in pomarančne lupine, ki vsebujejo  $\beta$ -karoten in  $\beta$ -kriptoksantin (Chowdhury in sod., 2008; Hasin in sod., 2006). Med ksantofile, ki niso naravno prisotni v rumenjkih, in se navadno dodajajo kot sintetični pripravki, uvrščamo kantaksantin,  $\beta$ -apo-8'-karotenal, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat in citranaksantin. Sintetični ksantofili se učinkoviteje nalagajo v rumenjaku kot lutein in

zeaksantin (Marusich in Bauernfeind, 1981; Breithaupt, 2007), pripomorejo k boljši obarvanosti rumenjaka (Santos-Bocanegra in sod., 2004) in so bolj stabilni od naravno prisotnih ksantofilov (Wenzel in sod., 2011).

Trenutno se večina jedilnih jajc v svetu priredi z dodajanjem komercialnih zmesi karotenoidov v krmo. V Evropski uniji je dovoljena uporaba osmih ksantofilov (slika 2) kot krmnih dodatkov v prireji jajc. To so: lutein (1, glavni vir rumena žametnica), zeaksantin (3),  $\beta$ -kriptoksantin (8), kapsantin (2, vir rdeča paprika), kantaksantin (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenal (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat (6) in citranaksantin (7) (EFSA, 2009). Zadnji štirje se pridobivajo industrijsko. Največja dovoljena vsebnost dodanih ksantofilov v krmi je 80 mg/kg, kar pa ne velja za kantaksantin, ki ga je zaradi tvorjenja kristalov na človeški očesni mrežnici lahko največ 8 mg/kg krme (Breithaupt, 2007; EFSA, 2009).

Vsebnost ksantofilov v jajcih kokoši, ki ne dobivajo s karotenoidi obogatene krme, se giblje med 0,3 in 0,5 mg na rumenjaka, pri čemer več kot polovica te vsebnosti pripada luteinu in zeaksantinu. Zaradi vpliva s ksantofili obogatene krme se lahko vsebnost ksantofilov v rumenjaku močno poveča. Obogatena krma, ki na kilogram vsebuje 50 mg luteina, poveča njegovo vsebnost v rumenjaku za 5–8 krat (Leeson in Caston, 2004). Lutein in zeaksantin se nalagata v rumenjaka v enaki meri, a ima zeaksantin večjo moč obarvanja (Marusich in Bauernfeind, 1981) zaradi 5 nm višje valovne dolžine absorpcijskega maksimuma v primerjavi z luteinom, kar je razlog za bolj rumeno-oranžno barvo zeaksantina. Izkoristek prenosa zeaksantina v jajčni rumenjaka je sicer slabši kot pri etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oatu, a vendar boljši kot pri  $\beta$ -kriptoksantinu (Marusich in Bauernfeind, 1981). Karunajeewa in Hofmann (1992) sta z dodajanjem 15 mg prostega zeaksantina na kilogram krme dosegla intenzivnost barve rumenjaka nad 10 po Rochejevi barvni lestvici. Te vrednosti ni mogoče oziroma jo je težko preseči z dodajanjem lucerne ali rumene žametnice oziroma njunih ekstraktov (Lokaewmanee in sod., 2011; Chowdhury in sod., 2008; Galobart in sod., 2004), ki so eden izmed najpogostejših dodatkov h krmi perutnine. V eni izmed redkih študij dodajanja  $\beta$ -kriptoksantina h krmi je bilo ugotovljeno, da se  $\beta$ -kriptoksantin, kot edini ksantofil z aktivnostjo provitamina A, bolje nalaga v jajčni rumenjaka kot  $\beta$ -karoten, ki se skoraj ves pretvori v vitamin A in zato nima vpliva na obarvanost rumenjaka (Liu in sod., 2012).

Sposobnost nalaganja zeaksantina iz ekstrakta navadnega volčjega jabolka (*Physalis alkekengi* L.), sta preučevala že Kuhn in Brockmann (1932). Zanimala ju je sposobnost nalaganja zeaksantina v prosti in zaestreni obliki v rumenjaka, saj avtorjema še ni bilo znano, da rastlina vsebuje tudi relativno veliko  $\beta$ -kriptoksantina. Pri tem sta prišla do ugotovitev, da so kokoši same sposobne hidrolizirati estre in tako saponifikacija nima vpliva na količino ksantofilov v rumenjaku. Do podobnih izsledkov so z dodatkom saponificiranega in nesaponificiranega ekstrakta paprike (Lai in sod., 1996; Breithaupt in sod., 2003) in rumene žametnice (Hencken, 1992; Lokaewmanee in sod., 2011; Breithaupt in sod., 2003) prišli tudi drugi. Vendar pa to do danes še ni povsem razjasnjeno, saj so Galobart in sodelavci (2004) prišli do nasprotnih ugotovitev.



Slika 2: Strukturne formule 8 ksantofilov, ki so dovoljeni dodatki h krmi perutnine (Brulc in sod., 2013)

Figure 2: Structural formulas of 8 xanthophylls permitted as poultry fodder additives (Brulc in sod., 2013)

Barva rumenjakov jajc je odvisna tudi od načina reje. V študiji, ki je obravnavala jajca iz vseh štirih načinov reje (baterijska, talna ali hlevska, prosta ali pašna ter ekološko reja) na italijanskem trgu (Hidalgo in sod., 2008), so ugotovili, da se intenzivnost barve rumenjaka

zmanjšuje v naslednjem vrstnem redu baterijska reja > prosta reja > hlevska reja > ekološka reja. Da so rumenjaki jajc iz baterijske reje bolj oranžno obarvani od rumenjakov jajc iz ekološke reje, so ugotovili tudi v drugih študijah (Terčič in sod., 2012; Pajk Žontar in sod., 2010; Bovšková in sod., 2014). V nasprotju z ostalimi pa sta Schlatterer in Breithaupt (2006) ugotovila, da imajo jajca iz ekološke reje, ki se prodajajo v Nemčiji, večjo vsebnost karotenoidov. Jajca iz ekološke reje je mogoče z uporabo karotenoidnega profila in kemometrije celo razlikovati od jajc iz ostalih načinov rej (van Ruth in sod., 2011; van Ruth in sod., 2013). Glavni karotenoid, ki bi bil lahko marker ekoloških jajc, je  $\beta$ -kriptoksantin (Schlatterer in Breithaupt, 2006). Kokoši iz proste reje, ki so bile krmljene z enako krmo, so imele v primerjavi s kokošmi iz hlevske reje intenzivnejše obarvane rumenjake (Campo in sod., 2013; Šekeroğlu in sod., 2008). Dostop kokoši do paše dvakrat poveča vsebnost karotenoidov v rumenjaku (Skřivan in Englmaierová, 2014).

Poleg prehrane in načina reje na vsebnost karotenoidov v jajcu vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so: genetika kokoši, starost in zdravje kokoši, skladiščenje in predelovanje jajc (Schlatterer in Breithaupt, 2006; Wenzel in sod., 2010; Wenzel in sod., 2011).

## 2.2 NAVADNO VOLČJE JABOLKO (*Physalis alkekengi* L.)

### 2.2.1 Morfološke značilnosti in pridelava

Okrasna rastlina navadno volčje jabolko, z latinskim imenom *Physalis alkekengi* L. (slika 3) je predstavnik družine razhudnikovk ali *Solanaceae* (Vreš in sod., 2014). Izvira iz območja zahodne Azije do Japonske, razširjena je po srednji in severni Evropi (Lord, 2003). Je trajnica, ki v Sloveniji raste v gozdovih, na posekah, vetrolomnih jasah in med grmovjem (Vreš in sod., 2014), najdemo pa jo tudi v naših vrtovih. Zraste 30–60 cm visoko iz dolge in plazeče korenike. Stebla so pokončna, olistana z žleznimi trihomi (Lord, 2003). Listi velikosti 5–12 cm so trikotno jajčasti, koničasti (Vreš in sod., 2014; Lord, 2003). Razvijejo rahlo padajoče rumeno-bele cvetove. Jagode, ki jih razvije rastlina pozno poleti, so svetleče oranžno-rdeče barve in jih obdajajo oranžno-rdeče obarvane povečane čaše velikosti 2–5 cm, ki spominjajo na lampijone (Lord, 2003). Nezrele jagode niso užitne, saj vsebujejo zadostne količine solanina, ki lahko povzročijo gastroenteritis in diarejo pri otrocih, rdeče jagode pa so užitne (Quattrocchi, 2012). Povečane čaše navadnega volčjega jabolka pa prav tako niso užitne (Vaughan in Geissler, 2009).



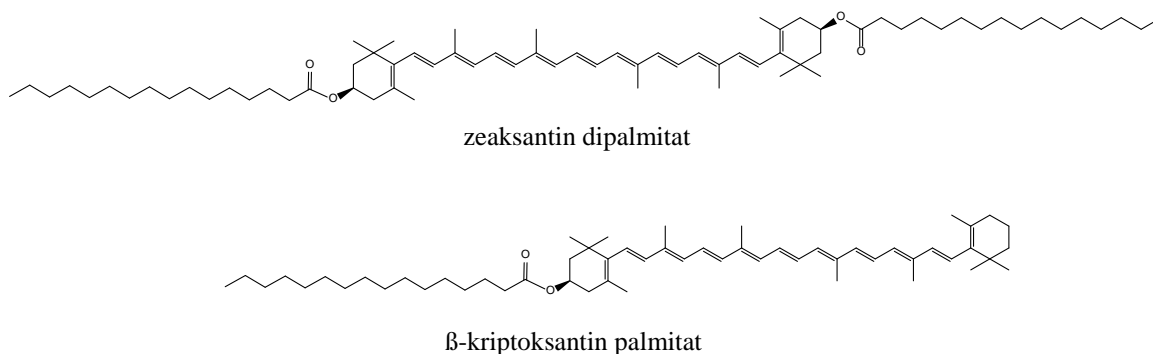
Slika 3: Jagode in povečane čaše navadnega volčjega jabolka – *Physalis alkekengi* L. (Foto: Brulc L.)

Figure 3: Berries and husks of Chinese lantern - *Physalis alkekengi* L. (Photo: Brulc L.)

Jagode navadnega volčjega jabolka vsebujejo veliko citronske kisline, vitamina C, sladkorjev (Dornberger, 1986; Shekar-Foroosh in sod., 2012) ter nekaj karotenoidov (Weller in Breithaupt, 2003) in steroidov, ki jih imenujemo fizalini (Huang in sod., 2014). Povečane čaše pa vsebujejo predvsem veliko karotenoidov (Pintea in sod., 2005) in fizalinov. Pred kratkim so v povečanih čašah odkril kar 46 različnih fizalinov (Huang in sod., 2014), ki jim pripisujejo antibakterijske (Li in sod., 2012; Li in sod., 2013), antiglivične (Torabzadeh in Panahi, 2011), antitumorske (Li in sod., 2014), protivnetne (Ji in sod., 2011) in antimalarijske lastnosti (Sa in sod., 2012), kot tudi kontracepcijske lastnosti (Javdan in Estakhir, 2011; Montaserti in sod., 2007). Jagode se med drugim lahko uporablja kot antipiretike, za zdravljenje revmatizma in boleznih sečil (Quattrocchi, 2012).

### 2.2.2 Karotenoidi v navadnem volčjem jabolku

Vsebnost karotenoidov v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka (*Physalis alkekengi* L.) je zelo velika, največ prav v povečanih čašah. Med njimi sta glavna predstavnika zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin, ki sta zaestrena predvsem s palmitinsko (90 %), v manjši količini pa z miristinsko kislino, le 1 % karotenoidov pa je prisotnih v prosti obliki (Weller in Breithaupt, 2003; Pintea in sod., 2005; Deineka in sod., 2008). Slika 4 prikazuje strukturni formuli dveh najpogostejših predstavnikov zaestrenih karotenoidov v navadnem volčjem jabolku, zeaksantin dipalmitata in  $\beta$ -kriptoksantin palmitata. Weller in Breithaupt (2003) navajata skupno vsebnost zeaksantina 0,55 mg v gramu svežih povečanih čaš ter 0,06 mg v gramu svežih jagod, določeno s pomočjo HPLC, Pintea in sodelavci (2005) pa so s spektrofotometrijo in HPLC določili v nesaponificiranih ekstraktih posušenih povečanih čaš veliko večjo koncentracijo karotenoidov (15,45 mg/g posušenih povečanih čaš, od tega 9,02 mg zeaksantina/g in 3,92 mg  $\beta$ -kriptoksantina/g). Deineka in sodelavci (2008) pa so s spektrofotometrijo določili 20,2 mg celokupnih karotenoidov v gramu posušenih povečanih čaš.



Slika 4: Struktura dveh najpomembnejših estrov v navadnem volčjem jabolku

Figure 4: The structure of the two most important esters in Chinese lantern

### 2.2.3 Ostali sekundarni metaboliti v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka

Poleg karotenoidov (glej podpoglavje 2.2.1) in fizalinov (glej podpoglavje 2.2.2) so v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka (*Physalis alkekengi* L.) prisotni še številni drugi sekundarni metaboliti, med njimi alkaloidi in flavonoidi.

Alkaloidi so predvsem v koreninah (Asano in sod., 1995; Asano in sod., 1996; Basey in sod., 1992; Basey in Woolley, 1973), medtem ko je malo znanega o alkaloidih iz jagod in povečanih čaš. V jagodah je do danes znana le vsebnost alkaloida solanina (Butnaru in sod., 2011), ki je značilen alkaloid rastlin družine razhudnikovk (*Solanaceae*). V povečanih čašah pa so odkrili dva alkaloida *N-E*-feruloiltiramin in *N-p*-koumaroiltiramin (Chen in sod., 2014).

V povečanih čašah so odkrili tudi devet flavonoidov in sicer ombulin, luteolin, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, luteolin-4'-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, kvercetin-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, kvercetin-3,7-di-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, luteolin-7,3'-di-O- $\beta$ -D-glukopiranozid, luteolin-7,4'-di-O- $\beta$ -D-glukopiranozid in miricetin-3-O-neohesperidozid (Qiu in sod., 2008). Flavonoidi v jagodah zaenkrat še niso raziskani.

Najmanj je znanega o triterpenoidih v navadnem volčjem jabolku, saj so na voljo le podatki o triterpenoidih iz semen (Itoh in sod., 1977).

## 2.3 BIOSINTEZA, METABOLIZEM IN BIOLOŠKA DOSTOPNOST KSANTOFILOV

### 2.3.1 Zgradba in biosinteza

Karotenoidi, ki jih najdemo v tkivih sesalcev, izhajajo izključno iz prehrane, sintetizirajo pa jih le rastline, alge in bakterije. Ker jih višje živali niso sposobne sintetizirati *de novo*, imajo zato izdelanih več funkcij preoblikovanja in transporta.

Karotenoidi so zelo velika skupina spojin, od katerih jih poznamo le okoli 600 (Britton in sod., 2004). Uvrščamo jih med tetra-terpene (40 atomov ogljika), ker so sestavljeni iz osmih izoprenoidnih enot. Delimo jih v dve skupini in sicer na karotene in ksantofile. Ksantofili so sestavljeni iz dolge polienske verige in na vsaki strani imajo lahko obroč. Na molekulo je vezan kisikov atom v obliki funkcionalnih skupin, zaradi katerega so ksantofili bolj polarni od karotenov, ki so izključno ogljikovodiki.

Znana je biosinteza najbolj pogostih karotenoidov, ki se začne s stopenjsko kondenzacijo treh molekul acetil-CoA, katerega produkt je  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilglutaril-koencim A, kateri se s pomočjo nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) reducira v mevalonsko kislino. Ta intermediat se nato fosforilira, dekarboksilira pri čemer nastane ogljikov dioksid in dehidrira v isopropil pirofosfat. Ta osnovni gradnik terpenskih sistemov v kloroplastih in kromoplastih nastane preko metileritrol fosfatne poti (Taiz in Zeigler, 2006). Isopropil difosfat s svojim izomerom dimetilalil difosfatom reagira v geranil difosfat (10 atomov ogljika). Na to molekulo se postopno vežeta še dva isopropil difosfata in nastane geranilgeranil pirofosfat (20 atomov ogljika). Biosinteza poteka od tu le v kloroplastih ali kromoplastih, kjer se geranilgeranil pirofosfat s pomočjo fitoen sintaze, ki za svoje delovanje potrebuje  $Mn^{2+}$  ali  $Mg^{2+}$ , pretvori preko vmesnega produkta prefitoen pirofosfata v 15-Z-fitoen (Humphrey in Beale, 2006). Z dehidrogenacijo nastane *all-E*-likopen. Od likopena pa do sinteze posameznih karotenoidov sledi ciklizacija na obeh koncih verige konjugiranih ogljikovih vezi, ki poteka po dveh poteh, asimetrično (sinteza  $\alpha$ -karotena vse do luteina) ali simetrično (Humphrey in Beale, 2006). Po slednji preko  $\beta$ -karotena z dvostopenjsko oksidacijo nastaneta  $\beta$ -kriptoksantin in zeaksantin. Večina karotenoidov se v naravi nahaja v *all-E* obliki (Bhat in sod., 2005). Če vsebujejo  $\beta$ -obroč, kot ga vsebuje  $\beta$ -kriptoksantin, pa jih uvrščamo med provitamine A.

### 2.3.2 Metabolizem

Čeprav je o absorpciji karotenoidov v človeškem telesu malo znanega (slika 5), velja, da poteka po poti maščobnih kislin (Canene-Adams in Erdman Jr, 2009). Karotenoidi, ki se sprostitjo iz hrane, skupaj z lipidi, tvorijo v želodcu lipidne kapljice. Po prehodu v dvanajstnik žolčne soli zmanjšajo premer micel in jih stabilizirajo, obenem pa lipaze trebušne slinavke hidrolizirajo zaestrene karotenoide (Fernández-García in sod., 2012).

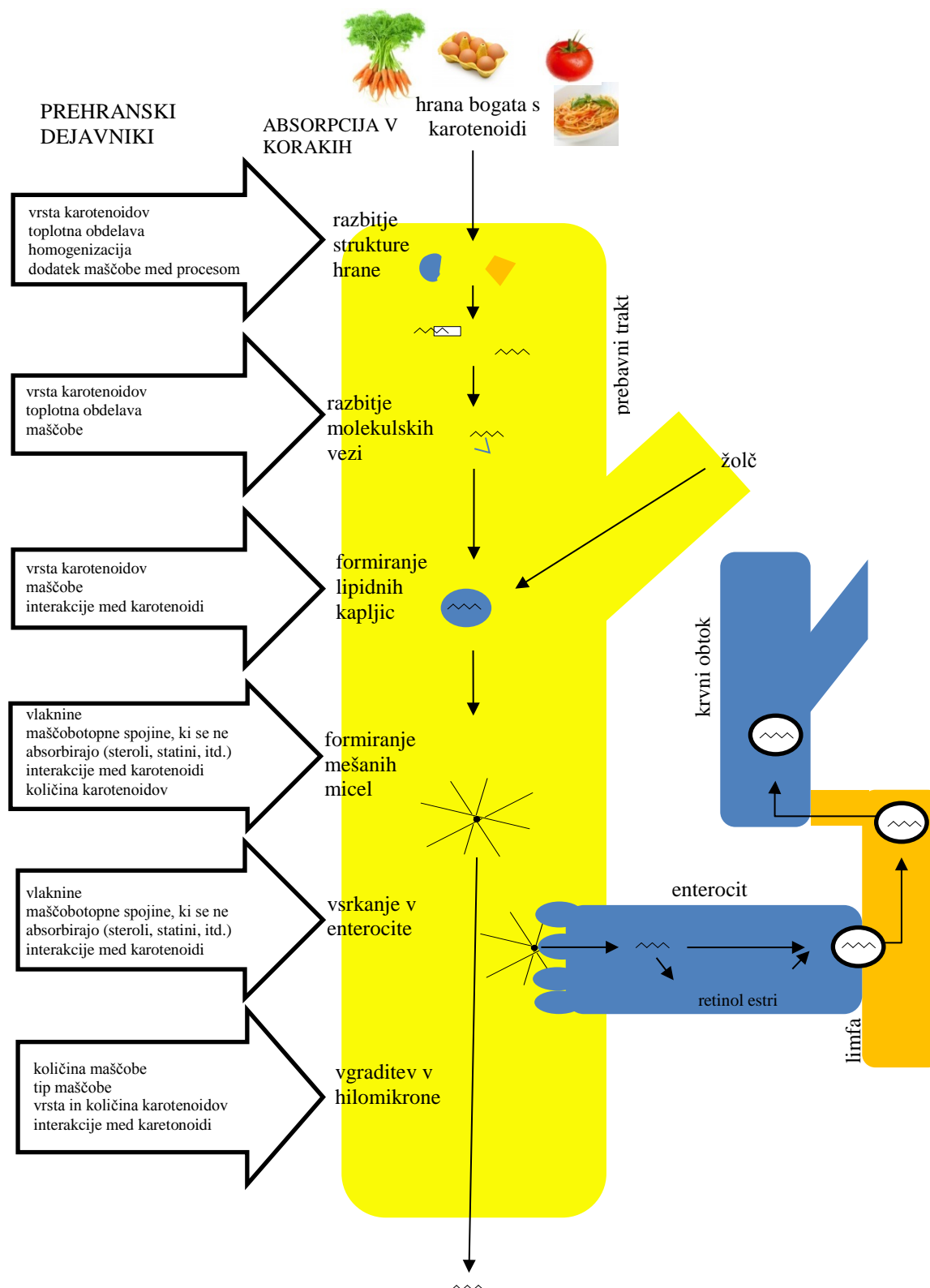


Zaradi polarne narave ksantofilov so ti locirani blizu površine, karoteni pa v notranjosti lipidnih kapljic (Borel in sod., 1996). Do odkritja SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) in CD36 (Cluster Determinant 36) proteinov, ki bi lahko odigrali ključno vlogo pri transportu karotenoidov, je veljalo prepričanje, da mešane micele prestopijo membrano enterocitov preko pasivne difuzije (Canene-Adams in Erdman Jr, 2009). V Golgijevem aparatu enterocitov karotenoidi in lipidi tvorijo hilomikrone, ki se nato izločijo v krvni obtok preko limfnega sistema, ker jih razgradi lipoproteinska lipaza. Sproščene karotenoide absorbirajo endoteljske celice v tkiva, ostanke pa absorbirajo hepatociti, kjer so karotenoidi shranjeni ali ponovno poslani v cirkulacijo v lipoproteinih zelo nizke gostote (VLDL – Very Low Density Lipoproteins), ki so nato transformirani v lipoproteine nizke gostote (LDL – Low Density Lipoproteins) in na koncu v lipoproteine visoke gostote (HDL – High Density Lipoproteins). Ti lipoproteinski delci pa ne prenašajo karotenoidov v enakem deležu po krvi. LDL prenaša okoli 55 % karotenoidov, HDL 22 % in VLDL 10–19 % (Clevence in Bieri, 1993). Za bolj polarne karotenoide (ksantofili) je glavni transporter HDL, za nepolarne (karotene) pa LDL. Tako se 52 % luteina in 44 % zeaksantina prenese preko HDL, 55 %  $\beta$ -karotena pa se prenese preko LDL (Wang in sod., 2007),  $\beta$ -kriptoksantin pa prenašata skoraj enakovredno tako HDL kot LDL (Clevence in Bieri, 1993).

Zelo malo je znanega o mehanizmih tkivne absorpcije karotenoidov, saj vsako tkivo drugače absorbira karotenoide (Rao A.V. in Rao L.G., 2007). Z uživanjem hrane, bogate s karotenoidi, se poveča njihova koncentracija v krvi, humanem mleku, adipoznem tkivu, koži in očeh (Donovan in sod., 2006).

### **2.3.3 Biološka razpoložljivost in dostopnost**

Biološka dostopnost karotenoidov je definirana kot odstotek zaužitih karotenoidov, ki so jih črevesni enterociti posrkali in transportirali v krvni obtok (Canene-Adams in Erdman Jr, 2009), medtem ko je biološka razpoložljivost (prenos karotenoidov iz hrane do micel) definirana kot količina zaužitih karotenoidov, ki je na voljo prebavnemu traktu za absorpcijo (O'Connel in sod., 2007). Na biološko dostopnost vplivajo številni dejavniki, med katerimi so najpomembnejši (Canene Adams in Erdman Jr, 2009): strukturne lastnosti hrane in predelava, kemijska struktura karotenoidov, ostali dejavniki (maščobe, vlaknine, interakcija s statini/steroli in interakcije med karotenoidi), človeški dejavnik (infekcije, starost, dovzetnost/nedovzetnost za absorpcijo karotenoidov). Biološka razpoložljivost je odvisna predvsem od načina obdelave hrane, strukturnih lastnosti hrane in količine zaužitih maščob (Fernández-García in sod., 2012). Slika 5 prikazuje vpliv prehranskih dejavnikov na absorpcijo karotenoidov.



Slika 5: Stopnje v absorpciji karotenoidov in prehranski dejavniki, ki vplivajo na absorpcijo (van het Hof in sod., 2000)

Figure 5: Steps in carotenoid absorption and dietary factors that effects absorption (van het Hof et al., 2000)

O'Connell in sodelavci (2007) so prišli do ugotovitev, da imajo ksantofili iz sadja večji potencial za črevesno absorpcijo kot ksantofili iz zelenjave, saj je bil zeaksantin iz pomaranče in rdečega grozdja 100 % dostopen za absorpcijo, tisti iz rdeče paprike pa le 77 %. Podoben trend so opazili tudi pri  $\beta$ -kriptoksantinu, ki ga je v rdeči papriki na voljo za absorpcijo le 29 %, v rdečem grozdju 100 %, v pomaranči pa 97 %. Razlog za to naj bi bila vsebnost prehranske vlaknine ali pa dejstvo, da se karotenoidi v sadju nahajajo raztopljeni v oljnih kapljicah, v nasprotju z listnato zelenjavo, kjer so vezani s proteini in vlaknino (O'Connell in sod., 2007). Inhibitorne lastnosti strukture hrane se lahko zmanjša s primerno toplotno obdelavo (blanširanje, pasterizacija, kuhanje, nizkotemperaturno sušenje), ki razbije rastlinske celice ali pa s procesi, ki zmanjšajo velikost delcev hrane (Maiani in sod., 2009). Biološka dostopnost ksantofilov iz zelenjave naj bi bila do petkrat boljše od dostopnosti karotenov (van het Hof in sod., 1999). Mnogi ugotavljajo tudi, da je biološka dostopnost ksantofilov boljše iz jajc kot iz špinače ali prehranskih dodatkov (Chung in sod., 2004; Handelman in sod., 1999; Surai in sod., 2000; Kelly in sod., 2014). Serumski zeaksantin se lahko z zaužitjem enega (navadnega) jajca poveča za 114–142 % (Handelman in sod., 1999), z zaužitjem z zeaksantinom obogatenega jajca pa celo do 430 % (Kelly in sod., 2014). Absorpcija zeaksantina pri ljudeh, ki uživajo statine, pa je z zaužitjem dveh jajc na dan le 36 % (Vishwanathan in sod., 2009).

Glede na kemijsko strukturo se v mešane micelle raje vgradijo ksantofili kot karoteni, saj so bolj polarni od karotenov in se tako nahajajo na površini micel (Kean in sod., 2008; Thakkar in Failla, 2008). Iz kaše bele koruze se v micelle vgradi 27,7 %  $\beta$ -kriptoksantina ter 27,9 % zeaksantina,  $\beta$ -karotena pa le 16,7 % (Thakkar in Failla, 2008). Za učinkovit prenos  $\beta$ -karotena (0,4–1,5 mg) v mešane micelle je potrebno zaužiti le 3–5 g maščobe (Jalal in sod., 1998). Zaestreni ksantofili se ravno tako učinkovito absorbirajo v enterocite kot prosti ksantofili (Bowen in sod., 2002), saj imamo ljudje zelo učinkovit sistem hidrolize za ksantofilne estre in zato ne predstavljajo ovir pri absorpciji (Chung in sod., 2004). Med karotenoidi, ki niso provitamini A (lutein, zeaksantin) in tistimi, ki to so ( $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin) ni nobenih znanih interakcij, ki bi vplivale na absorpcijo (Thakkar in Failla, 2008).

Na biološko dostopnost vplivajo v veliki meri tudi genski dejavniki, saj se ljudje delimo (kot pri absorpciji holesterola) na tiste, ki so dovzetni za spremembe koncentracije karotenoidov v prehrani in na tiste, ki niso dovzetni (Hammond in sod., 1997). Poleg genetike imajo vpliv tudi starost in infekcije (Canene Adams in Erdman Jr, 2009).

## 2.4 KSANTOFILI V VSAKODNEVNI PREHRANI

### 2.4.1 Količina dnevno zaužitih ksantofilov

Karotenoidov kljub znanim koristnim učinkom ne štejemo med esencialne spojine, saj za njih še ni predpisanih dnevni referenčni vrednosti, z izjemo  $\beta$ -karotena kot provitamina A (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004). Referenčna dnevna vrednost karotenoidov ni postavljena zato, ker so pozitivni učinki na zdravje lahko odvisni od drugih sestavin, ki se zaužijejo skupaj s karotenoidi (Fernández-García in sod., 2012). Določen pa je sprejemljivi dnevni vnos (ADI – Acceptable Daily Intake) sintetičnega zeaksantina, ki je do 2 mg na kilogram telesne mase (FAO/WHO, 2004), kar znaša za povprečnega 70 kg človeka do 140 mg zeaksantina na dan. V Franciji, Španiji, Republiki Irski, Veliki Britaniji in na Nizozemskem dnevno zaužijejo med 9,5 mg (v Španiji) do 16,1 mg (v Franciji) karotenoidov (O'Neill in sod., 2001). Doprinos luteina, zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina k celokupni vsebnosti zaužitih karotenoidov je manjši v severnih državah v primerjavi z južnimi (Olmedilla in sod., 2001). V Švici z uživanjem zelenjave dnevno zaužijejo 7,3 mg karotenoidov, od tega 3,3 mg  $\beta$ -karotena, 2,2 mg likopena, 1,8 mg luteina 0,05 mg zeaksantina in 0,02 mg  $\beta$ -kriptoksantina (Reif in sod., 2013). Ker se karotenoidi pretežno nahajajo v sadju in zelenjavi, je njihova prisotnost v krvi marker zdrave prehrane (Handelman, 2001).

### 2.4.2 Vloga zeaksantina in $\beta$ -kriptoksantina v prehrani

Karotenoide prištevamo med pomembna mikrohranila z antioksidativnim potencialom, ki ščitijo človeško telo pred reaktivnimi kisikovimi spojinami in posledično oksidacijsko poškodbo biomolekul, s tem pa zmanjšajo možnost za nastanek degenerativnih bolezni, kot so rak, srčno-žilne, očesne in kožne bolezni (Tapiero in sod., 2004). Poleg antioksidativnega delovanja nekateri karotenoidi prispevajo k vnosu vitamina A.

Zeaksantin ima skupaj z luteinom pomembno vlogo predvsem pri zaščiti kože in oči pred fotooksidacijo (Roberts in sod., 2009). Vloga luteina in zeaksantina v očesni mrežnici je predmet številnih študij (Moeller in sod., 2008; Seddon in sod., 1994; Chew in sod., 2013; Huang in sod., 2008; Delcourt in sod., 2006). Obema spojinama pripisujejo predvsem zmanjšanje pogostosti nastanka sive mreže in starostne degeneracije makule z dnevnim zaužitjem več kot 20 mg luteina in zeaksantina v daljšem obdobju (> 6 mesecev) (Schalch in sod., 2010). Največ zeaksantina se nahaja v očesu in sicer v rumeni pegi (22 ng), kjer ga je dvakrat več kot luteina (Schalch in sod., 2009). Sajilata in sod. (2008) navajajo, da ima zeaksantin med drugim tudi inhibitoren učinek na oksidacijo LDL ter antikancerogeni učinek. García-Casal (2006) pa v petnajstdnevni študiji ugotavlja, da se z dnevnim uživanjem 1,8 mg zeaksantina ali 1,8 mg luteina ali 3,6 mg likopena izboljša tudi absorpcija železa.

Poleg  $\alpha$ - in  $\beta$ - karotena je  $\beta$ -kriptoksantin eden glavnih prekurzorjev vitamina A, za katerega je znano, da njegovo pomanjkanje povzroči nočno slepoto. Beta-kriptoksantin povezujejo med drugim tudi z zmanjšanjem možnosti nastanka pljučnega raka (Min K.B. in Min J.Y., 2014; Yuan in sod., 2003), srčno-žilnih bolezni (Ford in Giles, 2000), vnetnih bolezni (Pattison in sod., 2005), hiperglikemije (Sugiura in sod., 2006), osteoporoze (Yamaguchi in sod., 2004; Yamaguchi in sod., 2006; Yamaguchi, 2008). Kljub temu, da za nastanek 1  $\mu$ g retinola (vitamin A) potrebujemo enkrat več  $\beta$ -kriptoksantina (24  $\mu$ g) kot  $\beta$ -karotena (12  $\mu$ g) iz hrane (Fernández-García, 2012), pa je bilo ugotovljeno, da se  $\beta$ -kriptoksantin enako ali celo bolje pretvori v retinol kot  $\beta$ -karoten (Davis in sod., 2008).

### 2.4.3 Viri zeaksantina in $\beta$ -kriptoksantina

Zeaksantin lahko najdemo predvsem v rumeno-oranžnem sadju in zelenjavi. Najbogatejši vir zeaksantina so goji jagode, saj vsebujejo kar 82 mg zeaksantina v 100 g suhih jagod (Weller in Breithaupt, 2003). Bogat vir (nad 2 mg/100 g) sta tudi rumena ter rdeča paprika, nekoliko slabši vir (0,1–0,5 mg/100 g) pa sta koruza in buča (Britton in Khachik, 2009). Rumenjak lahko vsebuje tudi veliko zeaksantina, še posebno jajce obogateno z zeaksantinom, ki ga lahko vsebuje tudi 0,5 mg na rumenjak (Kelly in sod., 2014). Dober vir zeaksantina za človeka so tudi spirulina (Yu in sod., 2012) in druge alge (Sajilata in sod., 2008).

Veliko (0,1–2 mg/100 g)  $\beta$ -kriptoksantina se nahaja v tangerinah (križanec med mandarino in pomarančo), bučah, rumeni in rdeči papriki, papaji (Britton in Khachik, 2009), v manjših količinah (61–82  $\mu$ g/100 g rumenjaka) pa je prisoten v jajcih ekološke reje (Schlatterer in Breithaupt, 2006). V Franciji, Španiji, Republiki Irski, Veliki Britaniji in na Nizozemskem največ  $\beta$ -kriptoksantina (> 70 %) zaužijejo s tangerinami in pomarančami ter pomarančnimi sokovi, ki pa jih zaužijejo več pozimi kot poleti (O'Neill in sod., 2001).

## 2.5 DOLOČANJE KSANTOFILOV V RUMENJAKU

### 2.5.1 Določanje barve rumenjaka

Najbolj pogost subjektivni način merjenja barve rumenjaka je s pomočjo Rochejeve barvne pahljače, pri kateri ocenimo barvo po Rochejevi barvni lestvici (slika 6) s skalo 1–15 (Rathert in sod., 2010; Karunajeewa in Hofman., 1992; Galobart in sod., 2004). Kot objektivni način merjenja pa se uporabljata kolorimetra (Loetscher in sod., 2013; Niu in sod., 2008; Santos-Bocanegra in sod., 2004; Lokaewmanee in sod., 2011; Sandeski in sod., 2014; Kljak in sod., 2012, Na in sod., 2004; Chowdhury in sod., 2008), prvi nam podaja barvo v treh koordinatah ( $L^*$  – svetlo/temno,  $b^*$  – modro/rumeno,  $a^*$  – zeleno/rdeče) drugi pa podaja barvo rumenjaka po Rochejevi barvni lestvici (Holcman in sod., 1997; Terčič in

sod., 2012). Uporaba kolorimetra omogoča pridobivanje bolj ponovljivih rezultatov (Nys, 2000).



Slika 6: Rochejeva barvna pahljača (Foto: Brulc L.)

Figure 6: Roche yolk colour fan (Photo: Brulc L.)

### 2.5.2 Priprava testnih raztopin

Pri pripravi testnih raztopin rumenjakov uporabljajo enofazno (Wenzel in sod., 2011; Fredriksson in sod., 2006; Pérez-Gálvez in sod., 2008) ali dvofazno ekstrakcijo (Surai in Speake, 1998; Schlatterer in Breithaupt, 2006; Handelman in sod., 1999) ter eno- ali dvo-fazno ekstrakcijo z odstranjevanjem maščob s pomočjo ekstrakcije na trdnem nosilcu (Solid-phase extraction-SPE) na CN koloni (Furusawa, 2011) ali koloni polnjeni s silikagelom (Lai in sod., 1996). Ker je v rumenjaku okoli 10 % zaestrenih karotenoidov (Handelman in sod., 1999), se pri pripravi testnih raztopin uporablja tudi saponifikacija vzorca (Hammershøj in sod., 2010), čeprav naj se ta zaradi možnih izgub ne bi uporabljala, še posebno ne ob prisotnosti acetona (Britton in sod., 2004). Za ekstrakcijo se uporablja vrsta organskih topil in njihovih mešanic, pri enofazni ekstrakciji predvsem aceton (Pérez-Gálvez in sod., 2008; Fredriksson in sod., 2006; Leeson in Caston, 2004; Furusawa 2011; Brulc in sod., 2013) ter metanol in metanol:TBME (Wenzel in sod., 2011), pri dvofazni pa *n*-heksan (Surai in sod., 1996; Surai in Speake, 1998; van Ruth in sod., 2011; Karadas in sod., 2006; Blount in sod., 2002) in različne mešanice topil, kot so *n*-heksan:dietileter (Handelman in sod., 1999), petroleter:etilacetat:metanol (Schlatterer in Breithaupt, 2006), heptan:THF (Hammershøj in sod., 2010), metanol:kloroform (Lai in sod., 1996), *n*-heksan:aceton:toluen:etanol (Schaeffer in sod., 1988). Pred HPLC analizo se v večini primerov testne raztopine centrifugira in/ali filtrira skozi 0,45  $\mu$ m membranski filter (Fredriksson in sod., 2006; van Ruth in sod., 2011; Furusawa, 2011; Pérez-Gálvez in sod.,

2008; Wenzel in sod., 2011; Brulc in sod., 2013), da se odstrani majhne delce, ki lahko povzročajo probleme pri HPLC analizi.

Zaradi neobstoynosti karotenoidov je potrebno posebno pazljivost nameniti njihovi zaščiti. Zato morata priprava testnih raztopin in kromatografska ločba potekati v zatemnjenem prostoru stran od direktnega vira svetlobe ter pri čim nižji temperaturi (Liaaen-Jensen in Frode Lutnaes, 2008).

### **2.5.3 Separacija, detekcija in kvantitativna določitev ksantofilov**

#### **2.5.3.1 Spektrofotometrično določanje vsebnosti karotenoidov v jajčnem rumenjaku**

Vsebnost celokupnih karotenoidov v hrani se je v preteklosti določala predvsem spektrofotometrično z merjenjem totalne absorpcije testne raztopine pri specifični valovni dolžini (običajno 436 nm) z uporabo  $\beta$ -karotena kot standarda (AOAC Official Method 975.23). Kasneje so spektrofotometrični analizi dodali še kolonsko kromatografijo, ki je omogočala ločbo karotenov od ksantofilov, pri čemer so za ločbo uporabljali petroleter. Karotene pa so iz kolone sprali s pomočjo mešanice petroleter:aceton (9:1, v/v). To standardizirano AOAC (AOAC International) metodo uporablja za določanje vsebnosti celokupnih karotenoidov še vedno veliko avtorjev (Niu in sod., 2008; Galobart in sod., 2004; Sujatha in Narahari, 2011; Chowdhury in sod., 2008). Trenutno pa je HPLC glavna analitska tehnika v analitiki karotenoidov.

#### **2.5.3.2 Določanje vsebnosti karotenoidov s tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti**

Razvoj HPLC metod za kvalitativno in kvantitativno določanje karotenoidov se je začel na kolonah polnjenih z normalno fazo (NP – Normal Phase), kasneje z razvojem reverznofazne kromatografije pa predvsem na reverzni fazi (RP – Reversed Phase) C<sub>18</sub>. Tako sta bila lutein in zeaksantin prvič delno ločena na stacionarni fazi C<sub>18</sub> leta 1990 (Matus in Ohmacht, 1990), čeprav sta bila na normalno fazni koloni »Radial-PAK A cartridge« ločena že prej (Schaeffer in sod., 1988). Ker so se polarni karotenoidi dobro ločili na RP C<sub>18</sub>, izomere nepolarnih karotenoidov pa ne, so leta 1994 Sander in sodelavci razvili novo stacionarno fazo RP C<sub>30</sub>, ki so jo imenovali tudi »karotenoidna faza«. Ta je omogočala ločbo ksantofilov in imela obenem dovolj dobro retencijo, ki je omogočala ločbo polarnih karotenoidov. Razvoj tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti (UHPLC – Ultra-High Performance Liquid Chromatography) ni nadomestil HPLC predvsem zaradi pomanjkanja stacionarnih faz v UHPLC kolonah, primernih za ločbo karotenoidov (Bijttebier in sod., 2014). Nove možnosti so se pokazale s komercializacijo kolon nove generacije z delno poroznimi delci imenovane tudi »core-shell« ali »fused core« leta 2007 in konec leta 2013 tudi vpeljava kolon nove generacije z RP C<sub>30</sub> stacionarno fazo (Fekete in sod., 2014). Nove možnosti za ločbo karotenoidov so se

pokazale z razvojem dvodimenzionalne tekočinske kromatografije (LC  $\times$  LC) s kombinacijo normalne faze v prvi dimenziji in reverzne fazne v drugi dimenziji (NP-LC  $\times$  RP-LC), ki omogoča ločbo velikega števila karotenoidov in njihovih izomer (Cacciola in sod., 2012).

Kromatografsko določanje karotenoidov v rumenjaku poteka najpogosteje na koloni z reverzno fazo C<sub>18</sub> ali C<sub>30</sub> z gradientno elucijo (preglednica 2), čeprav obstaja tudi nekaj metod z uporabo izokratske elucije štirih *all-E*-ksantofilov, ki so prisotni v rumenjaku (Surai in Speake, 1998; Wenzel in sod. 2011). Izmed kolon C<sub>18</sub> so za ločbo karotenoidov najprimernejše polimerne kolone, saj so bolj selektivne od monomernih (Sander in sod., 1994). Poleg tega pa je za ločbo ksantofilov pomembna tudi prisotnost prostih silanolnih skupin, saj omogočajo dobro ločbo polarnih karotenoidov tudi na C<sub>18</sub> koloni (Sander in sod., 1994; Matus in Omaht, 1990).

V preglednici 2 so navedene HPLC RP metode, ki so bile uporabljene za določanje karotenoidov v rumenjaku. Kot je razvidno iz preglednice, se za separacijo uporabljajo različne mešanice topil z velikim deležem organskih topil. Čas ene separacije, če analiziramo več kot eno spojino, se giblje med 25 in 100 min, detekcija pa poteka najbolj pogosto pri 450 nm (preglednica 2). Med približno 70 različnimi HPLC-MS metodami za določanje in/ali identifikacijo karotenoidov v različnih vzorcih (Řezanka in sod., 2009) samo pri eni poročajo o kvalitativnem in kvantitativnem določanju karotenoidov v rumenjaku (Schlatterer in Breithaupt, 2006). Kljub nedavnim prispevkom doseženih s pomočjo HPLC-(APCI)MS (Wenzel in sod., 2011; Nimalaratne in sod., 2012) analiza geometrijskih izomerov in karotenoidnih presnovkov v rumenjaku še vedno ni v celoti opisana.



Preglednica 2: HPLC metode za analizo karotenoidov v rumenjaku

Table 2: HPLC methods for carotenoids analysis in egg yolk

<b>spojina</b>	<b>kolona</b>	<b>metoda</b>	<b>referenca</b>
kantaksantin	C <sub>8</sub> (125 × 4 mm, velikost delcev 5 μm) + predkolona C <sub>8</sub> (4 × 4 mm)	mobilna faza: acetonitril/voda (9:1, v/v) izokratska elucija pretok: 1 mL/min; T kolone: 45 °C, detekcija: 470 nm; čas: 4 min	Furusawa, 2011
lutein, zeaksantin, $\beta$ -karoten, likopen, $\beta$ -kriptoksantin	C <sub>18</sub> (300 × 4,6 mm, velikost delcev 3 μm)	mobilna faza: A) acetonitril/metanol/amonijev acetat (81:19:0,04; v/v/w) B) izopropanol; gradientna elucija pretok: 1 mL/min; T kolone: 16,4 °C	Handelman in sod., 1999; Liu in sod., 2012
lutein, kantaksantin, citraksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'- oat	C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm, velikost delcev 5 μm)	mobilna faza: acetonitril/diklorometan/metanol (7:2:1, v/v/v) izokratska elucija pretok: 1,5 mL/min; detekcija: 445 nm	Surai in Speake, 1998
lutein, astaksantin, kantaksantin	C <sub>18</sub> (250 × 4,0 mm, velikost delcev 5 μm)	mobilna faza: A) metanol/voda/etil-acetat (82:8:10, v/v/v); B) metanol/voda/etil-acetat (29:1:70, v/v/v) gradientna elucija detekcija: 474 nm	Fredriksson in sod., 2006
lutein, Z-lutein, zeaksantin, $\beta$ -kriptoksantin, likopen, Z-likopen, $\beta$ -karoten	C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm; velikost delcev 3 μm)	mobilna faza: acetonitril/diklorometan/metanol (7:2:1, v/v/v) izokratska elucija detekcija: 442 nm	Surai in sod., 1996; Karadas in sod., 2006
lutein, zeaksantin, $\beta$ -karoten	C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm)	mobilna faza: A) acetonitril:metanol (9:1, v/v), z 1 % amonijevega acetata B) izopropanol gradientna elucija pretok: 1 mL/min; detekcija: 452 nm; čas: 46 min	Wenzel in sod., 2006
lutein, zeaksantin, Z- zeaksantin, kantaksantin, astaksantin	C <sub>18</sub> (250 × 4 mm) + predkolona C <sub>18</sub>	mobilna faza: A) metanol/acetonitril/izopropanol (49:49:2, v/v/v) B) voda gradientna elucija, detekcija: 450 nm; čas: 20 min	Pérez-Gálvez in sod., 2008

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 2: HPLC metode za analizo karotenoidov v rumenjaku

spojina	kolona	metoda	referenca
lutein, zeaksantin, $\alpha$ -kriptoksantin, $\beta$ -kriptoksantin, likopen ( <i>all-E</i> , 5/9- <i>Z</i> , 13- <i>Z</i> in 15- <i>Z</i> ), $\alpha$ -karoten in $\beta$ -karoten ( <i>all-E</i> , 9- <i>Z</i> , 13/15- <i>Z</i> ), 13/15- <i>Z</i> -lutein, 13/15- <i>Z</i> -zeaksantin, anhidrolutein I and II, $\gamma$ -karoten, $\xi$ -karoten, neurosporen, fitofluen, fitoen, estri luteina	C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm)	mobilna faza: A) acetonitril/metanol (85:15, v/v) B) acetonitril/diklorometan/metanol (70:20:10, v/v/v) gradientna elucija pretok: 1,8 mL/min; detekcija: 450 nm čas: 25 min	Olmedilla in sod., 1997; Olmedilla in sod. 2001; Granado in sod., 1998
lutein, <i>Z</i> -lutein, epi-lutein, zeaksantin, $\beta$ -karoten, $\alpha$ -karoten in/ali likopen, $\beta$ -kriptoksantin, $\alpha$ -kriptoksantin, <i>Z</i> -zeaksantin, anhidrolutein kantaksantin, echinenone, $\beta$ , $\epsilon$ -karoten-3'-on $\epsilon$ , $\epsilon$ -karoten-3,3'-dion 3'-hidroksi- $\epsilon$ , $\epsilon$ -karoten-3- on, 3'-oksolutein	C <sub>18</sub> (150 × 4,6 mm)	mobilna faza: A) voda/metanol, (4:96, v/v); B) metanol C) diklorometan (40:60, v/v), gradientna elucija pretok 1 mL/min; detekcija: 450 nm	Hargitai in sod., 2006
lutein in zeaksantin in/ali <i>all-E</i> - in 5- <i>Z</i> -, 9- <i>Z</i> -, 13- <i>Z</i> - likopen	C <sub>18</sub> (250 × 4 mm; velikost delcev 5 $\mu$ m) + predkolona (30 × 4,6 mm, velikost delcev 5 $\mu$ m)	mobilna faza: A) heksan B) heksan/diklorometan/dioksan (85:12:3, v/v/v) gradientna elucija pretok: 1 mL/min; detekcija: 471 nm; čas: 25 min	Froescheis in sod., 2000; Skřivan in Englmaierová, 2014
lutein, zeaksantin	C <sub>18</sub> (300 × 4,6 mm; velikost delcev 3 $\mu$ m)	mobilna faza: A) acetonitril B) acetonitril/metanol/amonijev acetat (49,8:49,8:0,4, v/v/v); C) izopropanol; gradientna elucija pretok: 1 mL/min; temperatura kolone: 18,5 °C; čas: 60 min	Vishwanathan in sod., 2009
lutein, zeaksantin, kapsantin	C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm)	mobilna faza: A) aceton/metanol (75:25, v/v), B) aceton/voda (75:25, v/v); gradientna elucija; pretok: 1 mL/min; detekcija: 460 nm; čas: 100 min	Lai in sod., 1996

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 2: HPLC metode za analizo karotenoidov v rumenjaku

spojina	kolona	metoda	referenca
lutein, zeaksantin kapsantin, citraksantin, kantaksantin, $\beta$ -kriptoksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'- oat, $\beta$ -apo-8'-karotenal	C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm velikost delcev 5 $\mu$ m) + predkolona (10 × 4 mm)	mobilna faza: A) metanol B) metanol/TBME/voda (6:90:4, v/v/v ) gradientna elucija pretok: 1 mL/min; T kolone: 35 °C; detekcija: 450 nm; čas: 40 min	Schlatterer in Breithaupt, 2006
lutein, zeaksantin kapsantin, citraksantin, kantaksantin, $\beta$ -kriptoksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'- oat, $\beta$ -apo-8'-karotenal	C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm velikost delcev 5 $\mu$ m) + predkolona (10 × 4 mm)	mobilna faza: aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v) izokratska elucija pretok: 1 mL/min; T kolone: 27 °C; detekcija: 450 nm; čas: 17 min	Brulc in sod., 2013
13-Z-lutein, 13'-Z-lutein, 13-Z-zeaksantin, lutein, Z-izomer kantaksantina, <i>all-E</i> -zeaksantin, 9-Z-lutein, kantaksantin, 9'-Z-lutein, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'- oat	C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm velikost delcev 5 $\mu$ m) + predkolona C <sub>18</sub> (20 × 3 mm velikost delcev 5 $\mu$ m)	mobilna faza: A) metanol/TBME/voda (92:4:4, v/v/v z 0.1% BHT) B) metanol/TBME/voda (6:90:4, v/v/v z 0.1% BHT) gradientna elucija pretok: 1 mL/min; T kolone: 20 °C, detekcija: 450 nm; čas: 90 min	Aman in sod., 2005
lutein	C <sub>30</sub> 150 × 4,6 mm, velikost delcev 3 $\mu$ m	mobilna faza: A) metanol/MTBE/voda (83:15:2, v/v/v) 1,5% amonijevega acetata v vodi B) metanol/MTBE:voda (8:90:2, v/v/v) 1 % amonijevega acetata v vodi gradientna elucija detekcija: 445 nm	Chung in sod., 2004
lutein, zeaksantin, $\alpha$ -karoten, $\beta$ -karoten	C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, velikost delcev 5 $\mu$ m + predkolona (10 × 4,6 mm)	mobilna faza: etanol/metanol/THF (75:20:5, v/v/v) izokratska elucija pretok: 1 mL/min; T kolone: 25 °C; detekcija: 450 nm	Hammershøj in sod., 2010
lutein, 13-Z-lutein, zeaksantin, 13-Z-zeaksantin, 9-Z-zeaksantin, kantaksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'- oat	C <sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, velikost delcev 5 $\mu$ m) + pripadajoča predkolona (10 × 4,0 mm)	mobilna faza: A) metanol/voda/mravljina kislina (994:5:1, v/v/v) B) TBME/metanol (93:7, v/v) izokratska elucija (A:B, 93:7) pretok: 1,1 mL/min; T kolone: 30 °C detekcija: 450 nm, čas: 20 min	Wenzel in sod., 2011; Wenzel in sod., 2010

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci jajc

###### 3.1.1.1 Jajca s slovenskega tržišča

Za določitev vsebnosti ksantofilov v jajcih na slovenskem tržišču smo jajca kupovali v trgovinah ali na tržnici od različnih rejcev. Seznam jajc za določitev razlik v vsebnosti ksantofilov v istem pakiranju kupljenih jajc je predstavljen v preglednici 3. Seznam jajc, glede na način reje, je predstavljen v preglednicah 4–7. Vsa jajca so bila do analize hranjena pri 4 °C ter analizirana pred potekom roka uporabe.

Preglednica 3: Seznam analiziranih vzorcev jajc iz baterijske (3), hlevske (2), proste (1) in ekološke reje (0) za določitev razlik v vsebnosti ksantofilov v kupljenih jajcih

Table 3: List of analysed egg samples from cage (3), barn (2), free range (1), ecological (0) husbandry class to determine the differences in the levels of xanthophylls in purchased eggs

način reje	ime	rejec	težnostni razred
3	debela jajca za zajtrk	Jata Emona d.d.	XL
2	6 jajc iz gnezda	Jata Emona d.d.	M
1	jajca kokoši s pašnika	Meja Šentjur d.d.	M
0	bio jajca (Mercator)	za Mercator polni Meja Šentjur d.d.	M

Preglednica 4: Seznam vzorcev jajc iz baterijske reje

Table 4: List of egg samples from cage husbandry

št. vzorca	Ime	rejec	težnostni razred
1	generična jajca Mercator	pakira Meja Šentjur d.d.	M
2	jajca izpod Kamniških planin, z močjo lanenega semena	Jata Emona d.d.	M
4	debela jajca za zajtrk	Jata Emona d.d.	XL
6	žitna jajca	Jata Emona d.d.	L
7	jajca omega plus	Jata Emona d.d.	M
8	sveža jajca Mercator	Meja Šentjur d.d.	M
12	žitna jajca	Meja Šentjur d.d.	M
13	šentjurska debela jajca	Meja Šentjur d.d.	XL
14	debeluške-Lah	Lah s.p.	L
15	zlato jajce - obogateno z jodom, selenom, n-3, vitamini B-kompleksa, D in E	Jata Emona d.d.	M
16	jajca za peko - Lah	Lah s.p.	M
17	jajca S-budget	proizvedeno v EU za Spar	S
18	ekstra debeluške	Lah s.p.	XL
19	10 svežih jajc	HMEZAD HRAM d.o.o.	M
20	sveža kokošja jajca Spar	Jata Emona d.d.	L
22	posebno rumena jajca	Meja Šentjur d.d.	M
23	Kolumbova jajca - obogatena s selenom in vitaminom E	Meja Šentjur d.d.	M
28	6 svežih jajc - delizie dal sole	Bvia Campalto Italia	L
29	6 kokošnjih svežih jajc - farma Hrvatič	Hrvatič Franc s.p.	L
31	sveža kokošja jajca Tuš	Kmetija Ramuta	L
32	10 svežih jajc srednje velikosti	Delizie dal sol - Via Campalto	M
34	oeufs de nos regions - coques	Marque Repere	L
35	sveža kokošja jajca Tuš	Meja Šentjur d.d.	M
36	sveža jajca olimp	Meja Šentjur d.d.	S
37	10 svežih velikih jajc - kakovost iz Slovenije	HOFER trgovina d.o.o.	L
38	10 svežih jajc	HOFER trgovina d.o.o.	M
39	10 svežih kokošnjih jajc iz Laškega	Kmetijska zadruga Laško	L
40	velika jajca Tuš	Kmetija Ramuta	XL
44	10 svežih jajc - Lidl	Latschenberger GMBH	L
45	10 svežih jajc - tržnica (Perutnina Ptuj)	Meja Šentjur d.d.	M
47	10 svežih jajc - kmetija Vogrinec	Kmetija Vogrinec	M

Preglednica 5: Seznam vzorcev jajc iz hlevske reje

Table 5: List of egg samples from barn husbandry

št. vzorca	ime	rejec	težnostni razred
3	jajca iz gnezda	Jata Emona d.d.	M
9	jajca Spar vital - z omega 3	Meja Šentjur d.d.	velikost cca. 55g
11	omega jajca	Meja Šentjur d.d.	M
21	sveža jajca Spar	Meja Šentjur d.d.	M
24	jajca talne reje	Meja Šentjur d.d.	M
27	poules elevees au sol	Francija	L
41	talna reja - kakovost iz Slovenije	HOFER trgovina -OKUS PODEŽELJA	L
42	sveža kokošja jajca - talna reja - Tuš	Kmetija Ramuta	L
46	10 svežih jajc iz hlevske reje	Latschenberger GMBH (LIDL)	L
48	kokošja jajca - naravno fit	Perutnina Ptuj d.d.	M

Preglednica 6: Seznam vzorcev jajc iz proste reje

Table 6: List of egg samples form free range husbandry

št. vzorca	ime	rejec	težnostni razred
5	jajca kokoši s pašnika	Meja Šentjur d.d.	M
25	plein air jajca	Francija	M
33	oeufs de nos regions - fermiers	rejena na majhnih kmetijah - Marque Repere	M
49	jajca s tržnice	domača jajca	različno
59	plein Air Label Rouse	Francija	M
60	jajca kokoši s pašnika	Meja Šentjur d.d.	M
61	Fermies-Label Rouse	Francija	različno
62	prosta reja (Tuš)	pakira Meja Šentjur d.d.	M
63	plain Air Oeufs de nos Regions	Francija	različno

Preglednica 7: Seznam vzorcev jajc iz ekološke reje

Table 7: List of egg samples form ecological husbandry

št. vzorca	ime	rejec	težnostni razred
10	bio jajca Spar - Natur*pur	Meja Šentjur d.d.	različno
26	bio village jajca	Francija	M
30	nos oeufs bio	L'Oeuf De nos villages - Baby coque	L
43	sveža kokošja jajca - tržnica	Ekološka kmetija Dolinar - Taborišče Vojsko	L
50	ekološka jajca s Pohorja	Ekološka kmetija Durnik	M
51	ekološka jajca izpod Lisce	Božidar Beci	različno
52	bio jajca (4 kosi ekološke reje)	pakira: C.I. N° IT40028 Via Cavecchia 75, 47521 Calisese di Cesena (FC)	različno
53	bio jajca iz proste reje (Natur activ)	Schlöfl-EL Konsumstrasse 2, A- 7350 Stoob-Süd	M
54	bio Toni's (jajca iz proste reje)	Damjan Vogrinec s.p.	M
55	bio jajca	Meja Šentjur d.d.	različno
56	bio nos oeufs	Francija	L
57	sveža jajca ekološke reje	Ekološka kmetija Pehar	različno
58	bio jajca (Spar Natur*pur)	pakira Meja Šentjur d.d.	različno
64	bio jajca (Mercator)	pakira Meja Šentjur d.d.	M

### 3.1.1.2 Jajca iz študije vpliva dodatka delov rastline navadnega volčjega jabolka v kokošjo krmo

Preučevanje vpliva krmnega dodatka na vsebnost ksantofilov s poudarkom na zeaksantinu in  $\beta$ -kriptoksantinu je potekalo v sodelovanju s podjetjem Emona Razvojni center za prehrano d.o.o., v okviru projekta L4-4322. Jajca so bila po znesenju hranjena pri temperaturi 4 °C ter analizirana v manj kot enem tednu po znesenju.

Analizirana so bila jajca petih kokoši nesnic, ki niso dobivale krmil z dodanimi karotenoidi, in jajca petih kokoši nesnic, ki so dva tedna dobivale krmo z dodanimi zmletimi jagodami in povečanimi čašami rastline navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*). Skupaj je bilo analiziranih 160 jajc. Vzorčenje je podrobneje opisano v podpoglavju 3.3.3.

### 3.1.2 Vzorci navadnega volčjega jabolka

Navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*) so pridelali na Inštitutu za Hmeljarstvo v Žalcu, v okviru aplikativnega projekta (L4-4322), z naslovom: »Navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.) kot surovina za izdelavo rastlinskega dodatka z

zeaksantinom h krmilom kokoši nesnic«. Jagode in povečane čaše so bile obrane pri tehnološki zrelosti ter ločeno sušene pri 40 °C do suhega. Po sušenju je bil ves pridelek vakuumsko zapakiran in hranjen pri 4 °C.

### 3.1.3 Kemikalije

Aceton (99,5 %), etanol, trietilamonijev acetat (1M) pH 7, tetrahidrofuran (99,9 %), *tert*-butilhidrokinon (TBHQ, 97 %), 1,1'-difetil-2-pikrilhidrazil (DPPH), difetilamin (99 %), anilin (99 %) in parafinsko olje, ki smo jih uporabljali, so bili od proizvajalca Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Švica). Metanol (99,8 %), acetonitril (99,9 %) in kalijev heksacianoferat(III) (99 %) so bili od podjetja J.T. Baker (Deventer, Nizozemska), kalijev dihidrogenfosfat (99 %) in železov(III) klorid pa od Fluke (St. Gallen, Švica). Trikloroocetna kislina je bila od Kemike (Zagreb, Jugoslavija), 1-propanol (99,5 %), *n*-heksan (99,8 %), etilacetat (99,5 %), očetna kislina (99,8 %), kloroform (98 %), diklorometan (98 %), žveplova(VI) kislina (95 – 97 %), natrijev hidrogenfosfat (99 %), mravljinčna kislina ( $\geq 98$  %), 4-metoksibenzaldehid (*p*-anisaldehid, 98 %), fosforjeva(V) kislina (85 %) 2-aminoetil-difenilborinat (NST), Folin-Ciocalteu reagent, natrijev karbonat pa od Mercka (Darmstadt, Nemčija). Za analize smo uporabili tudi bidestilirano vodo.

Standarde ksantofilov: 8'-apo- $\beta$ -karotenal (HPLC 97 %), kantaksantin (HPLC 98 %), kapsantin (HPLC 96 %), citranaksantin (HPLC 98 %),  $\beta$ -kriptoksantin (HPLC 97 %), lutein (HPLC 96 %), zeaksantin (HPLC 97 %), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat (HPLC 96 %) smo kupili pri podjetju CaroteNature (Lupsingen, Švica). Zeaksantin dipalmitat (physalien) pa je bil kupljen od proizvajalca Extrasynthèse (Genay Cedex, Francija). Za validacijo smo uporabili lutein (UV-Vis  $\geq 95$  %), zeaksantin (UV-Vis  $\geq 98$  %),  $\beta$ -kriptoksantin (UV-Vis  $\geq 97$  %) od proizvajalca Extrasynthèse ter kantaksantin (HPLC 94 %) in 8'-apo- $\beta$ -karotenal (UV-Vis  $\geq 96$  %) od proizvajalca Sigma Aldrich.

Standardi triterpenoidov lupeol ( $\geq 99$  %),  $\alpha$ -amirin ( $\geq 98,5$  %),  $\beta$ -amirin ( $\geq 98,5$  %), lupenon ( $\geq 95$  %), lupeol acetat ( $\geq 95$  %), cikloartenol ( $\geq 90$  %), cikoartenol acetat ( $\geq 90$  %), fridelin ( $\geq 99$  %) in betulinska kislina ( $\geq 97$  %) so bili od proizvajalca Extrasynthèse, medtem ko je bil standard stigmasterola ( $\geq 99$  %) iz podjetja Serva Feinbiohemica (Heidelberg, Nemčija) in oleanolna kislina ( $\geq 97$  %) iz podjetja Carl Roth (Karlsruhe, Nemčija). Standarda ursolne kisline ( $\geq 90$  %) in  $\beta$ -sitosterola ( $\geq 97$  %) sta bila od proizvajalca Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, ZDA).

Standardi saharoze ( $\geq 99,5$  %), glukoze ( $\geq 99,5$  %) in fruktoze ( $\geq 99,0$  %) so bili od proizvajalca Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Švica).

Od Extrasynthèse sta bila 2 standarda flavonoidov luteolin (HPLC  $\geq 99$  %) in luteolin-7-O-glikozid (HPLC  $\geq 99$  %) ter kvercetin od Kemike, medtem ko sta bila standarda fenolnih kislin: kavna kislina (99 %) od Fluke in klorogenska kislina (97 %) od Mercka.



### 3.1.4 Aparature in sistemi

#### 3.1.4.1 Aparature

- reakcijska postaja Carousel12 Plus (Radleys, Essex, Anglija)
- centrifuga Centric 322 A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- vibracijski mešalnik Lab Dancer (IKA, Staufen, Nemčija) s konstantno hitrostjo 2800 vrt./min.
- multivapor (R-12) ali rotavapor (R-114) s črpalko (V-700), vodno kopeljo (B-400) in kontrolno konzolo pritiska (V-850) proizvajalca Büchi Labortechnik (Flavil, Švica)
- sistem za mikrovalove Mars-X (CEM Corporation, Matthews, Severna Karolina, ZDA)
- mikro-dismembrator S (Sartorius, Göttingen, Nemčija)
- spektrofotometer Lambda 34 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, ZDA)
- analitska tehtnica Excellence Plus XP (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, ZDA)
- mlin Retsch (Haan, Nemčija)

#### 3.1.4.2 TLC sistemi

Pri TLC analizah smo uporabljali naslednje naprave proizvajalca Camag (Muttens, Švica):

- avtomatski nanašalec (Automatic TLC Sampler 4-ATS4) s 25  $\mu$ L brizgo
- polavtomatski nanašalec Linomat 5 s 100  $\mu$ L brizgo
- kadi za razvijanje plošč: horizontalni kadi za plošče velikosti 20 cm x 10 cm in 10 cm x 10 cm, kadi s prekatom za plošče velikosti 20 cm x 10 cm in 10 cm x 10 cm
- napravo za potapljanje plošč v detekcijski reagent (Chromatogram Immersion Device III) in grelno ploščo (TLC Plate Heater)
- dokumentacijski sistem DigiStore 2 Documentation System, povezan z Reprostarjem 3 in računalniški program winCATS Version 1.4.1.8154
- denzitometer (TLC Scanner 3) z računalniškim programom winCATS Version 1.4.1.8154

Za TLC analizo smo uporabili naslednje Merck-ove (Darmstadt, Nemčija) 20 cm x 10 cm HPTLC plošče:

- HPTLC plošče z 200  $\mu$ m debelo plastjo silikagela 60 (št. izdelka 1.05641.0001)
- HPTLC plošče z 200  $\mu$ m debelo plastjo RP C<sub>18</sub> silikagela 60 (št. izdelka 1.05914.0001)

V vseh primerih je bil nosilec stacionarne faze steklo.

### 3.1.4.3 HPLC sistem

Vse HPLC analize in razvoj metod so bili narejeni na HPLC sistemu Surveyor Plus (Thermo Finnigan, San Jose, Kalifornija, ZDA), ki je bil opremljen s kvarterno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom s 100  $\mu$ L zanko (z izjemo analiz na kolonah z delno poroznimi delci, kjer je bila analiza narejena z 20  $\mu$ L zanko) in PDA detektorjem (detektor z nizom diod, Photodiode Array detector) s pretočno celico, ki je imela 50 mm optične poti. HPLC sistem je bil povezan z računalniškim programom ChromQuest 5.0, s pomočjo katerega smo dobljene kromatograme dokumentirali in jih ovrednotili.

Za analize smo uporabili kolono ProntoSIL C<sub>30</sub>, dolžine 250 mm in premera 4,6 mm, velikostjo delcev 5  $\mu$ m (Bischoff Chromatography, LeonBerg, Nemčija) ter predkolono security guard cartridge C<sub>18</sub> dolžine 4 mm in premera 3 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA).

## 3.2 METODE ZA ANALIZO KSANTOFILOV V RUMENJAKU

### 3.2.1 Razvoj HPLC metode

#### 3.2.1.1 Priprava standardnih raztopin ksantofilov in določanje njihove točne koncentracije

Osnovne standardne raztopine ksantofilov (20  $\mu$ g/mL) so bile pripravljene v acetonu z natehto 0,5 mg standarda v 25 mL merilno bučko. Začetno raztapljanje je bilo doseženo z dodatkom nekaj kapljic kloroforma na tehtalno ladjico, s čimer smo lažje kvantitativno prenesli standard v merilno bučko. To smo dopolnili do oznake z acetonom, ki je bil predhodno prepihan z dušikom. Delovne raztopine ksantofilov (2  $\mu$ g/mL) smo pripravili z razredčenjem 1,0 mL osnovne standardne raztopine z acetonom v 10 mL merilni bučki do oznake.

Iz osnovnih standardnih raztopin smo pripravili delovne mešanice osmih (MIX8: lutein, zeaksantin, kantaksantin, 8'-apo- $\beta$ -karotenal, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, citranaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin), petih (MIX5: lutein, zeaksantin, kantaksantin, 8'-apo- $\beta$ -karotenal,  $\beta$ -kriptoksantin) in dveh (MIX2: lutein, zeaksantin) ksantofilov. Mešanica standardov MIX8 je bila pripravljena v koncentraciji 2  $\mu$ g/mL, MIX5 v koncentracijah od 0,04 do 2  $\mu$ g/mL (0,04  $\mu$ g/mL; 0,1  $\mu$ g/mL; 0,4  $\mu$ g/mL; 0,8  $\mu$ g/mL; 1,2  $\mu$ g/mL; 1,6  $\mu$ g/mL; 2,0  $\mu$ g/mL) in MIX2 v koncentraciji 1  $\mu$ g/mL glede na posamezni ksantofil. Vse mešanice so bile pripravljene v acetonu z izjemo mešanice MIX2, kjer smo v 10 mL merilni bučki 1 mL osnovne standardne raztopine luteina in 1 mL osnovne standardne raztopine zeaksantina, odparili z dušikom do suhega in raztopili v 1-propanolu do oznake.

Vse standardne raztopine so bile hranjene v rjavih vialah za shranjevanje s teflonskimi pokrovčki (National Scientific, Rockwood, Tennessee, ZDA) na  $-80$  °C.

Točna koncentracija vsake standardne raztopine ksantofila je bila določena s pomočjo določanja spektrofotometrične in kromatografske čistote standardov. Spektrofotometrično čistoto smo določili z uporabo znanega specifičnega koeficienta absorpcije pri valovni dolžini maksimuma ( $A_{\lambda 1\%, 1\text{cm}, \lambda}$ ) spojine v ustreznem topilu (preglednica 8), z izmero absorbance raztopine pri tej valovni dolžini ( $A_{\lambda \max}$ ). Spektrofotometrična čistota v % (enačba 1) je bila določena kot količnik točne koncentracije standardne raztopine ( $c_{\text{spek}}$ ) in koncentracijo spojine izračunane iz natehte ( $c_{\text{nat}}$ ).

$$\text{spektrofotometrična čistota}(\%) = \frac{c_{\text{spek}}}{c_{\text{nat}}} \cdot 100 \% = \frac{A_{\lambda \max} \cdot 10^4}{A_{\lambda 1\%, 1\text{cm}, \lambda}} \cdot \frac{1}{c_{\text{nat}}} \cdot 100 \% \quad \dots(1)$$

Preglednica 8: Specifični absorpcijski koeficienti ksantofilov ( $A_{1\%, 1\text{cm}, \lambda}$ )

Table 8: Specific absorption coefficients of xanthophylls ( $A_{1\%, 1\text{cm}, \lambda}$ )

spojina	$A_{1\%, 1\text{cm}, \lambda}$	$\lambda_{\max}$ (nm)	topilo
lutein <sup>a</sup>	2550	445	etanol
kapsantin <sup>b</sup>	2076	469	<i>n</i> -heksan / 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
zeaksantin <sup>a</sup>	2540	450	etanol
kantaksantin <sup>b</sup>	2430	465	<i>n</i> -heksan / 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
8'-apo- $\beta$ -karotenal <sup>b</sup>	3069	455	<i>n</i> -heksan / 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
citranaksantin <sup>b</sup>	2868	467	<i>n</i> -heksan / 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat <sup>b</sup>	2645	442	<i>n</i> -heksan / 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
$\beta$ -kriptoksantin <sup>b</sup>	2578	450	<i>n</i> -heksan / 2 % CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

<sup>a</sup>podatki vzeti od Britton (1995)

<sup>b</sup>podatki od certifikatov standardov od proizvajalca CaroteNature.

Ker pa spektrofotometrija ni dovolj specifična tehnika za določanje čistote, saj vse prisotne spojine, ki absorbirajo pri isti valovni dolžini kot analit, prispevajo k spektrofotometrični določitvi koncentracije analita, moramo za določitev pravilne koncentracije analita upoštevati še kromatografsko čistoto. Ta je bila določena s HPLC-PDA pri injiciranju vsakega analita posamezno pri 450 nm s 17 min izokratsko metodo. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico acetona, metanola in 0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v) pri pretoku 1 mL/min. Kromatografsko čistoto smo izračunali kot odstotek ploščine kromatografskega vrha analita v primerjavi s celokupno ploščino vseh kromatografskih vrhov.

Točna koncentracija ksantofilov je bila izračunana kot zmnožek spektrofotometrične čistote in kromatografske čistote, kot prikazuje enačba 2.

$$\text{točna koncentracija standarda}(\%) = \frac{\text{spektrofotometrična čistota}(\%) \cdot \text{kromatografska čistota}(\%)}{100} \quad \dots(2)$$

Ker standard luteina vedno vsebuje tudi nekaj zeaksantina, smo izračunali za kolikšen odstotek se poveča ploščina vrha zeksantina in to vrednost prišteli k vsebnosti standarda zeaksantina za vsako točko umeritvene krivulje.

### 3.2.1.2 Optimizacija priprave testne raztopine iz rumenjaka za HPLC analizo

Pripravo testnih raztopin iz rumenjakov smo optimizirali z izbiro primernege ekstrakcijskega topila, časa potrebnega za ekstrakcijo ter učinkovitosti enojne ekstrakcije v primerjavi s trojno.

Da bi izbrali primerno topilo in čas ekstrakcije smo vzorčili tri jajčne rumenjake (1 g). Za testna topila pa smo izbrali aceton, etanol in aceton:etanol (1:1, v/v). Volumen izbranega topila oziroma mešanice topil je znašal 10 mL. Med dodajanjem topila v epruveto z zatehtanim rumenjacom smo sočasno izvajali mešanje na vibracijskem mešalniku. Ekstrakcijo smo nato izvajali z vsakim od zgoraj omenjenih topil 15, 30 ali 60 min v treh paralelkah na napravi Carousel12 Plus pri sobni temperaturi ob stalnem mešanju (650 rpm) v dušikovi atmosferi. Po končani ekstrakciji smo ekstrakte 5 min centrifugirali pri 4800 rpm. Supernatant smo filtrirali skozi 0,45 μm PVDF (hidrofoben poliviniliden diklorid) filter (Millipore, Billerica, MA, ZDA). Tako pripravljenim testnim raztopinam smo izmerili absorbanco pri 450 nm ( $A_{450nm}$ ) in upoštevali specifični absorpcijski koeficient 2500, ki je priporočen za mešanice karotenoidov (Rodriguez-Amaya in Kimura, 2004).

Po enačbi (3) smo iz vrednosti absorbance izračunali približno vsebnost celokupnih karotenoidov. Na podlagi izračunanih vrednosti smo izbrali najprimernejše topilo in čas ekstrakcije.

$$\text{celokupni karotenoidi} \left( \frac{mg}{100 g \text{ rumenjaka}} \right) = \frac{A_{450 nm} * 10^4}{2500 * m_{vzorca}} \quad \dots(3)$$

Primerjali smo tudi izplen enojne ekstrakcije v primerjavi s trojno, pri čemer smo izvedli trojno ekstrakcijo 1 g in 0,5 g rumenjaka (iz enega rumenjaka) v 10 mL acetona v treh ponovitvah. Ekstrakcija je potekala 15 min po postopku, ki je opisan v podpoglavju 3.2.2.1.1. Po končani ekstrakciji in centrifugiranju (10 min, 4200 rpm) smo previdno odlili supernatant. Posamezne stopnje ekstrakcije smo analizirali s HPLC-PDA pri 450 nm s 17 minutno izokratsko metodo. Uporabljena mobilna faza je bila sestavljena iz acetona, metanola in 0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v) pri pretoku 1 mL/min.

Na podlagi dobljene ploščine kromatografskega vrha ( $P$ ) luteina in zeaksantina smo izračunali, kolikšen izplen dobimo z enojno ekstrakcijo v primerjavi s trojno. Izplen enojne ekstrakcije pri vzorčenju 1 g ali 0,5 g rumenjaka smo izračunali kot količnik ( $P$  enojne ekstrakcije) ploščine največjega kromatografskega vrha po prvi ekstrakciji in vsote ploščin ( $\Sigma P$ ) največjega kromatografskega vrha iz vseh treh ekstrakcij (enačba 4).

$$\text{izplen enojne ekstrakcije (\%)} = \frac{P \text{ enojne ekstrakcije}}{\sum P} \cdot 100 \% \quad \dots(4)$$

### 3.2.1.3 Optimizacija pogojev HPLC analize

Optimizacija HPLC metode je obsegala izbiro primerne mobilne faze, količine pufru v mobilni fazi ter vpliv temperature kolone na ločbo. Poleg tega smo naredili tudi primerjavo osmih kolon za analizo osmih ksantofilov. Optimizacija je potekala na HPLC sistemu in koloni opisanima v podpoglavju 3.1.4.3.

#### 3.2.1.3.1 Optimizacija mobilne faze

Za optimizacijo izokratske ločbe smo delali s spodaj navedenimi mobilnimi fazami (MF), pretoki in temperaturami:

- MF: aceton:voda (93:7, v/v); T = 21 °C, pretok 1 mL/min; čas analize: 18 min
- MF: aceton:0,1 M TEAA pH 7 (93:7, v/v); T = 19 °C; pretok 1 mL/min; čas analize: 18 min
- MF: aceton:metanol (1:4, v/v); T = 30 °C; pretok 1,5 mL/min; čas analize: 20 min
- MF: aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 27 °C; pretok 1 mL/min; čas analize: 17 min

Zadnjo mobilno fazo smo uporabili za določanje vsebnosti ksantofilov v jajčnem rumenjaku.

#### 3.2.1.3.2 Optimiziranje količine pufru v mobilni fazi

Mobilni fazi sestavljeni iz acetona, metanola in vode (14:5:1, v/v/v) smo delež vode zamenjali z 0,1 M in z 0,5 M TEAA pH 7 (kar pomeni 5 mM in 25 mM TEAA pH 7 na celotno MF). Pretok skozi kolono je bil 1 mL/min pri temperaturi kolone 25 °C. Pri teh pogojih smo pri vsaki mobilni fazi 3 krat injicirali mešanico standardov MIX8. Pri vsaki spremembi mobilne faze smo kolono kondicionirali 60 min.

#### 3.2.1.3.3 Optimizacija temperature kolone

Temperaturo kolone smo optimizirali v razponu od 19 °C do 31 °C po 2 °C. Uporabili smo mobilno fazo iz acetona, metanola in 0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v), s pretokom 1 mL/min. Pri vsaki temperaturi smo trikrat injicirali mešanico standardov MIX8.

### 3.2.1.3.4 Primerjava kolon s poroznimi delci (»full-porous«) in delno poroznimi delci (»core-shell«) za analizo ksantofilov

Primerjali smo kolone C<sub>30</sub> s poroznimi »full-porous« in C<sub>18</sub> ter eno kolono C<sub>30</sub> z delno poroznimi delci »core-shell« glede na ločbo ksantofilov MIX8. Testirane kolone so podane v preglednici 9. Koncentracija standardov MIX8 je bila 2  $\mu\text{g/mL}$ . Za kolone z delno poroznimi delci je bila uporabljena mobilna faza acetonitril in 0,5 M TEAA pufer pH 7 (97:3, v/v) pri temperaturi kolone 12–28 °C. Kolone iz »full-porous« silikagela pa smo testirali z mobilnima fazama: aceton:metanol:0,5 M TEAA pufer pH 7 (14:5:1, v/v/v) ali aceton:acetonitril:0,5 M TEAA pufer pH 7 (10:9:1, v/v/v).

Preglednica 9: Seznam testiranih HPLC kolon

Table 9: List of tested HPLC columns

ime kolone	dolžina (mm) x premer (mm) kolone	stacionarna faza (silikagel)	velikost delcev ( $\mu\text{m}$ )	velikost por ( $\text{\AA}$ )	površina delcev ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	C (%)
<sup>a</sup> ProntoSIL C <sub>30</sub>	250 × 4,6	»full porous« RP C <sub>30</sub>	5	200	200	20
<sup>a</sup> ProntoSIL C <sub>30</sub>	250 × 4,6	»full porous« RP C <sub>30</sub>	3	200	200	20
<sup>b</sup> Acclaim C <sub>30</sub>	250 × 4,6	»full porous« RP C <sub>30</sub>	5	200	200	13
<sup>c</sup> Kinetex C <sub>18</sub>	100 × 4,6	»core-shell« RP C <sub>18</sub>	2,6	100	200	12
<sup>d</sup> Accucore C <sub>18</sub>	100 × 4,6	»core-shell« RP C <sub>18</sub>	2,6	80	130	9
<sup>d</sup> Accucore XL C <sub>18</sub>	100 × 4,6	»core-shell« RP C <sub>18</sub>	4	80	90	7
<sup>d</sup> Accucore C <sub>30</sub>	100 × 4,6	»core-shell« RP C <sub>30</sub>	2,6	150	130	5
<sup>e</sup> Ascentis Express C <sub>18</sub>	100 × 4,6	»core-shell« RP C <sub>18</sub>	2,7	90	150	-

Vse kolone razen obeh kolon ProntoSIL imajo »endcapping«.

<sup>a</sup>Bischoff Chromatography, Leonberg, Nemčija

<sup>b</sup>Dionex, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA

<sup>c</sup>Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA

<sup>d</sup>ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA

<sup>e</sup>Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA

S pomočjo CromQuest 5.0 smo izračunali asimetrijo (repanje) kromatografskih vrhov ( $T$ , enačba 5), resolucijo ( $R$ , enačba 6), teoretske pode ( $n$ , enačba 7) po USP-farmakopeji (ChromQuest 5.0 Reference Guide).

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad \dots(5)$$

kjer je,

$T$ .....asimetrija (repanje) kromatografskega vrha

$W_{0,05}$ ...širina kromatografskega vrha na 5 % višine od bazne linije

$f$ .....razdalja na 5 % višine bazne linije od maksimuma kromatografskega vrha do začetnega dela vrha

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 - W_1} \quad \dots(6)$$

kjer je,

$R$ .....resolucija

$t_2$ .....retencijski čas od injiciranja do elucije kromatografskega vrha 2

$t_1$ .....retencijski čas od injiciranja do elucije kromatografskega vrha 1

$W_2$ .....širina kromatografskega vrha 2 pri bazni liniji

$W_1$ .....širina kromatografskega vrha 1 pri bazni liniji

$$n = 16\left(\frac{t}{W}\right)^2 \quad \dots(7)$$

kjer je,

$n$ .....število teoretskih podov

$t$ .....retencijski čas preučevane komponente

$W$ .....širina kromatografskega vrha preučevane spojine pri bazni liniji, z uporabo tangentne metode

### **3.2.2 Analizni postopek »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku« in njegova validacija**

#### **3.2.2.1 Analizni postopek**

##### **3.2.2.1.1 Priprava testnih raztopin iz rumenjaka**

Beljak smo ročno ločili od rumenjaka. Rumenjaku smo subjektivno določili intenzivnost barve s pomočjo Rochejeve barvne lestvice, ga premešali in 0,5 g natehtali v Carousel epruvete. Med mešanjem na vibracijskem mešalniku smo dodali 10 mL acetona. Epruveto smo postavili za 15 min na reakcijsko postajo Carousel 12 Plus, ki nam omogoča hkratno ekstrakcijo 12 vzorcev. Ekstrakcija je potekala pri sobni temperaturi v dušikovi atmosferi ob stalnem mešanju (650 rpm). Po končani ekstrakciji smo ekstrakt centrifugirali (10 min, 4200 rpm) in filtrirali skozi 0,45  $\mu$ m PDVF membranski filter. Mililiter supernatanta smo prenesli v HPLC vijalo, ostalo pa uporabili za spektrofotometrično analizo celokupnih karotenoidov, prepihali z dušikom in shranili do analize na  $-80$  °C. Med pripravo testnih raztopin, kot tudi standardnih raztopin, smo se izogibali direktni sončni svetlobi in fluorescenci.

##### **3.2.2.1.2 Vsebnost celokupnih karotenoidov (spektrofotometrična analiza)**

Testnim raztopinam, pripravljenim po zgornjem postopku (podpoglavje 3.2.2.1.1), smo izmerili absorbanco pri 450 nm ( $A_{450nm}$ ). Vsebnost celokupnih karotenoidov smo izračunali po enačbi (3), pri čemer smo za izračun uporabili vrednost absorpcijskega koeficienta ( $A_{1\%, 1\text{ cm}, \lambda}$ ) 2500 (Rodriguez-Amaya in Kimura, 2004).

### 3.2.2.1.3 HPLC analiza

Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico acetona, metanola ter 0,5 M TEAA pufra pH 7 v razmerju 14:5:1 (v/v/v). Kolona ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 mm × 4,6 mm, 5  $\mu$ m) je bila termostatorirana na 27 °C. Eluiranje je potekalo izokratsko 17 min, pri pretoku 1 mL/min. Detekcija je potekala pri 450 nm. Volumen injiciranja testnih in standardnih raztopin je bil 10  $\mu$ L.

### 3.2.2.2 Validacijski protokol

Za validacijo so bili izbrani naslednji ksantofili: lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin, kantaksantin in 8'-apo- $\beta$ -karotenal. Testirali smo ponovljivost sistema in metode, izkoristek dodatka standarda, linearnost umeritvene krivulje, mejo zaznavnosti in mejo določanja ter robustnost metode.

#### 3.2.2.2.1 Ponovljivost sistema

Ponovljivost sistema smo določili s trikratnim zaporednim injiciranjem mešanice standardov MIX2 (glej podpoglavje 3.2.1.1) pred in po 12 injiciranjih testnih raztopin.

Meje sprejemljivosti:

- relativni standardni odklon (RSD) ploščine kromatografskega vrha analita pri 3 zaporednih ponovitvah  $\leq 1,0$  %
- RSD retencijskega časa ( $t_R$ ) 3 ponovitev  $\leq 0,2$  %
- povprečna vrednost ploščine kromatografskih vrhov pred in po analizi mora biti v območju  $100$  %  $\pm 2$  %
- resolucija med luteinom in zeaksantinom  $\geq 3$

#### 3.2.2.2.2 Ponovljivost metode in izkoristek dodatka standarda

Ponovljivost metode znotraj enega dneva in izkoristek dodatka standarda smo določili tako, da smo natehtanemu jajčnemu rumenjaku (0,5 g) dodali 2  $\mu$ g, 5  $\mu$ g in 10  $\mu$ g (0,4; 1 in 2 mg/100 g rumenjaka) mešanice 5 standardov MIX5 (glej podpoglavje 3.2.1.1). Delali smo v treh ponovitvah. Mešanico standardne raztopine MIX5 smo odpipetirali v Carousel epruvete. Aceton smo odparili pod dušikom in zatehtali rumenjaki. Izkoristek (%) za vsak standard je bil izračunan po enačbi (8).

$$\text{izkoristek (\%)} = \frac{V_1 - V_0}{S} \cdot 100 \% \quad \dots(8)$$

kjer je,

$V_1$ .....vsebnost ksantofila v obogatenem rumenjaku (mg/100 g)

$V_0$ .....vsebnost ksantofila v neobogatenem rumenjaku (mg/100 g)

$S$ .....dodana količina standarda (mg/100 g)



Meje sprejemljivosti:

- izkoristek  $\geq 90$  %
- RSD treh ponovitev  $\leq 5$  % (za ponovljivost metode znotraj dneva)

#### 3.2.2.2.3 Linearnost, meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ)

Linearnost umeritvene krivulje smo testirali z mešanico standardnih raztopin MIX5 v koncentracijskem območju 0,04–2  $\mu\text{g/mL}$  (0,04  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,6  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,0  $\mu\text{g/mL}$ ), kar ustreza 0,08–4 mg/100 g rumenjaka. Za vsako točko umeritvene krivulje so bila narejena 3 injiciranja. Meji zaznavnosti (LOD) in določanja (LOQ) standardov ( $\mu\text{g/mL}$ ) sta bili izračunani iz enačbe premice umeritvene krivulje ( $y = bx + a$ ;  $a \neq 0$ ) po enačbah (9) in (10), kjer je  $\delta(a)$  standardna napaka odseka na ordinatni osi in  $b$  naklon premice (Snyder in sod., 2010).

$$LOD = \frac{3,3 \delta(a)}{b} \quad \dots(9)$$

$$LOQ = \frac{10 \delta(a)}{b} \quad \dots(10)$$

Meja sprejemljivosti:  $r^2 \geq 0,999$

#### 3.2.2.2.4 Selektivnost in robustnost

Selektivnost metode smo preučili s primerjanjem PDA spektrov standardov in testnih raztopin pri enakem retencijskem času. Spekter spojine testne raztopine je moral biti identičen tistemu v standardni raztopini. Za oceno robustnosti metode smo uporabili 2 različni seriji kolone ProtoSIL C<sub>30</sub>.

### 3.2.3 Razvoj TLC metode za kvalitativno določanje ksantofilov v rumenjaku

Ksantofile v rumenjaku je mogoče določiti tudi s pomočjo tankoplastne kromatografije na HPTLC C<sub>18</sub> RP plošči. Pred uporabo smo plošče razvili, tako kot predlaga Rodić s sodelavci (2012) v mešanici diklorometana in metanola (1:1, v/v) ter jih sušili 20 min pri 100 °C. Standardne raztopine MIX8 in testne raztopine, ki so bile pripravljene po postopku opisanem v podpoglavju 3.2.2.1.1, smo nanесли z ATS4 1 cm od spodnjega roba plošče. Volumen nanosa standarda je bil 20  $\mu\text{L}$  in vzorca 100  $\mu\text{L}$ . Kromatogram smo razvili do višine 8 cm v topilu za razvijanje 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v) z dodatkom 0,1 % TBHQ v 83 min z uporabo horizontalne kadi, sendvič konfiguracija. Razvito ploščo smo posušili do suhega s tokom hladnega zraka in jo takoj dokumentirali s pomočjo dokumentacijskega sistema DigiStore. Zaradi občutljivosti ksantofilov na svetlobo je delo

potekalo v zatemnjenem prostoru. Ker z uporabo tega topila za razvijanje nismo mogli ločiti luteina in zeaksantina, smo za njuno ločbo uporabili metanol z dodatkom 0,1 % TBHQ v 24 min.

Poleg topila za razvijanje 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v) in metanola pa smo ločbo standardov MIX8 poskusili tudi z uporabo metanola, acetonitrila, etanola, 1-propanola, 2-propanola, 1-butanola in mešanic topil metanol:aceton (7:3, v/v), metanol:aceton:*n*-heksan (14:5:1 in 12:5:1, v/v/v), metanol:aceton:THF (14:5:1, v/v/v), metanol:aceton:petroleter (2:1:1 in 13:5:2, v/v/v), 1-propanol:etilacetat (4:1, v/v), 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v), 1-propanol:2-propanol:aceton (2:2:1, v/v/v), 1-propanol:2-propanol:metanol (2:2:1, v/v/v), 2-propanol:metanol (3:2 in 1:4, v/v), 1-propanol:metanol (1:4, v/v).

### 3.3 METODE PRI ŠTUDIJAH KSANTOFILOV V RUMENJAKIH

#### 3.3.1 Določanje razlik v vsebnosti ksantofilov v kupljenih jajcih

Naključno smo za vsak način reje izbrali eno pakiranje, ki je vsebovalo 6 jajc. Stehali smo vsako celo jajce in posebej še rumenjaka in beljaka. Rumenjaku smo ocenili intenzivnost barve s pomočjo Rochejeve barvne lestvice in nato vsakega posebej premešali s stekleno palčko. Iz vsakega smo vzorčili trikrat po 0,5 mg rumenjaka in jih analizirali po analiznem postopku »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku« (podpoglavje 3.2.2.1). Seznam vzorcev jajc je naveden v preglednici 3.

#### 3.3.2 Določanje vsebnosti ksantofilov v jajcih s slovenskega tržišča

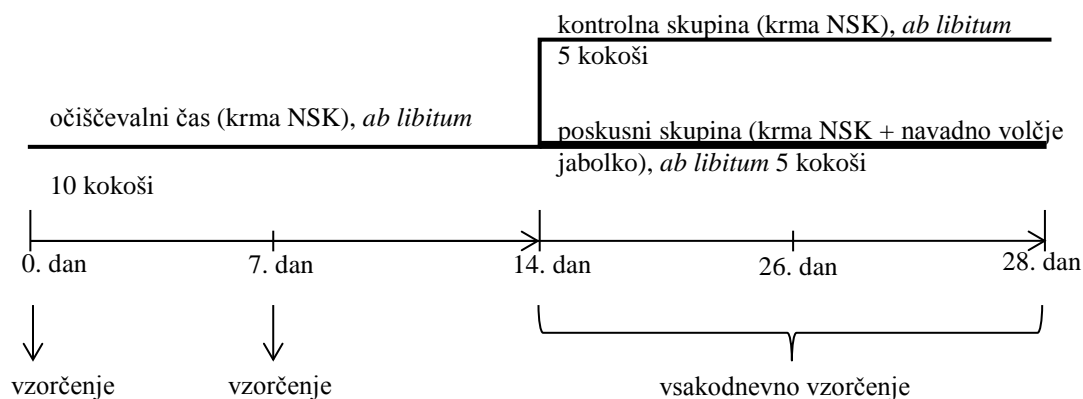
Za pregled vsebnosti karotenoidov v jajcih, ki so v Sloveniji trenutno dostopna potrošniku, smo glede na način reje analizirali 31 različnih pakiranj jajc iz baterijske reje (preglednica 4) 10 jajc iz hlevske reje (preglednica 5), 9 jajc iz proste reje (preglednica 6) in 14 jajc iz ekološke reje (preglednica 7).

Iz vsake škatle smo vzeli za analizo tri jajca, določili maso celotnega jajca, beljaka in rumenjaka. Rumenjaku smo ocenili intenzivnost barve s pomočjo Rochejeve barvne lestvice in jih nato združili in premešali s stekleno palčko. Testne raztopine smo pripravili in analizirali v treh ponovitvah po analiznem postopku »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku« (podpoglavje 3.2.2.1).

### 3.3.3 Obogatitev jajčnega rumenjaka z zeaksantinom in $\beta$ -kriptoksantinom z dodatkom jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka v kokošjo krmo

V okviru projekta »Navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.) kot surovina za izdelavo rastlinskega dodatka z zeaksantinom h krmilom kokoši nesnic« (L4-4322) je potekala enomesečna študija dodatka različnih količin navadnega volčjega jabolka v krmno mešanico za kokoši nesnice na 30 kokoših Lohmann Brown – Classic, starih 24 tednov. Kokoši so bile krmljene po volji (*ab libitum*). V nadaljevanju pa bomo predstavili le rezultate na 10 kokoših. Količina krmila, ki ga je imela kokoš na voljo, je znašala 0,12 kg na dan. V 14 dnevnem očiščevalnem času so bile kokoši krmljene s popolno krmno mešanico za kokoši nesnice (NSK), katere sestava je podana v preglednici 10, prehranska vrednost pa v preglednici 11. Naslednjih 14 dni je 5 kokoši nadaljevalo z očiščevalnim načinom prehranjevanja s krmo NSK, ostalih 5 pa je dobivalo krmo, ki je vsebovala 40 g zmletih povečanih čaš in jagod navadnega volčjega jabolka v enem kilogramu krme NSK. Krmo z dodatkom navadnega volčjega jabolka smo pripravili tako, da smo 400 g zmletih suhih jagod in čaš primešali k 120 g krme NSK. Mletje in mešanje je potekalo na mlinu Retsch (Haan, Nemčija). Petsto gramov tako pripravljene mešanice, smo pred začetkom študije primešali k 9,5 kg krme NSK. Pred in po študiji smo krmo tudi vzorčili in ji določili vsebnost ksantofilov.

Shema študije je prikazana na sliki 7, kjer je prikazano tudi to, v katerih dnevih študije smo odvzeli jajca za analizo. Jajca (160) so bila v najkrajšem možnem času analizirana po analiznem postopku »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku«, opisanem v podglavju 3.2.2.1.



Slika 7: Shema študije vpliva dodatka jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka na vsebnost zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina v rumenjaku s prikazanimi časi vzorčenj

Figure 7: Study scheme of impact of addition berries and husks Chinese lanterns on the amount of zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin in egg yolk with sampling times

Preglednica 10: Sestava popolne krmne mešanice za kokoši nesnice (NSK) (Jata Emona, Slovenija)

Table 10: Composition of complete feeding mixture for laying hens (NSK) (Jata Emona, Slovenija)

<b>delež %</b>	
25,000	koruza
36,000	pšenica
18,024	sojine tropine
5,000	sončnične tropine
3,000	repične tropine
3,153	sojino olje
3,208	apnenec
4,500	grobi kalcit
0,651	mono-di-kalcijev fosfat
0,500	<sup>a</sup> PX:NSK-0,5 %
0,500	roekana
0,182	soda bikarbona
0,173	morska sol
0,101	metionin
0,009	<sup>b</sup> Ronozyme NP -fitaza-90g-nesni
<b>100,000</b>	<b>neto</b>

<sup>a</sup>vitaminsko-mineralna predmešanica (Jata Emona, Slovenija)

<sup>b</sup>encim fitaza (DSM, Nizozemska)

Preglednica 11: Hranilna vrednost popolne krmne mešanice za kokoši nesnic (NSK) (Jata Emona, Slovenija)

Table 11: Nutrition value of complete feed mixture for laying hens (NSK) (Jata Emona, Slovenija)

hranila	količina	hranila	količina
surove beljakovine [g/kg]	173,00	vitamin A [IE/kg]	10.637,60
surove maščobe [g/kg]	48,91	vitamin D <sub>3</sub> [IE/kg]	2.500,00
surove vlaknine [g/kg]	35,14	vitamin E [mg/kg]	25,07
surovi pepel [g/kg]	118,25	vitamin K [mg/kg]	2,00
brezdušični izvleček [g/kg]	513,67	biotin [mg/kg]	0,24
škrob [g/kg]	387,31	vitamin B1 [mg/kg]	2,88
sladkor [g/kg]	32,67	vitamin B2 [mg/kg]	6,90
presnovna energija [MJ/kg]	11,44	vitamin B6 [mg/kg]	5,16
[kcal/kg]	2.734,30	vitamin B12 [mg/kg]	0,01
fosfor – skupni [g/kg]	6,00	niacin [mg/kg]	63,67
fosfor – izkoristljivi [g/kg]	4,80	kalcijev pantotenat [mg/kg]	13,73
kalcij [g/kg]	36,00	folat [mg/kg]	0,76
magnezij [g/kg]	2,11	arginin [g/kg]	11,14
kalij [g/kg]	7,71	glicin [g/kg]	7,33
natrij [g/kg]	1,60	serin [g/kg]	8,40
klor [g/kg]	1,50	histidin [g/kg]	4,42
železo [mg/kg]	91,97	izolevcin [g/kg]	7,56
mangan [mg/kg]	124,61	levcin [g/kg]	13,40
cink [mg/kg]	81,97	fenilalanin [g/kg]	8,27
baker [mg/kg]	14,45	tirozin [g/kg]	5,73
molibden [mg/kg]	0,58	valin [g/kg]	8,56
jod [mg/kg]	0,94	miristinska [g/kg]	0,06
kobalt [mg/kg]	0,40	palmitinska [g/kg]	4,25
fluor [mg/kg]	2,12	stearinska [g/kg]	1,38
selen [mg/kg]	0,32	oleinska [g/kg]	9,14

IE- internacionalna enota (1 IE vitamina A= 0,3  $\mu$ g retinola; 1 IE vitamina D = 0,025 holekalciferola/ergokalciferola)

### 3.4 METODE ZA ANALIZO IN KARAKTERIZACIJO NAVADNEGA VOLČJEGA JABOLKA

#### 3.4.1 Določitev zeaksantin dipalmitata in $\beta$ -kriptoksantin palmitata v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka

Osnovna raztopina zeaksantin dipalmitata (50  $\mu$ g/mL) je bila pripravljena v acetonu predhodno preprihanim z dušikom. Kot pomoč pri raztapljanju smo na začetku uporabili nekaj kapljic diklorometana. Delovne raztopine so bile pripravljene v koncentracijah 1–25  $\mu$ g/mL (1  $\mu$ g/mL; 2,5  $\mu$ g/mL; 5  $\mu$ g/mL; 10  $\mu$ g/mL; 25  $\mu$ g/mL). Za TLC analizo smo osnovno raztopino zeaksantin dipalmitata razredčili z acetonom, kateremu smo dodali 0,1 % TBHQ, in razredčili do koncentracije 5  $\mu$ g/mL. Tako pripravljene raztopine smo hranili na  $-80$  °C.

Za pripravo testnih raztopin navadnega volčjega jabolka (povečanih čaš in jagod) smo uporabili kot ekstrakcijsko topilo mešanico tetrahidrofurana (THF) in metanola (1:1, v/v). Petdeset mg jagod ali povečanih čaš, ki so bile predhodno zmlete z dismembratorjem (1700 rpm, 1 min, vzorci pred mletjem zamrznjeni s tekočim dušikom), smo trikrat po 5 min ekstrahirali s 5 mL zgoraj opisanega ekstrakcijskega topila v ultrazvočni kopeli, nato pa smo ekstrakt centrifugirali 1 min pri 4000 rpm. Vse tri ekstrakte smo nato filtrirali skozi 0,45  $\mu$ m PVDF filter in jih do HPLC analize hranili na  $-80$  °C.

Za HPLC analizo zeaksantin dipalmitata smo uporabili kolono ProntoSIL C<sub>30</sub> (podpoglavje 3.1.4.3), ki je bila termostatirana na 27 °C. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanici (A) acetona in 1 M TEAA pH 7 (99:1, v/v) ter (B) metanola, acetona in 0,5 M TEAA (14:5:1, v/v/v). Separacija je potekala 28 min s pretokom 2,5 mL/min, detekcija pa pri valovni dolžini 450 nm. Gradient je bil naslednji: 6,8 min 100 % B, 1,2 min 0–100 % A, 16 min 100 % A, 4 min 100 % B. Volumen injiciranja testnih raztopin in standardov je bil 10  $\mu$ L.

### **3.4.2 TLC presejalna metoda za določanje triterpenoidov na površini povečanih čaš in jagod**

V jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka smo po postopku, ki ga je razvil Martelanc s sodelavci (2009), ugotavljali prisotnost 11 triterpenoidov: lupeola,  $\alpha$ - in  $\beta$ -amirina, lupenona, lupeol acetata, cikloartenola, cikoartenol acetata, fridelina, betulinske, oleanolne in ursolne kisline in dveh fitosterolov:  $\beta$ -sitosterola in stigmasterola.

Osnovne standardne raztopine triterpenoidov s koncentracijo 0,1 mg/mL smo pripravili v 1-propanolu. Delovne standardne raztopine s koncentracijo 25  $\mu$ g/mL pa smo pripravili z redčenjem osnovnih standardnih raztopin. Za pripravo zmesi vseh 13 triterpenoidov (MIX13) smo po 1 mL vseh delovnih standardnih raztopini (25  $\mu$ g/mL) zmešali, odparili pod dušikom do suhega in ponovno raztopili v 1 mL 1-propanola.

Za pripravo testnih raztopin smo jagode navadnega volčjega jabolka (250,6 g) namakali 2 min v 100 mL diklorometana, medtem ko smo povečane čaše (5,9 g) namakali 1 min v 300 mL diklorometana. V obeh primerih smo topilo odparili do suhega. Suha ekstrakta smo stehali in ju raztopili v ustreznem volumnu kloroforma, da smo dosegli koncentracijo 10 mg/mL. Alikvot (1 mL) smo odparili do suhega pod dušikom in suhi ostanek raztopili v 1 mL 1-propanola. Zaradi slabe topnosti smo vialo segreti s fenom in nato pustili, da se termostatira na sobno temperaturo. Na koncu smo filtrirali skozi 0,45  $\mu$ m PVDF filter.

Priprava detekcijskega reagenta je potekala v ledeni kopeli. Metanolu (170 mL) smo dodali 20 ml očetne kisline. Po kapljicah smo mu dodali 16 mL koncentrirane žveplove(VI) kisline in nato še 1 mL *p*-anisaldehida (Jork in sod., 1989).

TLC analiza je potekala na plošči HPTLC silikagel 60 dimenzije 20 cm x 10 cm. Ploščo smo pred analizo razvili v mešanici kloroform:metanol (1:1, v/v) in jo nato 30 min sušili v

sušilniku pri 110 °C. S pomočjo ATS4 smo v 6 mm dolge lise, ki so bile 4 mm narazen, 10 mm od spodnjega roba nanесли 10  $\mu$ L vsakega od 13 delovnih raztopin standardov (25  $\mu$ g/mL), 10  $\mu$ L MIX13 (25  $\mu$ g/mL), 7  $\mu$ L testne raztopine jagod (10 mg/mL) ter 15  $\mu$ L testne raztopine povečanih čaš (10 mg/mL). Ploščo smo razvijali v horizontalni kadi – tank konfiguracija do razdalje 8 cm s 5 mL topila za razvijanje *n*-heksan:etilacetat (5:1, v/v) in 15 mL iste mešanice v tanku. Ploščo smo posušili do suhega in jo derivatizirali. To smo storili tako, da smo ploščo s pomočjo naprave za potapljanje plošč za 2 s potopili v detekcijski reagent (glej podpoglavje 3.2.7.3) in jo nato 2 min segrevali z grelcem za plošče (110 °C). Po končani derivatizaciji smo ploščo slikali s pomočjo dokumentacijskega sistema DigiStore pri UV<sub>366</sub> in beli svetlobi.

### 3.4.3 Kvantitativna TLC določitev sladkorjev

Za kvantitativno določanje sladkorjev na TLC plošči smo uporabili metodo, ki se rutinsko izvaja v našem laboratoriju (Pukl in Prošek, 1990).

Za pripravo mešanice standardov v raztopini koncentracije 0,05 mg/mL smo natehtali 5,0 mg posameznega standarda sladkorja (glukoze, fruktoze in saharoze) in jih v 100 mL merilni bučki raztopili v 20 mL destilirane vode ter dopolnili z metanolom do oznake. Testne raztopine jagod in čaš navadnega volčjega jabolka pa smo pripravili tako, da smo natehtali 50 mg fino mletih čaš v 20 mL merilno bučko in 10 mg fino mletih jagod v 20 mL merilno bučko, dodali v vsako bučko 4 mL destilirane vode, premešali in dodali 4 mL metanola ter za 10 minut postavili v ultrazvočno kopel. Po termostatiranju na sobno temperaturo smo dopolnili do oznake z metanolom, premešali in filtrirali skozi filter papir.

TLC analiza je potekala na silikagelni HPTLC plošči. Raztopine standardov sladkorjev (volumen nanosa: 2, 3, 4, 5 in 6  $\mu$ L) ter testnih raztopin (volumen nanosa 2 in 4  $\mu$ L) so bile nanešene 10 mm od spodnjega roba v črte z dolžino 6 mm. Ploščo smo razvili 2-krat do iste višine (8 cm) v kadi s prekatom z uporabo 0,5 % NST-ja (m/v) v mešanici topil etilacetat:voda:metanol (17:3:0,25; v/v/v). Med obema razvijanjema smo ploščo posušili v sušilniku (5 min pri 110 °C). Po drugem razvijanju smo ploščo s pomočjo naprave za potapljanje plošč za 4 s potopili v detekcijski reagent DAP, ki smo ga pripravili tako, da smo raztopili difenilamin (4 g) in anilin (4 g) v metanolu (160 mL) in mu počasi dodajali fosforno kislino (40 mL).

### 3.4.4 TLC presejalna metoda za detekcijo flavonoidov in spojin, ki reagirajo z reagentom DPPH

Priprava testnih povečanih čaš navadnega volčjega jabolka je potekala s sukcesivno ekstrakcijo. V tri Carousel epruvete smo natehtali 0,6 mg suhih in zmletih povečanih čaš navadnega volčjega jabolka in v vsako dodali 10 mL *n*-heksana. Ekstrakcija je potekala v zatemnjenem prostoru v napravi Carousel 12 Plus 30 min pri sobni temperaturi v dušikovi

atmosferi in mešanjem pri 650 rpm. Po koncu ekstrakcije smo ekstrakt 10 min centrifugirali pri 4000 rpm. Supernatant smo odlili v epruvete za multivapor. Ta postopek smo ponovili še dvakrat. Ostanek smo po centrifugiranju posušili do suhega z dušikom. Ekstrakcijo smo nadaljevali po istem postopku z etilacetatom, metanolom in na koncu s 70 % (v/v) metanolom v vodi. Ekstrakte v istem topilu iz iste epruvete smo združevali. Po končani ekstrakciji smo topilo odstranili pod znižanim tlakom z multivaporjem do suhega in ostanek po tehtanju raztapljali v 1,5 mL etanola. Celotno ekstrakcijo smo izvajali v treh ponovitvah. Testne raztopine smo do analize hranili v skrinji na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Za TLC detekcijo fenolnih spojin smo uporabili standardne raztopine kvercetina, luteolina, luteolin-7-glikozida, klorogenske in kavne kisline s koncentracijo 0,1 mg/mL, pripravljenev metanolu in jih hranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

TLC analiza je potekala na plošči HPTLC silikagel 60 z dimenzijami 20 cm x 10 cm. Pred nanosom vzorcev smo ploščo 30 min deaktivirali z vodo, tako da smo ploščo v horizontalni kadi izpostavili vodnim hlapom. S pomočjo Linomata 5 smo 4  $\mu\text{L}$  vzorca ali 1  $\mu\text{L}$  standardov nanесли v 6 mm dolge črte, ki so bile 4 mm narazen. Ploščo smo razvijali v kadi s prekatom do višine 7 cm od spodnjega roba plošče z 10 mL topila za razvijanje etilacetat:mravljična kislina:voda (85:10:15, v/v/v). Ploščo smo posušili do suhega in jo derivatizirali z 2–3 s potopom v 1 % (m/v) 2-aminoetil-difenilborinat (NST) v etilacetatu (Jork in sod., 1989). Ploščo smo 3–5 min sušili na grelni plošči. Za ojačanje intenzitete fluorescence smo ploščo potopili v zmes tekoči parafin:*n*-heksan (1:2, v/v). Pred in po derivatizaciji smo ploščo slikali s pomočjo dokumentacijskega sistema DigiStore pri  $\text{UV}_{366}$ .

Detekcija prostih radikalov s pomočjo TLC je potekala po enakem postopku kot detekcija flavonoidov, le da smo v tem primeru namesto potapljanja v detekcijski reagent razpršili po plošči raztopino 0,01 mmol/L DPPH v etanolu. Po 30 min smo ploščo slikali s pomočjo dokumentacijskega sistema DigiStore pri vidni svetlobi.

Za določanje sposobnosti reakcije karotenoidov z DPPH reagentom smo uporabili metodo, ki so jo opisali Rodič in sod. (2012) in sicer tako, da smo plošče (HPTLC slikagel 60 RP-18) pred uporabo sprali s topilom za razvijanje metanol:aceton:*n*-heksan (1:1:1). Testne raztopine in standardne raztopine smo nanесли v 10  $\mu\text{L}$  z uporabo ATS4 v 6 mm dolge črte, 10 mm od spodnjega roba. Razvijanje je potekalo do višine 7 cm v kadi s prekatom. Ploščo smo takoj dokumentirali s pomočjo dokumentacijskega sistema DigiStore in nato po njej razpršili DPPH reagent kot je opisano v prejšnjem odstavku. Celotna analiza je potekala v zatemnjenem prostoru.

Detekcijo prostih radikalov s pomočjo TLC smo naredili tudi za triterpenoide, pri čemer je TLC analiza potekala po postopku opisanem v podpoglavu 3.4.2 in sicer brez potapljanja v detekcijski reagent.



### 3.4.5 Spektrofotometrične metode za določitev antioksidativne aktivnosti ekstraktov

Priprava testnih raztopin je potekala po postopku opisanem v podpoglavju 3.4.4. Metode določanja antioksidativne aktivnosti so bile povzete po Terpinč in sod. (2011).

#### 3.4.5.1 Metoda Folin-Ciocalteu

V mikrocentrifugirke smo dodali ustrezno redčeni testni raztopini (200  $\mu$ L) redčeni Folin-Ciocalteu reagent (redčen z bidestilirano vodo v razmerju 1:2). Vsebinsko smo premešali in dodali 125  $\mu$ L 20 % (m/v) raztopine natrijevega karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) in 550  $\mu$ L bidestilirane vode. Od tu naprej smo začeli meriti čas, vmes smo raztopino premešali ter 10 min centrifugirali (13000  $\text{obr}^{-1}$ ). Po 40 min od dodatka zadnjega reagenta smo izmerili absorbanco pri 765 nm ( $A_{765\text{nm}}$ ) proti slepemu vzorcu, ki smo ga pripravili na enak način, le da smo namesto vzorca dodali 200  $\mu$ L bidestilirane vode. Delali smo v treh ponovitvah za vsak vzorec. Če je vzorec premalo redčen, nastane temno moder kompleks že takoj po prvi minuti.

Po istem postopku smo pripravili umeritveno krivuljo, pri čemer smo namesto 200  $\mu$ L vzorca dodali 10–80  $\mu$ L galne kisline v etanolu (1 mg/mL) in ustrezno količino etanola do skupnega volumna 200  $\mu$ L. Vsako točko umeritvene krivulje smo pripravili v 3 ponovitvah. Iz umeritvene krivulje smo izračunali vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcu, izraženo kot ekvivalent galne kisline.

#### 3.4.5.2 Določanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov z reagentom DPPH

Za pripravo 0,1 mmol/L reagenta DPPH (1,1'-difetil-2-pikrilhidrazil) smo zatehtali 1,97 mg DPPH v 50 mL merilno bučko ter dopolnili do oznake z etanolom. Uporabljali smo največ 2 dni star reagent, ki je bil v hranjen v hladilniku.

V kiveto smo odmerili 2,9 mL reagenta DPPH ter 0,1 mL ustrezno razredčene testne raztopine. Vsebinsko smo takoj premešali in po 30 min izmerili absorbanco pri 517 nm ( $A_{vz\ 517\text{nm}}$ ) petih različnih redčitev tesnih raztopin v dveh ponovitvah. Redčenje testnih raztopin je bilo določeno za posamezni ekstrakt glede na sposobnost redukcije DPPH v območju okoli 50 % redukcije. Za kontrolni vzorec pa smo namesto 0,1 mL ustrezne redčene raztopine odmerili v kiveto 0,1 mL etanola in takoj izmerili absorbanco pri 517 nm ( $A_{k\ 517\text{nm}}$ ).

Sposobnost antioksidantov za lovljenje prostih radikalov smo izrazili s koncentracijo antioksidantov, ki je potrebna, da se količina prostega radikala zmanjša za 50 % ( $EC_{50}$ ). Enačbe 11 – 13 so potrebne za izračun  $EC_{50}$ , kjer  $k$  pomeni naklon premice,  $A_{vz\ 517\text{nm}}$  absorbanco vzorca pri 517 nm in  $A_{k\ 517\text{nm}}$  absorbanco kontrolnega vzorca.

$$\text{delež preostalega DPPH} := \frac{A_{vz\ 517\text{nm}}}{A_{k\ 517\text{nm}}} \cdot 100 \% \quad \dots(11)$$

$$\text{delež preostalega DPPH} := 100 \% - k \cdot \text{koncentracija antioksidanta} \quad \dots(12)$$

$$EC_{50} = -\frac{50\%}{k} \quad \dots(13)$$

### 3.4.5.3 Sposobnost redukcije ionov $Fe^{3+}$ v $Fe^{2+}$

Najprej smo pripravili 1 % (m/v) raztopino železovega(III)klorida ( $FeCl_3$ ), 20 % (m/v) raztopino triklorocetne kisline ( $CCl_3COOH$ ), 1 % (m/v) raztopino kalijevega heksacianoferata(III) ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) ter fosfatni pufer pH 6,8. Slednjega smo pripravili tako, da smo natehtali 3,38 g  $KH_2PO_4$  in 3,38 g  $Na_2HPO_4$  v 1 L bidestilirane vode in pH uravnali z dodatkom NaOH. Tudi vse ostale raztopine so bile pripravljene z bidestilirano vodo.

V stekleno epruveto smo odmerili reagente v sledečem zaporedju: 0,5 mL ustrezno razredčene testne raztopine, 2,5 mL fosfatnega pufera pH 6,8, 2,5 mL raztopine  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 2,5 mL raztopine  $CCl_3COOH$ . Po premešanju centrifugiramo 10 min pri 13000 obr<sup>-1</sup>. Nato v novo stekleno epruveto odmerimo po sledečem zaporedju naslednje reagente 2,5 mL supernatanta, 2,5 mL bidestilirane vode, 1mL raztopine  $FeCl_3$  in premešamo ter po 25 min pomerimo absorbanco pri 740 nm ( $A_{740nm}$ ) proti slepemu vzorcu. Slepi vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali 0,5 mL ustreznega topila.

Sposobnost redukcije  $Fe^{3+}$  ionov smo izračunali s pomočjo linearne regresijske analize z metodo najmanjših kvadratov in sicer iz grafa odvisnost absorbance pri 740 nm ( $A_{740nm}$ ) od koncentracije antioksidantov. Rezultat smo izraz izrazili kot naklon premice ( $C_R$ ).

## 3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Opisno statistiko rezultatov analiz (srednja vrednost, RSD, mediana, MIN, MAKS.), smo izvedli s pomočjo programa Excel (MS Office 2010), medtem ko smo analizo variance (ANOVA), metodo glavnih osi (PCA) in toplotni graf, za rezultate analiz ksantofilov v jajcih s slovenskega trga, naredili s pomočjo programa MatLab 7.12.0 (R2011a).

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 KSANTOFILI V RUMENJAKU

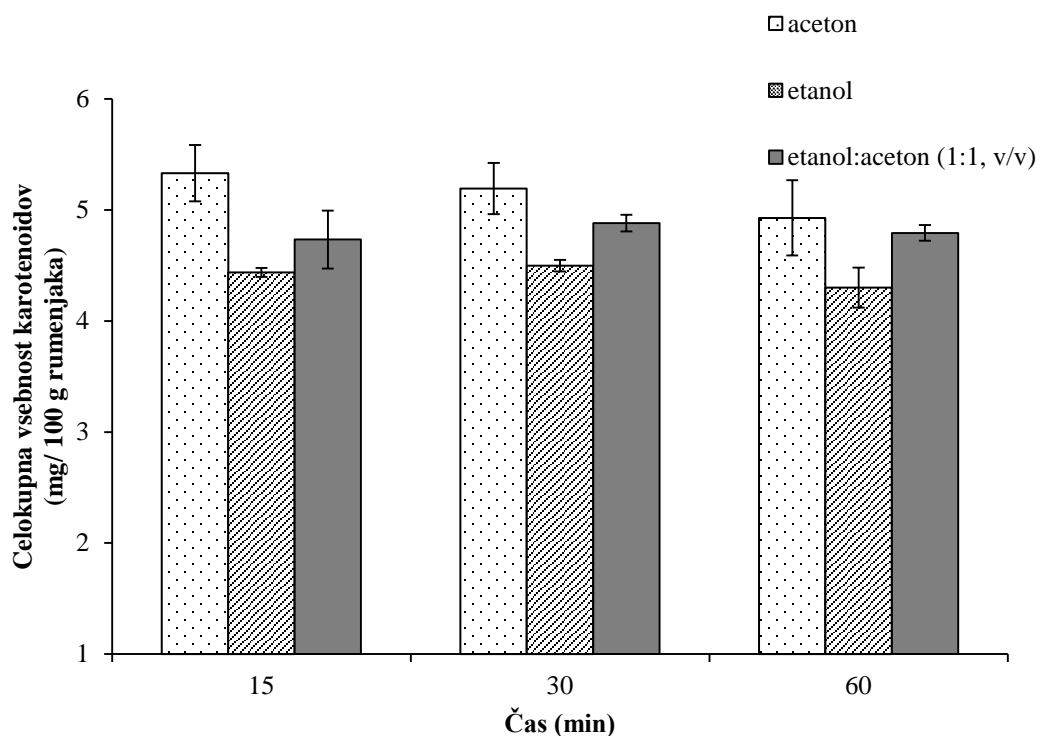
#### 4.1.1 Razvoj HPLC metode za določanje karotenoidov v rumenjaku

Po znanih literaturnih podatkih (Schlatterer in Breithaupt, 2006) je bila razvita gradientna ločba vseh osmih ksantofilov (MIX8), ki pa ima nekaj pomanjkljivosti, kot so: dolg čas ločbe, slaba ločba 8'-apo- $\beta$ -karotenala in kantaksantina. Zato smo razvili novo, izokrasko ločbo 8 ksantofilov (MIX8 s koncentracijo okoli 2  $\mu\text{g/mL}$ ), ki so lahko prisotni v perutninski krmi (Brulc in sod., 2013). Razvoj HPLC metode s separacijo na koloni C<sub>30</sub> je obsegal naslednje stopnje: optimizacija priprave testnih raztopin, optimizacija mobilne faze, vpliv temperature kolone na ločbo in primerjavo kolon za ločbo karotenoidov.

##### 4.1.1.1 Optimizacija priprave testnih raztopin

Izmed preučevanih ekstrakcijskih topil (acetone; etanol; etanol:acetone, 1:1, v/v) smo največji izplen karotenoidov dobili z uporabo acetona. Najboljše topilo smo izbrali s pomočjo merjenja absorbance pri 450 nm. Optimizirani čas ekstrakcije na reakcijski postaji Carousel 12 Plus (650 rpm) ob stalnem mešanju pod dušikovo atmosfero je bil 15 min. Manjši izplen smo dobili pri ekstrakciji, ki je potekala 30 min ali 1 h pod dušikom in zrakom (slika 8).

Boljša občutljivost določanja ksantofilov je bila omogočena zaradi optične poti 5 cm uporabljenega detektorja PDA. Slednji je omogočil tudi večje razmerje ekstrakcijskega topila glede na maso rumenjaka (10 mL ekstrakcijskega topila na 0,5 g rumenjaka), v primerjavi s prej objavljenim (3,5 mL ekstrakcijskega topila na 1 g rumenjaka) (Pérez – Gálvez in sod., 2008), katerega namen je bil isti. To je omogočilo boljšo učinkovitost ekstrakcije, pri HPLC analizi pa manjšo obremenitev kolone z vzorcem. Pri izračunu smo ravno tako upoštevali vodo, ki predstavlja polovico preiskovanega vzorca. V našem primeru je bilo 0,25 mL vode, ki je povečala celokupen volumen ekstrakta. V literaturi so opisani bolj zapleteni primeri priprave testnih raztopin, ki vključujejo med drugim tudi saponifikacijo (Hammershøj in sod., 2010). Za rutinsko analizo velikega števila vzorcev je najbolj praktična rešitev enojna ekstrakcija. Zaradi nizke ekstrakcijske učinkovitosti pa so možne izgube. S pomočjo trojne ekstrakcije v treh ponovitvah iz istega rumenjaka, ki je na 100 g vseboval 3,10 mg luteina, 1,95 mg zeaksantina, 1,55 mg kantaksantina in 0,58 mg etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat smo prišli do ugotovitve, da je učinkovitost enojne ekstrakcije 91,2 % za lutein, 91,0 % za zeaksantin, 91,4 % za kantaksantin in 92,7 % za etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat. Pri tretji ekstrakciji je bil v testni raztopini v merljivi koncentraciji prisoten le lutein. Pridobljeni podatki kažejo, da je potrebna dvojna ekstrakcija za skoraj 100 % izplen. Pri izvajanju enojne ekstrakcije je včasih dovolj le upoštevanje povprečnega faktorja učinkovitosti ekstrakcije, ki znaša 0,92, ker večkratna ekstrakcija ni primerna, kadar je potrebno analizirati veliko število vzorcev.

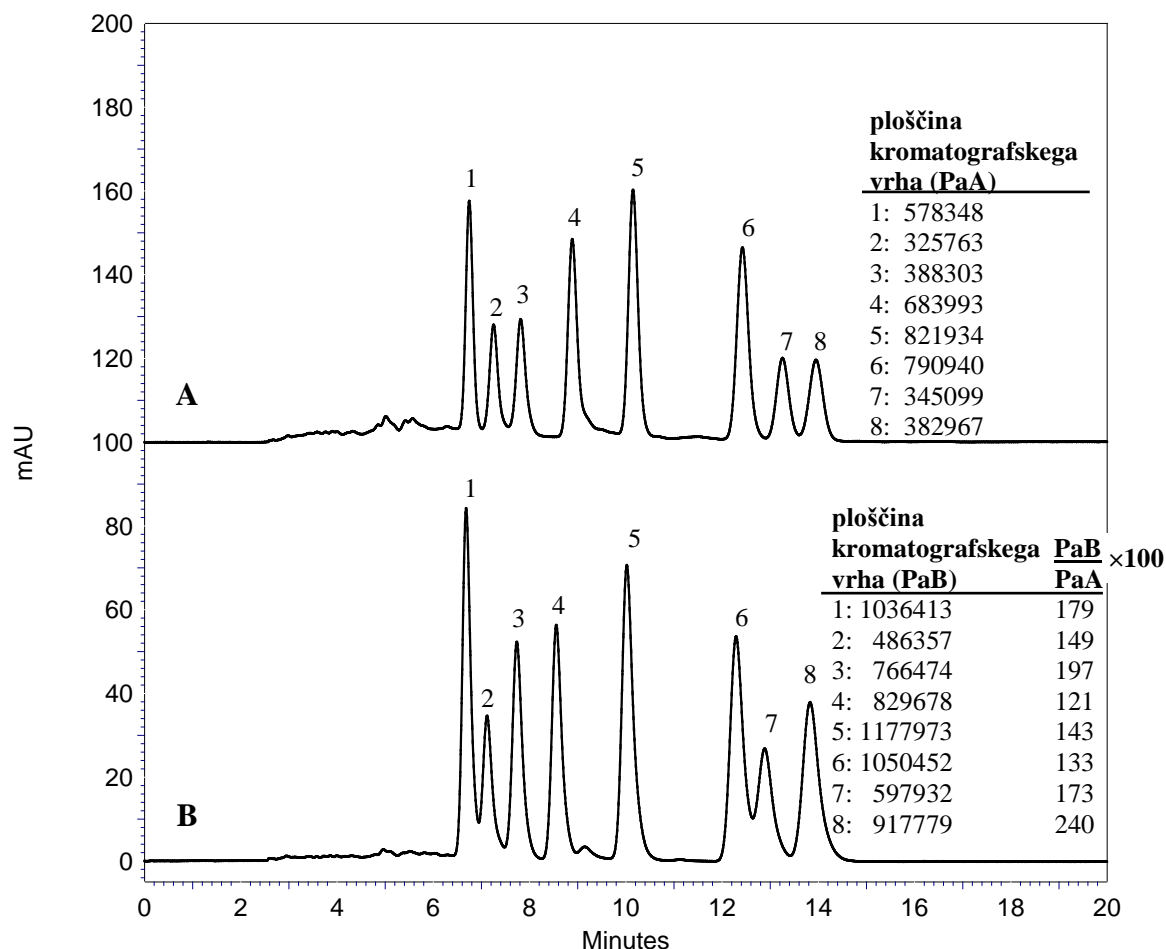


Slika 8: Vpliv ekstrakcijskega topila in časa na vsebnost celokupnih karotenoidov v rumenjaku

Figure 8: Influence of extraction solvent and time on the yield of total carotenoids from yolk

#### 4.1.1.2 Optimizacija mobilne faze

Boljšo selektivnost pri ločbi karotenoidov dosežemo z uporabo kolon  $C_{18}$  s polimerno stacionarno fazo, kot z uporabo kolon  $C_{18}$  z monomerno stacionarno fazo, kot najboljše pa so se izkazale kolone  $C_{30}$  (Sander in sod., 1994; Zhu in sod., 1996; Albert, 1998). Pri koloni  $C_{30}$  je med drugim dobro poznan relativno močan vpliv temperature kolone na kromatografsko ločbo (Bell in sod., 1997; Pursch in sod., 1996; Böhm, 2001; Sander in sod., 2000). Za izokratsko ali gradientno elucijo karotenoidov na koloni  $C_{30}$  so se pogosto uporabljala različna razmerja mešanice acetona in vode (Glaser in sod., 2003; Dachtler in sod., 2001; Albert, 1998). Tudi v našem primeru je mobilna faza acetona:voda (93:7, v/v) pri pretoku 1 mL/min omogočila ločbo mešanice ksantofilov MIX8, in sicer v manj kot 18 min (slika 9A). Temperatura kolone je pomembno vplivala na ločbo prvih (lutein, kapsantin, zeaksantin) in zadnjih (etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, citranaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin) treh eluiranih ksantofilov. Optimalna ločba je bila dosežena pri temperaturi kolone 21 °C.



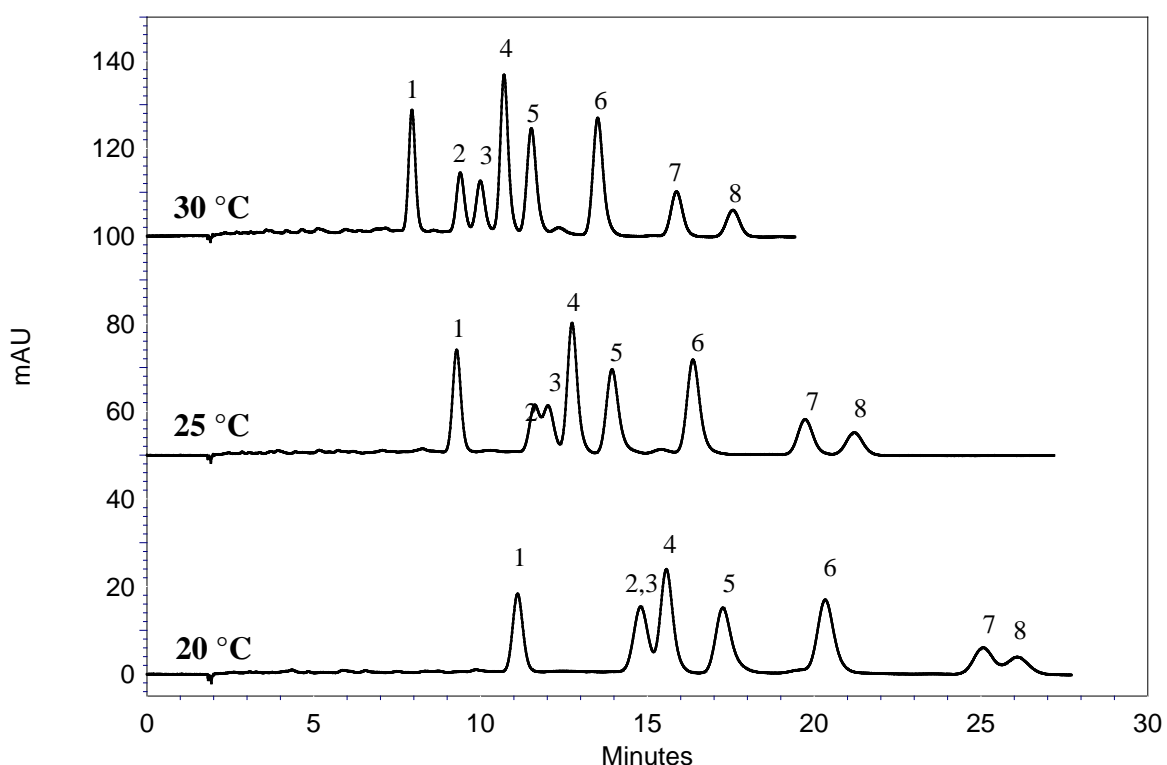
Slika 9: HPLC kromatograma ksantofilov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7),  $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilna faza aceton:voda (93:7, v/v) (A); mobilna faza aceton:0,5 M TEAA pH 7 (93:7, v/v) (B)

Figure 9: HPLC chromatograms of xanthophylls lutein (1), capsanthin (2), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4),  $\beta$ -apo-8'-carotenal (5), etil-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (6), citranaxanthin (7),  $\beta$ -criptoxanthin (8) from MIX8 on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase acetone:water (93:7, v/v) (A); mobile phase acetone:0.5 M TEAA pH 7 (93:7, v/v) (B)

Pri kromatografiji se je za izboljšanje eluiranja/izkoristka karotenoidov («column recovery») iz kolone pogosto dodajal trietilamin in/ali amonijev acetat (Burns-Withmore in sod., 2010; Řezanka in sod., 2009; Rivera in Canela-Garayoa, 2012), vendar nikoli v mešanico aceton:voda, ker mobilna faza z acetonom ne sme biti bazična. Nedavno je bil uspešno dodan 1 M TEAA pufer pH 7 mobilni fazi, sestavljeni iz acetona in vode, za določanje luteina v špinači (Simonovska in sod., 2013). Pri mobilni fazi aceton:voda 93:7 (v/v) z uvedbo 0,1 M TEAA pufru pH 7 v mobilno fazo se občutno poveča ploščina kromatografskih vrhov vseh analitov, pri zelo majhni spremembi retencijskega časa (slika 9B). Optimalna temperatura ločbe z uporabo tega pufru je 19 °C. Povečanje ploščine vrhov

verjetno odseva kemično stabilnost analitov. Najbolj nestabilni preiskovani analit bi bil v tem primeru  $\beta$ -kriptoksantin.

Ločba kapsantina in zeaksantina z uporabo mobilne faze aceton:metanol 1:4 (v/v), pri pretoku 1,5 mL/min in temperaturi kolone 25 °C ni popolna, vendar so vsi ostali karotenoidi med seboj dobro ločeni. Ploščine kromatografskih vrhov so občutno manjše v primerjavi s tistimi dobljenimi pri uporabi mobilne faze aceton:voda (93:7, v/v) in pretoku 1 mL/min. Pri temperaturi kolone 30 °C je bila v 20 min dosežena ločba vseh preiskovanih analitov na bazni liniji (slika 10).

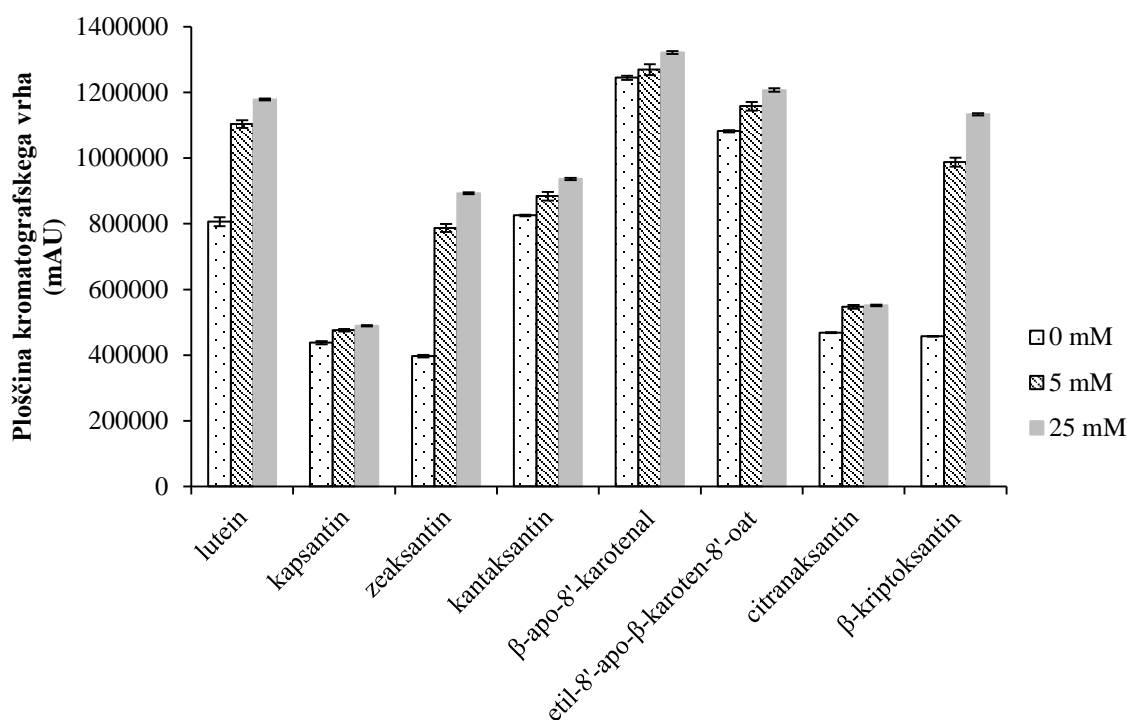


Slika 10: HPLC kromatogrami ksantofilov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7),  $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol (1:4, v/v) s pretokom 1,5 mL/min pri različnih temperaturah

Figure 10: HPLC chromatograms of xanthophylls lutein (1), capsanthin (2), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4),  $\beta$ -apo-8'-carotenal (5), etil-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (6), citranaxanthin (7),  $\beta$ -criptoxanthin (8) from MIX8 on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase acetone:methanol (1:4, v/v) with flow rate 1.5 mL/min at different temperatures

Z upoštevanjem kromatografskih parametrov in boljšega eluiranja analitov iz kolone («column recovery») je bil za nadaljnjo optimizacijo izbran trifazni sistem

aceton:metanol:voda (14:5:1, v/v/v). Učinek zamenjave vode z 0,1 ali 0,5 M TEAA pH 7 (5 mM ali 25 mM na celotno mobilno fazo) smo testirali pri 25 °C. Z zamenjavo vode z le 5 mM TEAA pH 7, se je občutno povečala ploščina kromatografskih vrhov  $\beta$ -kriptoksantina za 54 %, zeaksantina za 50 % in luteina za 27 % v primerjavi z mobilno fazo, ki je vsebovala vodo. Nadaljnje povečanje koncentracije TEAA pH 7 s 5 mM na 25 mM ni imelo tolikšnega učinka na povečanje ploščine kromatografskih vrhov, vendar pa je povečanje koncentracije povzročilo predvsem krajše retencijske čase (od 0,4 min za prve tri do 1 min za zadnje tri vrhove) brez vpliva na resolucijo (slika 11). Dodani pufer ni vplival na obliko vrhov. Za nadaljnje delo je bil izbran 25 mM pufer v mobilni fazi. Mešanica topil acetona, metanola in 0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v) je bila tako izbrana kot optimalna mobilna faza za ločbo karotenoidov MIX8.



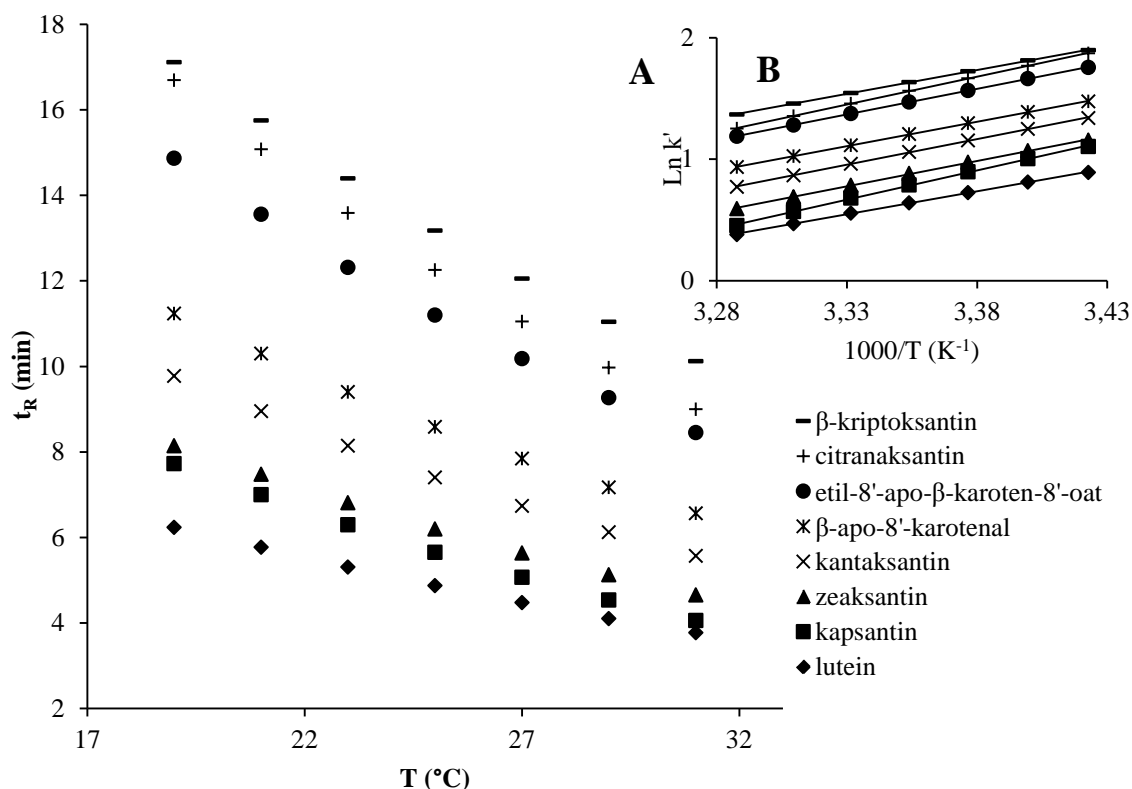
Slika 11: Povečanje ploščine kromatografskih vrhov na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), kot posledica dodatka različnih koncentracij TEAA pufera pH 7 k mobilni fazi aceton:metanol:voda (14:5:1, v/v/v), T = 25 °C, pretok 1 mL/min

Figure 11: Enhancement of the peak areas on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) by addition of buffer different concentrations TEAA pH 7 to the mobile phase acetone:methanol:water (14:5:1, v/v); T = 25 °C; flow rate 1 mL/min

#### 4.1.1.3 Vpliv temperature kolone

Vpliv temperature kolone na separacijo 8 izbranih ksantofilov smo preučevali sistematsko med 19 °C in 31 °C, z uporabo mobilne faze aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7. Rezultati predstavljeni na sliki 12 so skladni s prej objavljenimi, ki so temeljili na ločbi *all-E*-karotenoidov in *Z*-karotenoidov na stacionarni fazi C<sub>30</sub> z uporabo mobilne faze, sestavljene iz metil tert-butil etra (A) in metanola (B) pri gradientu 35 min 90 %–55 % B, 10 min 55–40 % B, 15 min 40 % B, 5 min 40–90 % B (Böhm, 2001) ter mešanice metanol:voda, 85:15, v/v (Bell in sod., 1997). Za vse preiskovane spojine je bila odvisnost retencijskega časa od temperature kolone inverzno linearna. To je bil po vsej verjetnosti rezultat relativno ozkega preiskovanega temperaturnega območja. Tudi van't Hoff-ova krivulja (odvisnost  $\ln(k')$  od  $1000/T$ , kjer je  $k'$  kapacitivnostni faktor in  $T$  temperatura v Kelvinih,) je bila za vse spojine linearna, z enakimi nakloni, razen pri kapsantinu in citranaksantinu (slika 12B). V širšem temperaturnem območju pa daje temperaturna odvisnost karotenoidov pri ločbi na stacionarni fazi C<sub>30</sub>, nelinearno van't Hoff-ovo krivuljo (Bell in sod., 1997). To je mogoče razložiti s tem, da ima stacionarna faza kljub povečani togosti alkilnih verig pri nizkih temperaturah boljši kontakt z linearnimi molekulami *all-E*-karotenoidov, kar ima za posledico daljšo retencijo in povečano selektivnost (Pursch in sod., 1996). Upognjene molekule *Z*-karotenoidov, katerih v tej študiji nismo zajeli, so pokazale odstopanje od linearnih van't Hoff-ovih krivulj (Bell in sod., 1997).

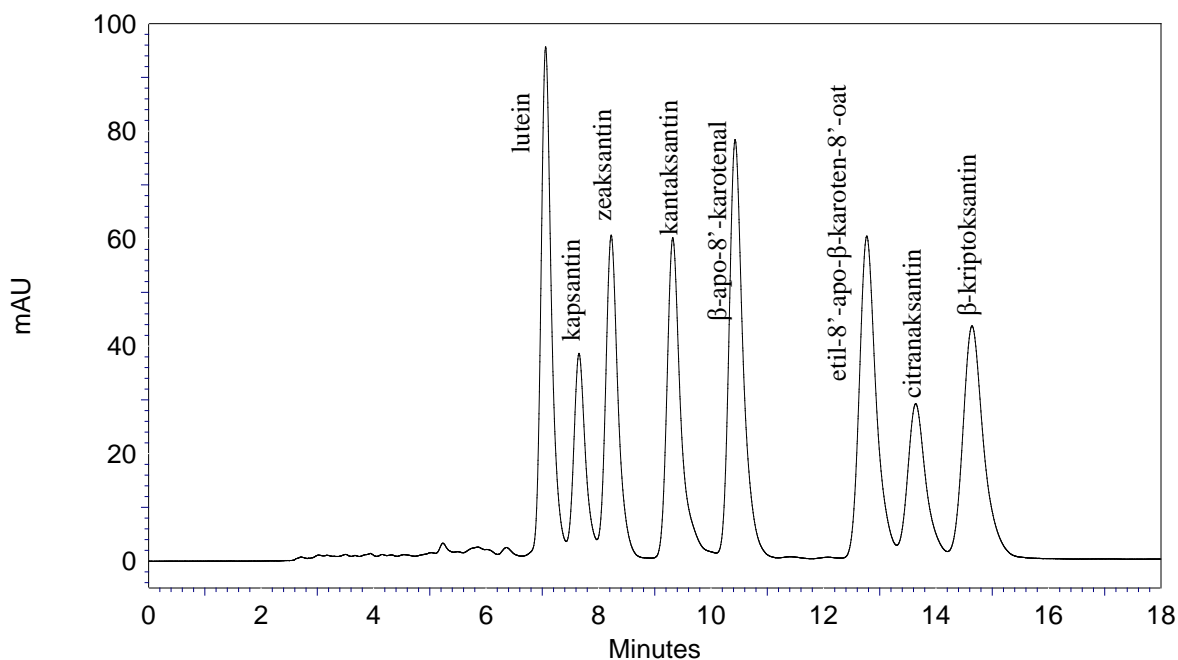




Slika 12: Vpliv temperature na retencijski čas ksantofilov (A) in van't Hoff-ova krivulja (B) na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1 v/v/v), pretok 1 mL/min

Figure 12: Influence of temperature on retention times of xanthophylls (A) and van't Hoff plot (B) on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase acetone:methanol:0.5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); flow rate 1 mL/min

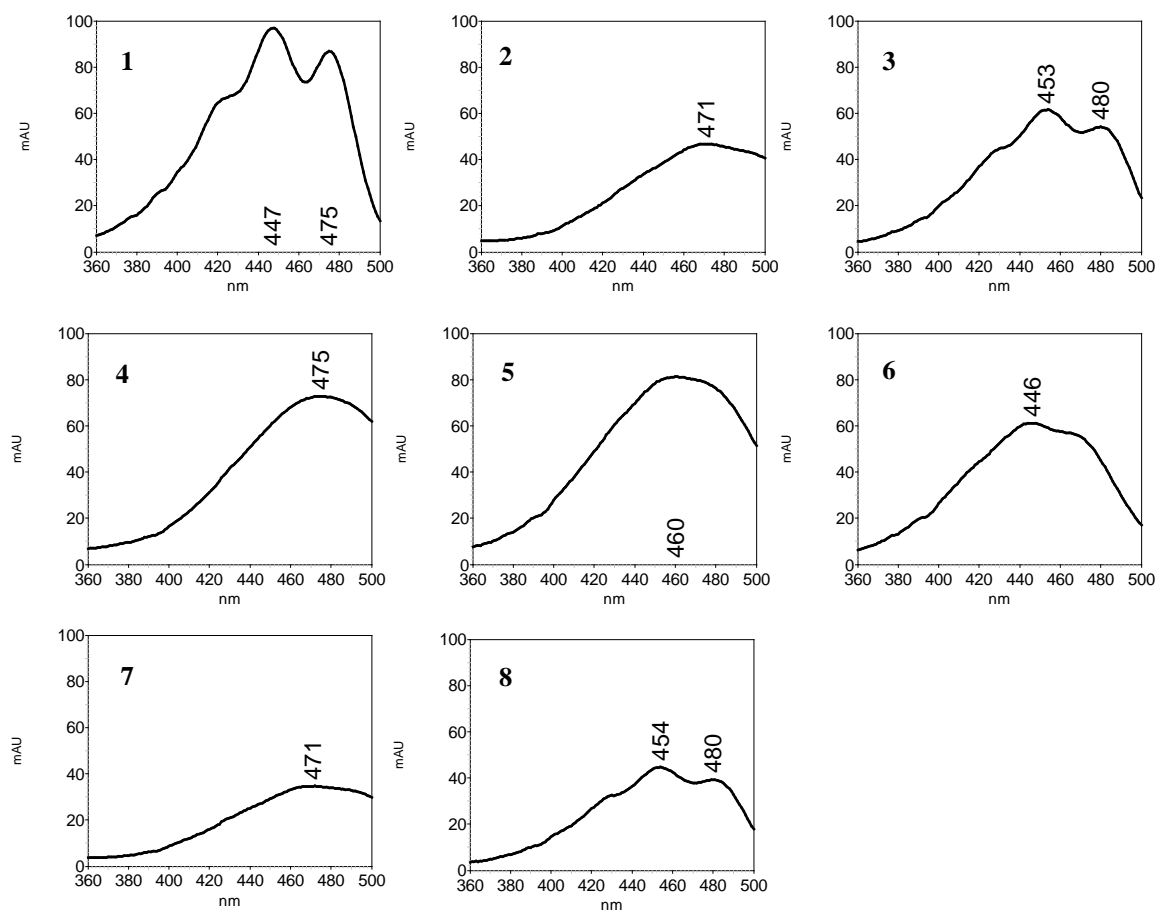
Podobno kot pri ločbi z mobilno fazo aceton:voda, 93:7 (v/v) je bil opažen odločilen vpliv temperature na selektivnost pri dveh skupinah spojin, pri prvih treh (lutein, kapsantin in zeaksantin) in pri zadnjih treh eluiranih spojinah (etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, citranaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin). Optimalna temperatura kolone za ločbo se tako giblje med 25 °C in 27 °C. Pri temperaturi 19 °C kapsantin in zeaksantin koeluirata, ravno tako citranaksantin in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat pri temperaturi nad 31 °C. Temperatura kolone 27 °C omogoča optimalno ločbo vseh osmih karotenoidov v 16 min (slika 13).



Slika 13: HPLC kromatogram ksantofilov MIX8 na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5 μm), mobilna faza aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 27 °C; pretok 1 mL/min

Figure 13: HPLC chromatogram of xanthophylls from MIX8 on ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase acetone:methanol:0.5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 27°C; flow rate 1 mL/min

Na sliki 14 so prikazani PDA spektri, ki so bili uporabljeni za identifikacijo spojin. Tudi Schlatterer in Breithaupt (2006) sta objavila PDA spektre pa tudi LC-(APCI)MS podatke o vseh osmih spojinah.



Slika 14: PDA spektri luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7),  $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m), ki so bili posneti med HPLC ločbo z uporabo mobilne faze aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v), T = 27  $^{\circ}$ C, pretok 1 mL/min

Figure 14: PDA spectra of lutein (1), capsanthin (2), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4),  $\beta$ -apo-8'-carotenal (5), etil-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (6), citranaxanthin (7),  $\beta$ -criptoxanthin (8) from MIX8 on ProntoSIL C<sub>30</sub> (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), obtained after the separation by acetone:methanol:0.5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 27  $^{\circ}$ C; flow rate 1 mL/min

#### 4.1.1.4 Primerjava kolon za ločbo karotenoidov

Reverznofazne kolone C<sub>30</sub>, mnogokrat imenovane kot »karotenoidne kolone«, se uvrščajo med najbolj primerne kolone za ločbo karotenoidov in njihovih izomerov (Sander in sod., 1994; Sander in sod., 2000). Do sedaj smo za analize ksantofilov v jajcih uporabili ProntoSIL C<sub>30</sub>, z velikostjo delcev 5  $\mu$ m, vendar smo zaradi vse večje izbire kolon na trgu hoteli preizkusiti, ali bi bila ločba na kateri izmed izbranih 7 novih kolon boljša kot na dosedanji. Za primerjavo smo izbrali tri kolone s poroznimi delci (»fully porous«) in pet kolon z delno poroznimi delci (»core-shell«), ki so podrobno opisane v podpoglavju 3.2.1.3.4 v preglednici 9. Naš cilj je bil optimizirati ločbo osmih karotenoidov MIX8 na

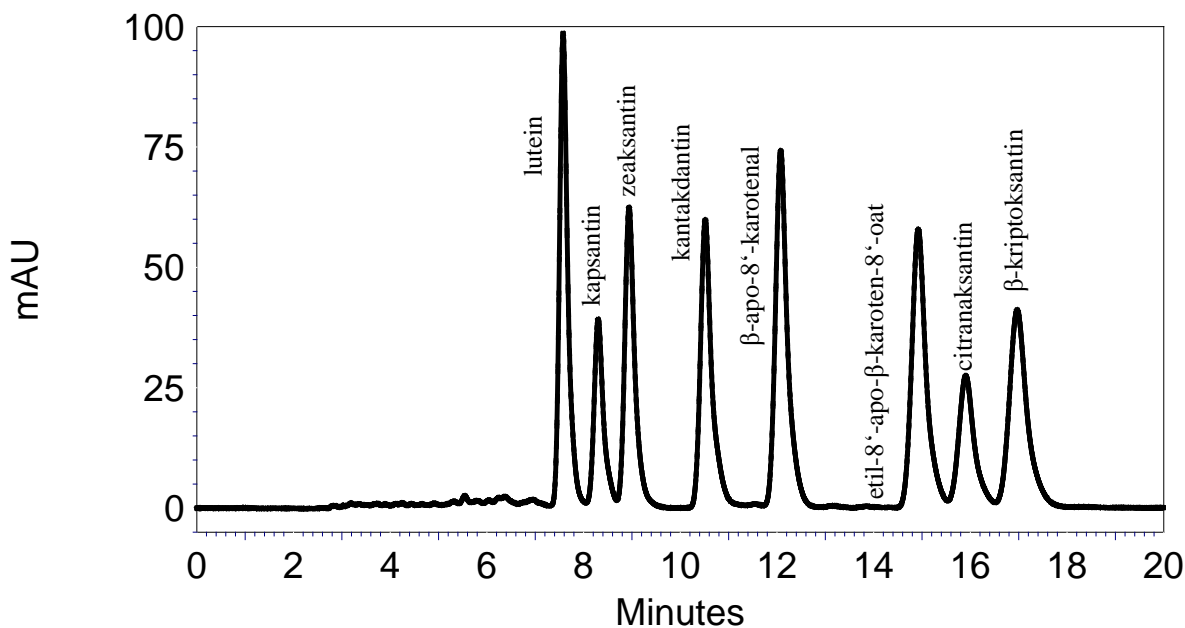
vsaki koloni ter določiti osnovne parametre, kot so resolucija, asimetrija – repanje (TF), število teoretskih podov (N), meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ).

#### 4.1.1.4.1 Primerjava kolon C<sub>30</sub> s poroznimi delci («fully porous»)

Primerjali smo tri reverznofazne kolone C<sub>30</sub> iste dimenzije (250 × 4,6 mm) dveh proizvajalcev (Bischoff Chromatography - ProntoSIL in Dionex – Acclaim) in z dvema velikostima delcev (3 in 5  $\mu$ m).

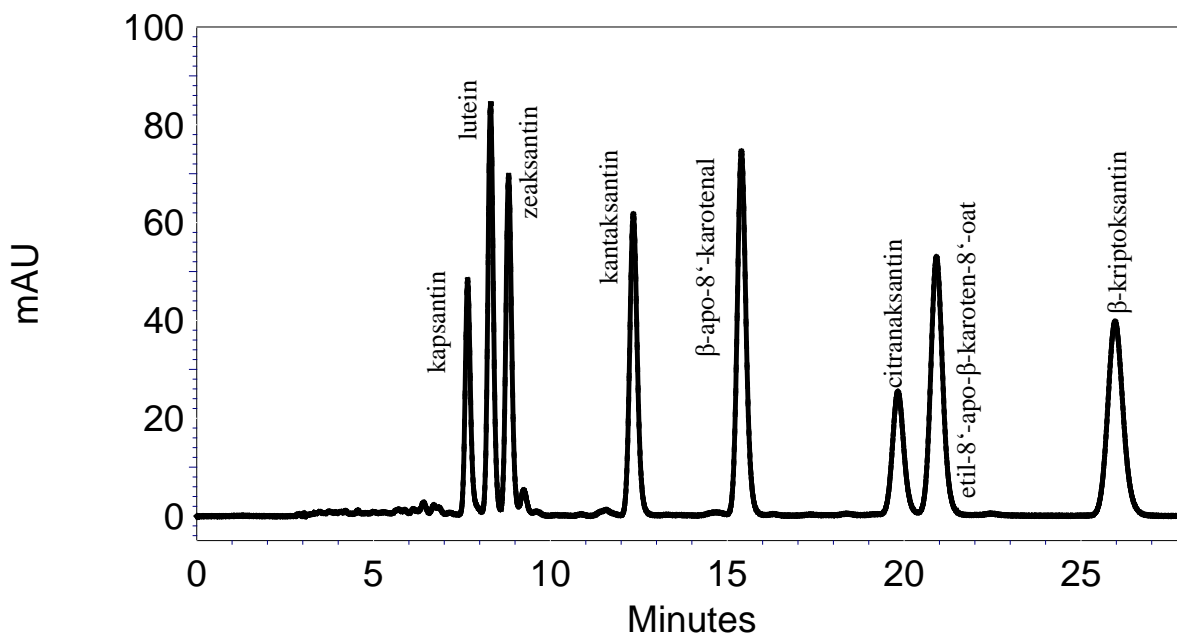
Obe koloni ProntoSIL C<sub>30</sub>, z velikostjo delcev 3  $\mu$ m (slika 15) in 5  $\mu$ m (slika 13), smo testirali z uporabo mobilne faze sestavljene iz acetona, metanola in 0,5 M TEAA pH 7 v razmerju 14:5:1 (v/v/v), pri pretoku 1 mL/min in temperaturi kolone 25 °C. Pri istih pogojih na koloni Acclaim z velikostjo delcev 5  $\mu$ m nismo uspeli ločiti luteina in zeaksantina. Tudi vrstni red eluiranih spojin se je spremenil, saj se je kapsantin iz kolone eluiral prvi, sledila pa sta mu lutein in zeaksantin. S povečanjem deleža metanola na končno razmerje aceton:metanol:0,5M TEAA pH 7, 8:11:1 (v/v/v) in z znižanjem temperature kolone na 17 °C smo dobili zadovoljivo ločbo, ki pa je relativno dolga in traja 35 min. Z zamenjavo metanola z acetonitrilom (aceton:acetonitril:0,5M TEAA pH 7) v razmerju 10:9:1 (v/v/v) pri temperaturi kolone 15 °C in pretoku 1 mL/min smo dosegli ločbo v 25 min (slika 16).

Prav temperatura pa je bila tisti dejavnik, ki nam je omogočil ločbo luteina in zeaksantina do bazne linije na koloni Acclaim. Z znižanjem temperature so alkilne verige bolj toge in urejene in je tako oteženo prodiranje spojin med alkilno fazo (Pursch in sod., 1996; Albert, 1998). Posledično se zaradi nizkih temperatur povečajo retencijski časi, vrhovi pa nižajo in širijo in s tem vplivajo na znižanje števila teoretskih podov (Pursch in sod., 1996; Albert, 1998). Spremenjeno zaporedje spojin, ki je identično tistemu na kolonah C<sub>18</sub> ter manjšo resolucijo med luteinom in zeaksantinom, lahko pripisujemo majhnemu deležu vezanega ogljika na stacionarno fazo ter blokiranju aktivnosti silanolnih skupin («end-capped»). Prav aktivnost silanolnih skupin naj bi imela velik vpliv na ločbo ksantofilov z  $\beta$ - in  $\epsilon$ -obročem (Matus in Ohmacht, 1990).



Slika 15: HPLC kromatogram ksantofilov iz MIX8 na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 3  $\mu$ m), mobilna faza aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); T = 25 °C; pretok 1 mL/min

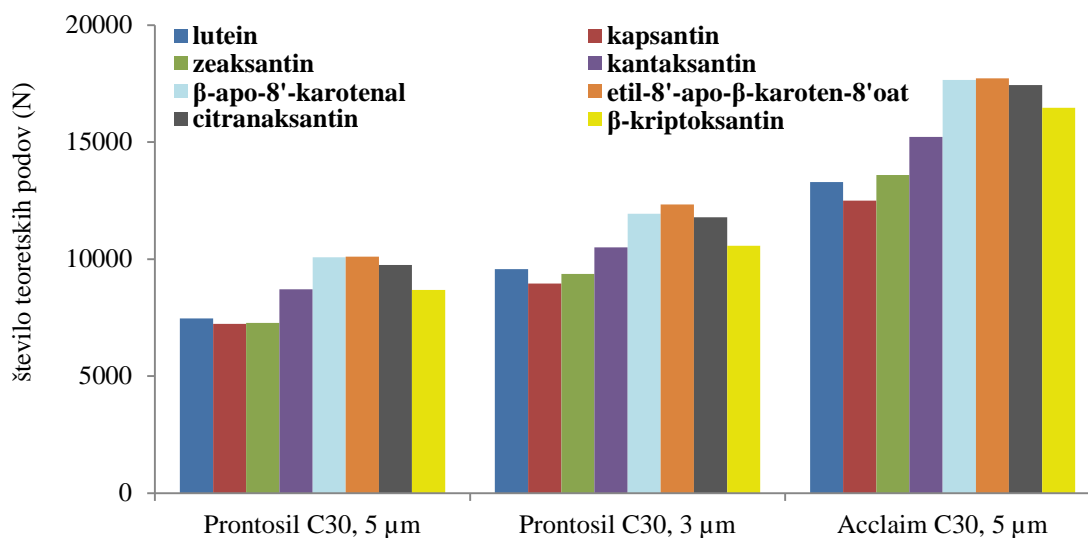
Figure 15: HPLC chromatogram of xanthophylls from MIX8 on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 3  $\mu$ m), mobile phase acetone:methanol:0.5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v); T = 25 °C; flow rate 1 mL/min



Slika 16: HPLC kromatogram ksantofilov iz MIX8 na koloni Acclaim C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilna faza acetone:acetonitril: 0,5 M TEAA pH 7 (10:9:1, v/v/v); T = 15 °C; pretok 1 mL/min

Figure 16: HPLC chromatogram of xanthophylls from MIX8 on Acclaim C<sub>30</sub> column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase acetone:acetonitrile:0.5 M TEAA pH 7 (10:9:1, v/v); T = 15 °C; flow rate 1 mL/min

Učinkovitost kolone se meri s številom teoretskih podov (glej podpoglavje 3.2.1.3.4). Na vrednost teoretskih podov vpliva predvsem dolžina kolone, velikost delcev, pretok, temperatura in viskoznost mobilne faze (Snyder in sod., 2010). Pri naših rezultatih (slika 17) vidimo zelo nizko število teoretskih podov, saj naj bi bila povprečna vrednost v optimalnih pogojih za kolono dimenzije 250 × 4,6 mm in velikostjo delcev 5  $\mu$ m okoli 20000 do 25000 za spojine molekulske mase 200 Da (Snyder in sod., 2010). To lahko pripišemo relativno velikim delcem (416–584 Da) in uporabi relativno viskoznih topil. Pri obeh ProntoSIL C<sub>30</sub> kolonah smo na kromatogramu MIX8 opazili razširjene vrhove in posledično ima ta kolona tudi manjše število teoretskih podov v primerjavi s kolono Acclaim C<sub>30</sub>. Razlog razširjenih vrhov je verjetno uporaba metanola v mobilni fazi.



Slika 17: Število teoretskih podov (N) za testirane RP kolone C<sub>30</sub> s poroznimi delci

Figure 17: Number of theoretical plates (N) for tested fully porous RP C<sub>30</sub> columns

Na ločljivost, ki je po definiciji kvocient razlike med retencijskima časoma dveh sosednjih vrhov in seštevka njunih širin, vplivajo narava topljenca in selektivnost stacionarne ter mobilne faze. Za zadovoljivo ločljivost morata biti sosednja kromatografska vrhova ločena do bazne linije, kar odgovarja ločljivosti  $\geq 1,5$  (za kromatografska vrhova približno enakih koncentracij). Kot je razvidno iz preglednice 12, je resolucija med vsemi kromatografskimi vrhovi  $\geq 1,6$ , kar pomeni, da so vse spojine MIX8 med seboj odlično ločene. Najboljšo resolucijo ima kolona Acclaim.

Preglednica 12: Resolucija med dvema sosednjima kromatografskima vrhovoma pri uporabi RP kolon C<sub>30</sub> s poroznimi delci (glej slike 13, 15 in 16)

Table 12: Resolution between each two neighbor pairs of chromatographic peaks when using RP C<sub>30</sub> columns with fully porous particles (look at figures 13, 15, 16)

kolone	pari vrhov						
	1 – 2	2 – 3	3 – 4	4 – 5	5 – 6	6 – 7	7 – 8
Prontosil C <sub>30</sub> , 5 $\mu$ m	1,9	1,6	3,0	2,9	5,3	1,7	1,6
Prontosil C <sub>30</sub> , 3 $\mu$ m	2,2	1,8	4,0	3,7	5,8	1,8	1,7
Acclaim C <sub>30</sub> , 5 $\mu$ m	2,3	1,7	10,0	7,1	8,3	1,8	7,0

zaželen  $\geq 1,5$

Oblika kromatografskih vrhov naj bi sledila Gaussovi krivulji, a v praksi se navadno srečujemo z vlečenjem vrhov na desno stran, t.i. repanjem vrhov. Pri vseh kolonah (preglednica 13) smo dobili kromatografske vrhove, katerih faktor repanja ni presegal meje

zaželene vrednosti, ki je  $\leq 1,5$  (Snyder in sod., 2010). Kolona Acclaim pa ima v primerjavi s kolonama ProntoSIL asimetrijo  $\leq 1,2$ , ki je skoraj neopazna s prostim očesom.

Preglednica 13: Asimetrija – faktor repanja (TF) kromatografskih vrhov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (7),  $\beta$ -kriptoksantina (8) pri uporabi RP kolon C<sub>30</sub> s poroznimi delci

Table 13: Peak asymetry – tailing factor (TF) of lutein (1), capsanthin (2), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4),  $\beta$ -apo-8'-carotenal (5), ethyl-8'-apo- $\beta$ -caroten-8'-oate (7),  $\beta$ -cryptoxanthin (8) when using RP C<sub>30</sub> columns with fully porous particles

<b>kolone</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
ProntoSIL C <sub>30</sub> , 5 $\mu$ m	1,3	1,2	1,2	1,5	1,3	1,3	1,3	1,2
ProntoSIL C <sub>30</sub> , 3 $\mu$ m	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,3	1,4	1,4
Acclaim C <sub>30</sub> , 5 $\mu$ m	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2

odličen TF  $\leq 1,2$ , zaželen  $\leq 1,5$ , dopustljiv  $< 2$  (Snyder in sod., 2010)

Ksantofilom iz MIX5 smo izmerili tudi mejo zaznavnosti (LOD) in mejo določanja (LOQ) na vseh treh kolonah (preglednica 14). Kolona Acclaim se je v primerjavi z ostalima dvema najboljše izkazala, saj so bile meje zaznavnosti in meje določanja mnogo nižje kot pri koloni ProntoSIL z isto velikostjo delcev (5  $\mu$ m).

Preglednica 14: Meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ) ksantofilov MIX5 pri uporabi RP kolon C<sub>30</sub> s poroznimi delci

Table 14: Level of detection (LOD) and level of quantization (LOQ) of xanthophylls in MIX5 when using RP C<sub>30</sub> columns with fully porous particles

<b>kolone</b>	<b>lutein</b>		<b>zeaksantin</b>		<b>kantaksantin</b>		<b><math>\beta</math>-apo-8'-karotenal</b>		<b><math>\beta</math>-kriptoksantin</b>	
	<b>ng/mL</b>		<b>ng/mL</b>		<b>ng/mL</b>		<b>ng/mL</b>		<b>ng/mL</b>	
	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
ProntoSIL C <sub>30</sub> , 5 $\mu$ m	26	79	13	41	28	86	32	96	36	92
ProntoSIL C <sub>30</sub> , 3 $\mu$ m	7	23	5	16	4	13	4	11	4	13
Acclaim C <sub>30</sub> , 5 $\mu$ m	2	7	3	10	3	10	4	13	11	33

Vse tri kolone so se pri danih pogojih izkazale kot primerne za kvantitativno določitev ksantofilov, saj smo pri vseh dobili zadovoljivo ločbo med kromatografskimi vrhovi preiskovanih ksantofilov. Sprememba velikosti delcev na manjše (s 5  $\mu$ m na 3  $\mu$ m) naj bi vplivala na povečanje teoretskih podov (Snyder in sod., 2010), vendar smo poleg vpliva na teoretske pode zaznali tudi izboljšanje ločljivosti ter poslabšanje asimetrije. Meji zaznavanja in določanja pa sta se drastično znižali. Izboljšanje ločljivosti pri uporabi kolone z manjšimi delci je posledica daljšega zadrževalnega časa analitov v koloni. Zaradi narave testnih raztopin rumenjaka pa smo imeli z delom na 3  $\mu$ m koloni probleme, saj je pri injiciranju vzorcev prišlo do mašenja kolone. Zaradi majhnih delcev bi morali testne



raztopine pred injiciranjem dodatno prečistiti, za kar pa bi v primeru velikega števila vzorcev porabili veliko časa in materiala.

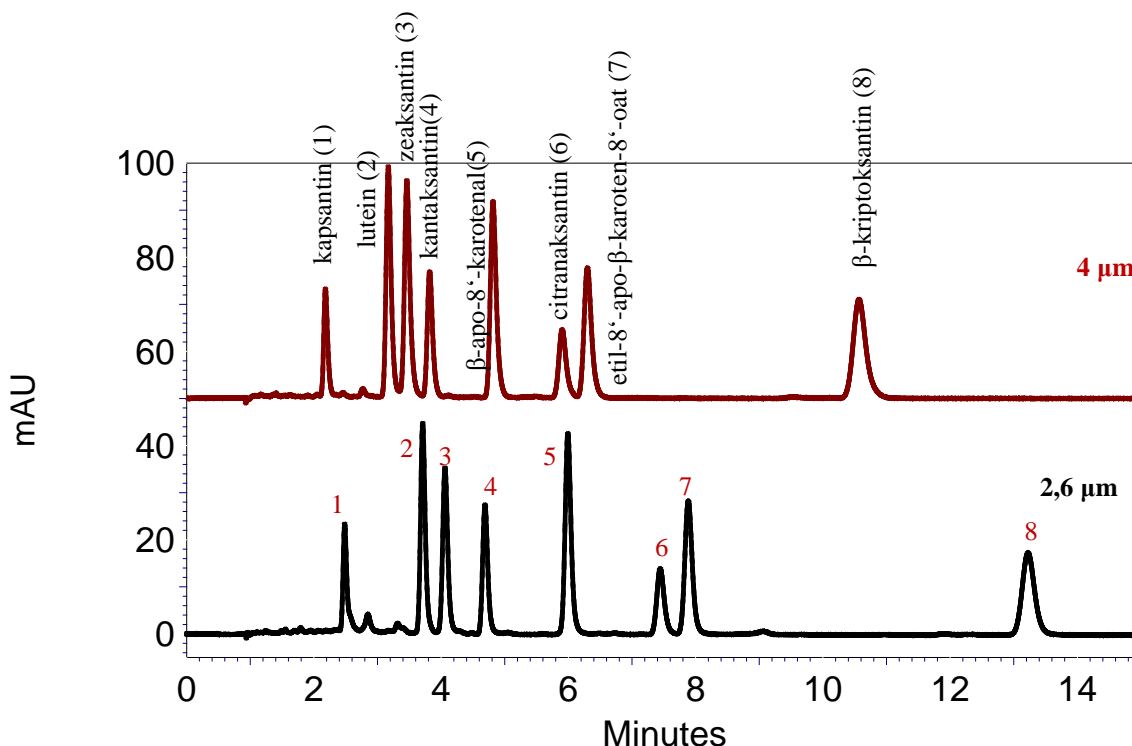
S spremembo proizvajalca kolone (ProntoSIL –slika 13 in Acclaim – slika 16) so se nam spremenili pogoji analize in tudi zaporedje ločenih analitov. Kolona Acclaim se je pri spremenjenih pogojih izkazala kot učinkovitejša za ločbo ksantofilov, kromatografski vrhovi so bolje ločeni in imajo odlično simetrijo. Tudi meji zaznavanosti in določanja sta celo nižja kot pri ProntoSIL koloni z 3  $\mu\text{m}$  delci. Z uporabo Acclaim kolone bi se sicer podaljšal čas analize za 8 min, a če to zanemarimo, je kolona Acclaim, med testiranimi kolonami C<sub>30</sub> s poroznimi delci, najboljše kolona za ločbo ksantofilov.

#### 4.1.1.4.2 Primerjava kolon nove generacije z delno poroznimi delci

Primerjali smo ločbe ksantofilov MIX8 na kolonah dimenzije 100  $\times$  4,6 mm, ki so se razlikovale med seboj po stacionarni fazi (C<sub>30</sub> in C<sub>18</sub>), velikosti delcev (2,6  $\mu\text{m}$  in 4  $\mu\text{m}$ ) ter proizvajalcu (Phenomenex, Supelco, Thermo Scientific).

Izokratsko ločbo na koloni Kinetex smo dobili z modifikacijo gradientne metode, ki jo je razvila Simonovska s sodelavci (2013) za karotenoide prisotne v špinači, in sicer tako, da smo spremenili njihove začetne pogoje. V mobilni fazi smo spremenili razmerje acetonitrila in 0,5 M TEAA pufra pH 7 s 93:7 (v/v) na 97:3 (v/v) in zvišali temperaturo kolone na 28 °C ter s tem dosegli ločbo v 10 minutah, kar je najkrajša ločba MIX8. Zmanjšali smo tudi volumen injiciranja na 2  $\mu\text{L}$  in tako dobili boljšo ločljivost. Vse ostale kolone smo primerjali z uporabo navedene mobilne faze, pri dveh temperaturah kolone 12 °C in 28 °C.

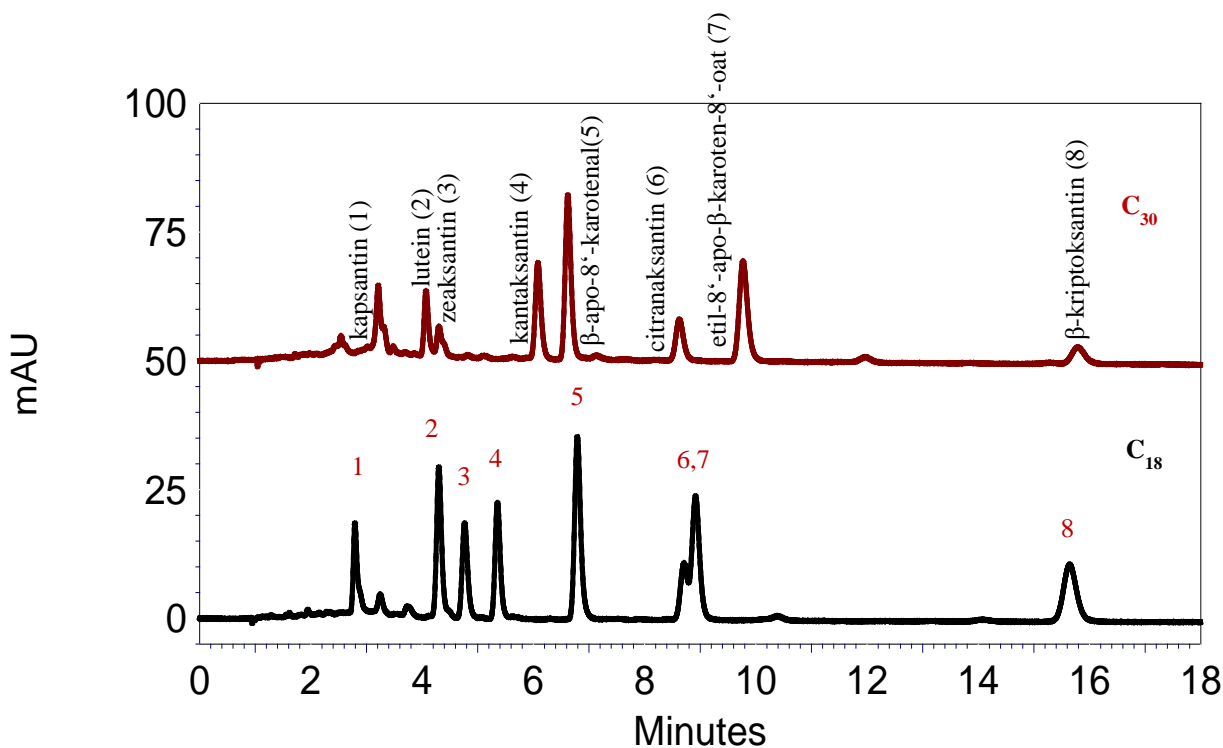
Na sliki 18 je prikazana ločba na Accucore C<sub>18</sub> koloni z velikostima delcev 4  $\mu\text{m}$  in 2,6  $\mu\text{m}$ . Velikost delcev naj sicer ne bi imela vpliva na selektivnost, če je površina delcev enaka (Lesellier, 2012), vendar se je v našem primeru površina razlikovala in je znašala 130 m<sup>2</sup>/g za kolono z 2,6  $\mu\text{m}$  delci in 90 m<sup>2</sup>/g za kolono s 4  $\mu\text{m}$  delci. Rezultat tega je bilo poslabšanje resolucije, še posebno med luteinom in zeaksantinom, ki sta bila v našem primeru kritični par. Manjši delci pa vplivajo tudi na daljši retencijski čas. Pri injiciranju testne raztopine rumenjaka na kolono z velikostjo delcev 4  $\mu\text{m}$  se je izkazalo, da se tudi pri tej koloni mašijo pore. Možnost analize z minimalno pripravo testnih raztopin, ki je mogoča na 5  $\mu\text{m}$  C<sub>30</sub> koloni s poroznimi delci, je pri kolonah z delno poroznimi delci manjšimi od 4  $\mu\text{m}$  nemogoča, zato bi bilo potrebno vse testne raztopine dodatno prečistiti.



Slika 18: HPLC kromatograma ksantofilov iz MIX8 na kolonah Accucore C<sub>18</sub> in Accucore XL C<sub>18</sub> (100 × 4,6 mm) velikosti delcev 2,6 µm in 4 µm, mobilna faza acetonitril:0,5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), T = 28 °C, pretok 1 mL/min.

Figure 18: HPLC chromatograms of xanthophylls from MIX8 on columns Accucore C<sub>18</sub> and Accucore XL C<sub>18</sub> (100 × 4.6 mm) 2.6 µm and 4 µm particle size, mobile phase acetonitrile:0.5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), T = 28 °C, flow rate 1 mL/min.

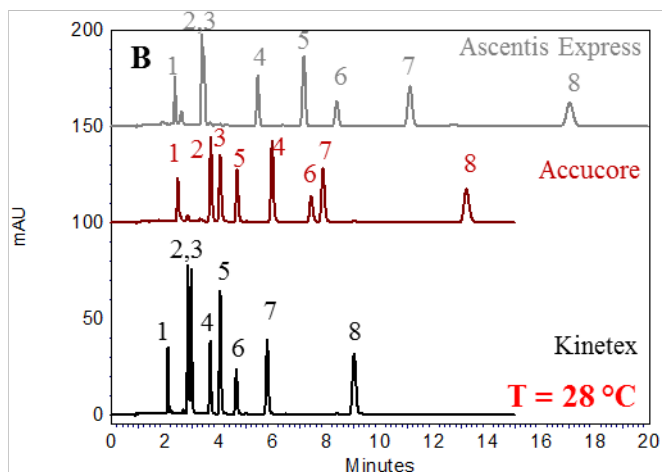
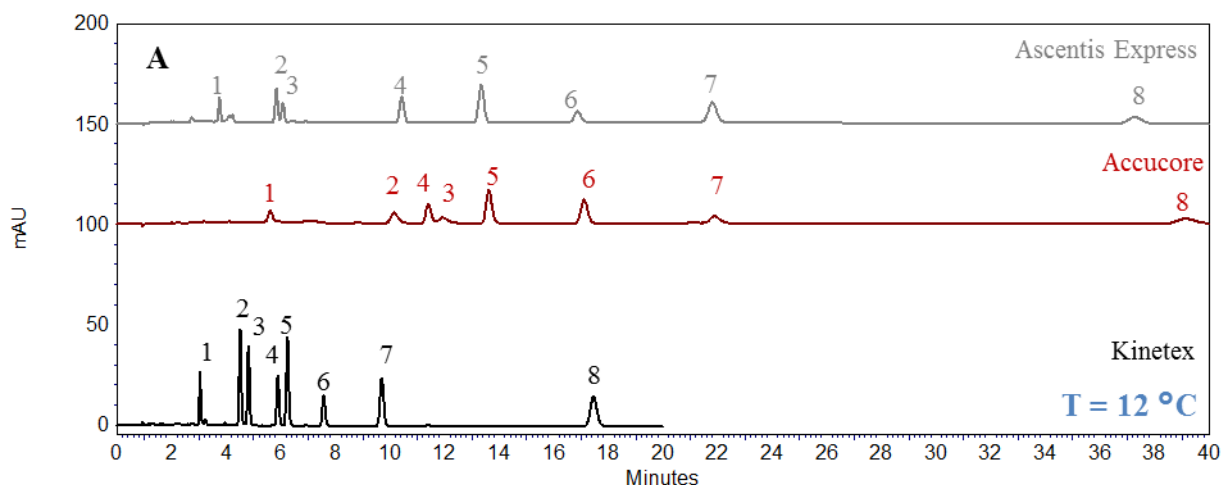
Vpliv dolžine alkilnih verig na ločbo je prikazan na sliki 19. Ločba na koloni C<sub>30</sub> z delno poroznimi delci (slika 19) je bila slabša, kot smo pričakovali v primerjavi s kolono C<sub>30</sub> s poroznimi delci (slika 15). Citranaksantin in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat sta ločena do bazne linije le na koloni C<sub>30</sub>, vendar pa sta lutein in zeaksantin bolj ločena na koloni C<sub>18</sub>. Razlog slabe selektivnosti kolone C<sub>30</sub> z delno poroznimi delci bi lahko bila nizka vsebnost ogljika, saj ga vsebuje le 5 %, medtem ko ga kolona C<sub>30</sub> s poroznimi delci vsebuje 13–20 %, kolona C<sub>18</sub> z delno poroznimi delci pa 9–12 %. Dolžina verig je sicer pomembna pri ločbi nepolarnih karotenov, pri polarnih ksantofilih pa je ločba odvisna predvsem od prostih silanolnih skupin (Sander in sod., 1994; Rafferty in sod., 2012), ki so prisotne, če ni narejen t.i. »endcapping«. Slika 19 lepo prikazuje, da kolone, katerim je bil narejen »endcapping«, niso primerne za ločbo ksantofilov.



Slika 19: HPLC kromatograma ksantofilov iz MIX8 na kolonah Accucore C<sub>18</sub> in Accucore C<sub>30</sub> (100 × 4,6 mm, 4  $\mu$ m), mobilna faza acetonitril:0,5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), T = 28 °C, pretok 1 mL/min

Figure 19: HPLC chromatograms of xanthophylls from MIX8 on columns Accucore C<sub>18</sub> and Accucore C<sub>30</sub> (100 × 4.6 mm, 4  $\mu$ m), mobile phase acetonitrile:0.5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), T = 28 °C, flow rate 1 mL/min

Pri primerjavi podobnih kolon z delno poroznimi delci različnih proizvajalcev (slika 20) sta koloni Accucore C<sub>18</sub> in Kinetex C<sub>18</sub> pokazali dobri kromatografski ločbi ksantofilov MIX8 z izjemo malenkost slabše resolucije pri koloni Kinetex pri vrhovih 2 in 3. Kolona Ascentis Express proizvajalca Sigma Aldrich pa je pokazala drugačno kromatografsko obnašanje, kar je v nasprotju z dognanji, da naj bi kolona Kinetex močno odstopala od obeh kolon po klasifikaciji glede na polarno površinsko aktivnost t.i. »polar surface activity« in selektivnost t.i. »shape selectivity« (Lesellier, 2012). V našem primeru je ravno nizka polarna površinska aktivnost omogočila koloni Kinetex in Accucore odlično ločbo ksantofilov v primerjavi s kolono Ascentis Express.

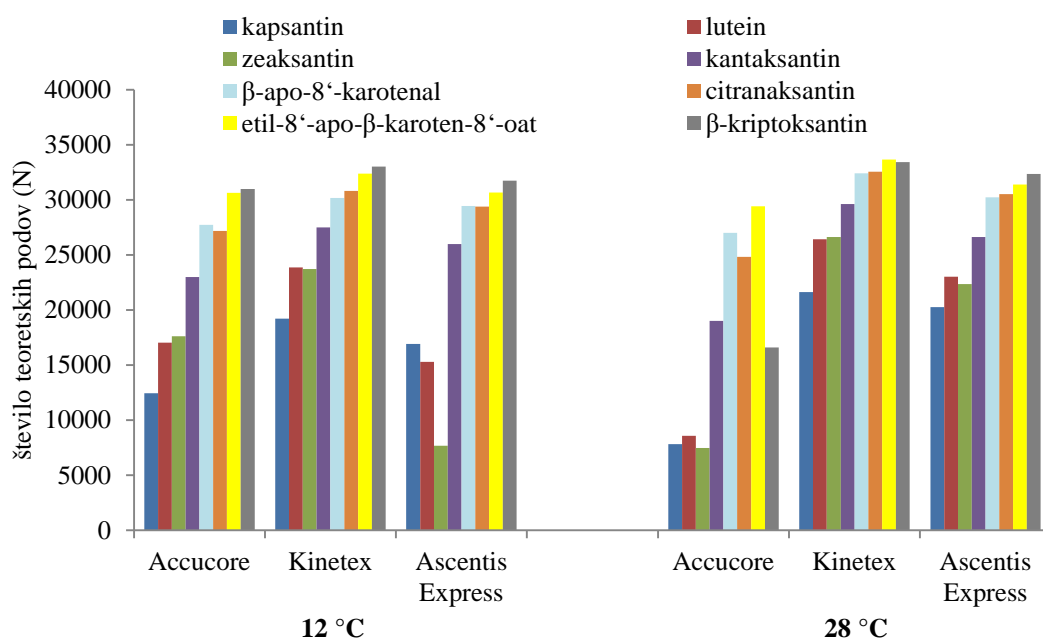


Slika 20: HPLC kromatogrami ksantofilov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6), citranaksantina (7),  $\beta$ -kriptoksantina (8) iz MIX8 na kolonah Accucore C<sub>18</sub> (velikost delcev 2,6  $\mu$ m), Ascentis Express C<sub>18</sub> (velikost delcev 2,7  $\mu$ m) in Kinetex C<sub>18</sub> (velikost delcev 2,6  $\mu$ m), dimenzije 100  $\times$  4,6 mm, mobilna faza acetonitril:0,5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), pretok 1 mL/min, pri T = 12 °C (A) in T = 28 °C (B)

Figure 20: HPLC chromatograms of xanthophylls lutein (1), capsanthin (2), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4),  $\beta$ -apo-8'-carotenal (5), etil-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (6), citranaxanthin (7),  $\beta$ -criptoxanthin (8) from MIX8 on columns Accucore C<sub>18</sub> (2.6  $\mu$ m particle size), Ascentis Express C<sub>18</sub> (2.7  $\mu$ m particle size) in Kinetex C<sub>18</sub> (2.6  $\mu$ m particle size), dimension 100  $\times$  4.6 mm, mobile phase acetonitrile:0.5 M TEAA pH 7 (97:3, v/v), flow rate 1 mL/min, at T = 12 °C (A) and T = 28 °C (B)

Za tri kolone smo izračunali tudi število teoretskih podov (slika 21), resolucijo (preglednica 15) in asimetrijo (preglednica 16). Iz podatkov je razvidno, da je najboljša ločba pri 28 °C na koloni Accucore, saj je resolucija pri vseh ksantofilih večja od 1,5, vendar pa ima ta kolona najnižje število teoretskih podov. Pri 12 °C pa se ksantofili najbolje ločijo na koloni Kinetex. Slednja ima tudi najvišje število teoretskih podov ne glede na temperaturo. Pri temperaturi 25 °C bi dobili na koloni Kinetex najboljšo in

najkrajšo ločbo (okoli 12 min). Simetrija vrhov je pri vseh kolonah odlična. Kot smo že večkrat omenili, podatki potrjujejo, da ima ključno vlogo pri ločevanju ksantofilov temperatura, saj nižja temperatura vpliva na drugačno (*trans*) ureditev dolgih alkilnih verig in s tem težji prehod molekule in manjše interakcije (Pursch in sod., 1996; Albert, 1998; Bell in sod., 1997).



Slika 21: Število teoretskih podov (N) za RP C<sub>30</sub> kolone z delno poroznimi delci

Figure 21: Number of theoretical plates (N) for partially porous RP C<sub>30</sub> columns.

Preglednica 15: Resolucija med dvema sosednjima kromatografskima vrhovoma pri uporabi RP kolon C<sub>18</sub> z delno poroznimi delci

Table 15: Resolution between each two neighbor pairs of chromatographic peaks when using RP C<sub>18</sub> columns partially porous partilces

kolone	T (°C)	pari vrhov						
		1–2	2–3	3–4	4–5	5–6	6–7	7–8
Accucore C <sub>18</sub> , 2,6 $\mu$ m	12	10,7	2,7	1,0	3,1	7,8	8,2	18,4
	28	2,3	2,4	4,1	7,9	7,3	2,0	18,1
Ascentis Express C <sub>18</sub> , 2,7 $\mu$ m	12	13,1	1,2	17,0	8,5	8,3	9,2	19,1
	28	9,0	1,7	11,3	9,2	5,5	9,9	15,2
Kinetex C <sub>18</sub> , 2,6 $\mu$ m	12	12,2	2,2	6,8	2,1	7,0	9,1	21,3
	28	9,1	1,3	7,0	3,3	5,8	8,0	16,1

zaželen  $\geq 1,5$

Preglednica 16: Asimetrija – faktor repanja (TF) kromatografskih vrhov luteina (1), kapsantina (2), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (7),  $\beta$ -kriptoksantina (8) pri uporabi RP kolon C18 z delno poroznimi delci

Table 16: Peak asymetry – tailing factor (TF) of lutein (1), capsanthin (2), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4),  $\beta$ -apo-8'-carotenal (5), ethyl-8'-apo- $\beta$ -caroten-8'-oate (7),  $\beta$ -cryptoxanthin (8) when using RP C18 columns partially porous partilces

kolone	T (°C)	1	2	3	4	5	6	7	8
Accucore C <sub>18</sub> , 2,6 $\mu$ m	12	1,2	1,3	-	-	1,1	1,2	1,1	1,1
	28	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,3
Ascentis Express C <sub>18</sub> , 2,7 $\mu$ m	12	1,1	-	-	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	28	1,2	-	-	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0
Kinetex C <sub>18</sub> , 2,6 $\mu$ m	12	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	28	1,3	-	-	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1

odličen TF  $\leq$  1,2, zaželen  $\leq$  1,5; dopusten  $<$  2 (Snyder in sod., 2010)

Ob vsem tem lahko zaključimo, da so reverznofazne kolone C<sub>30</sub> s poroznimi delci najbolj robustne kolone in zagotavljajo dobro ločbo ksantofilov MIX8, čeprav lahko celo boljše, predvsem pa hitro ločbo dosežemo tudi na kolonah z delno poroznimi delci, kot sta Kinetex in Accucore C<sub>18</sub> z 2,6  $\mu$ m velikimi delci. Vendar se pri obeh pojavlja problem mašenja por zaradi majhnih delcev in bi morali testne raztopine dobro prečistiti, če bi hoteli uporabiti te kolone. Bijttebier s sodelavci (2014) je ugotovil, da je v primerjavi z UHPLC RP C<sub>18</sub> kolonami s poroznimi delci (ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>, ACQUITY UPLC HSS T3, ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> SB, ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>, ACQUITY UPLC BEH Shield RP C<sub>18</sub>, ACQUITY UPLC BEH Phenil) za ločbo karotenoidov še vedno najboljša kolona RP C<sub>30</sub>.

#### 4.1.2 Validacijsko poročilo za analizni postopek »Določanje ksantofilov v jajčnem rumenjaku«

Karotenoidi so neobstojni, še posebno problematična je lahko njihova obstojnost med kromatografijo, zato je bila opažena pomembnost vsakodnevnega testiranja ponovljivosti sistema pri analizi. Relativne standardne deviacije (RSD) pri testu ponovljivosti sistema so znašale do 0,5 % (n=3) za ploščine vrhov luteina in zeaksantina ter pod 0,2 % (n = 3) za retencijske čase. Povprečje ploščin vrhov luteina in zeaksantina pred in po 12 injiciranih testnih raztopin vzorcev rumenjakov je za lutein ostalo nespremenjeno, za zeaksantin pa se je povečalo za 1 %. Resolucija med vrhovoma luteina in zeaksantina pa je bila 3,3. Enačbe regresijskih premic kalibracijskih standardnih raztopin v območju med približno 0,04 in 2  $\mu$ g/mL (kar odgovarja 0,08–4 mg/100 g rumenjaka) so podane v preglednici 17, skupaj s koeficientom determinacije ( $r^2$ ). Meja zaznavnosti (LOQ) in meja določanja (LOQ), določeni za vsako spojino, sta bili 0,01 in 0,03  $\mu$ g/mL (kar odgovarja 0,02 in 0,06 mg/100 g rumenjaka). S primerjavo PDA spektrov vrhov standardov in vrhov testnih raztopin rumenjaka z istim retencijskim časom, ter testom čistosti vrhov (»peak purity«)

testnih raztopin rumenjaka smo vrednotili selektivnost metode. V testnih raztopinah rumenjaka smo zasledili prisotnost majhnih vrhov, ki pripadajo Z izomeram analitov. Na mestu kapsantina pa se je pojavil majhen vrh, katerega PDA spekter je nakazal na morebitno izomero luteina ali zeaksantina. Nimalaratne in sodelavci (2012) navajajo, da se do 10 % celokupne vsebnosti v rumenjaku lahko nahaja v eni od geometrijskih izomer. Glavni predstavniki teh izomerov so 13-Z-lutein (~5 %), 13'-Z-lutein (~7 %), 9'-Z-lutein (~2 %), 13-Z-zeaksantin (~12 %) in Z-kantaksantin (~10 %).

Preglednica 17: Regresijske premice ( $n = 3$ ) in meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ) petih ksantofilov MIX5

Table 17: Regression data ( $n = 3$ ) and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for the five xanthophylls MIX5

spojina	enačbe regresijskih premic <sup>a</sup>	$r^2$	LOD (mg/100 g)	LOQ (mg/100 g)
lutein	$y = 725904 (\pm 2844) x - 2939 (\pm 2854)$	0,9998	0,046	0,140
zeaksantin	$y = 711133 (\pm 2594) x - 4509 (\pm 2899)$	0,9998	0,026	0,082
kantaksantin	$y = 535616 (\pm 2363) x - 3813 (\pm 1854)$	0,9997	0,040	0,120
$\beta$ -apo-8'-karotenal	$y = 791902 (\pm 4007) x - 6140 (\pm 3810)$	0,9996	0,054	0,164
$\beta$ -kriptoksantin	$y = 656191 (\pm 3039) x - 1658 (\pm 3266)$	0,9996	0,058	0,176

<sup>a</sup>pri regresijski premici  $y = ax + b$ ,  $x$  označuje koncentracijo v  $\mu\text{g/mL}$ ,  $y$  pa ploščino kromatografskih vrhov; podan je naklon in presek regresijske premice na osi  $y$ , njuna standardna deviacija pa je podana v oklepajih

Pravilnost in točnost metode znotraj dneva ter izkoristek pri dodatku standarda (»recovery«) so bili računani na 3 nivojih za vsako od 5 spojin (preglednica 18). Izkoristek (»recovery«) smo računali za določanje izgub karotenoidov med ekstrakcijo spojin. Zaradi prisotnosti luteina in zeaksantina v rumenjaku pred dodatkom standardov vzorcu so rezultati določanja točnosti metode za ostale tri spojine bolj ustrezni. Kot je prikazano v preglednici 18, so zahteve, ki so opisane v podpoglavju 3.2.2.2, izpolnjene. Vrednost izkoristka (»recovery«) pod 95 % kaže na razpadanje ksantofilov med ekstrakcijo ali pa na nepoznano sistematično napako. Pri izračunu vsebnosti ksantofilov v rumenjaku je bil upoštevan povprečni izkoristek za vseh petih spojin, ki znaša 95 %. Pri uporabi HPLC kolone druge serije se retencijski čas, asimetrija vrhov in teoretski podi preiskovanih ksantofilov niso občutno spremenili. Uporabljena HPLC kolona  $C_{30}$  se je izkazala za robustno, vendar z nizkim številom teoretskih podov. Količino vzorca smo lahko zmanjšali zaradi uporabe detektorja z optično potjo 5 cm. Nismo opazili, da bi morebitni lipidi v ekstraktu motili kromatografsko določitev ksantofilov. Validacija metode prikazuje, da je ta metoda primerna za določanje petih ksantofilov v rumenjaku. Dodatni trije ksantofili, ki se dodajajo h krmi perutnine, pa ne motijo pri določanju ostalih 5 ksantofilov.

Preglednica 18: Rezultati izkoristka ( $n = 3$ ) za pet ksantofilov

Table 18: Results of the recovery experiment ( $n=3$ ) for five xanthophylls

spojina	dodano (mg/100 g rumenjaka)	določeno ( $n=3$ ) $\pm$ SD (mg/100 g rumenjaka)	izplen (%)
lutein <sup>a</sup>	0,35	$1,16 \pm 0,00_1$	108
	0,89	$1,57 \pm 0,07$	90
	1,77	$2,43 \pm 0,09$	94
zeaksantin <sup>b</sup>	0,40	$0,83 \pm 0,04$	100
	1,00	$1,33 \pm 0,06$	90
	1,99	$2,26 \pm 0,10$	92
kantaksantin	0,28	$0,27 \pm 0,01$	97
	0,70	$0,64 \pm 0,03$	92
	1,40	$1,31 \pm 0,05$	93
$\beta$ -apo-8'-karotenal	0,34	$0,33 \pm 0,01$	96
	0,85	$0,62 \pm 0,05$	93
	1,69	$1,59 \pm 0,06$	94
$\beta$ -kriptoksantin	0,38	$0,42 \pm 0,02$	105
	0,96	$0,91 \pm 0,02$	93
	1,92	$1,82 \pm 0,08$	94

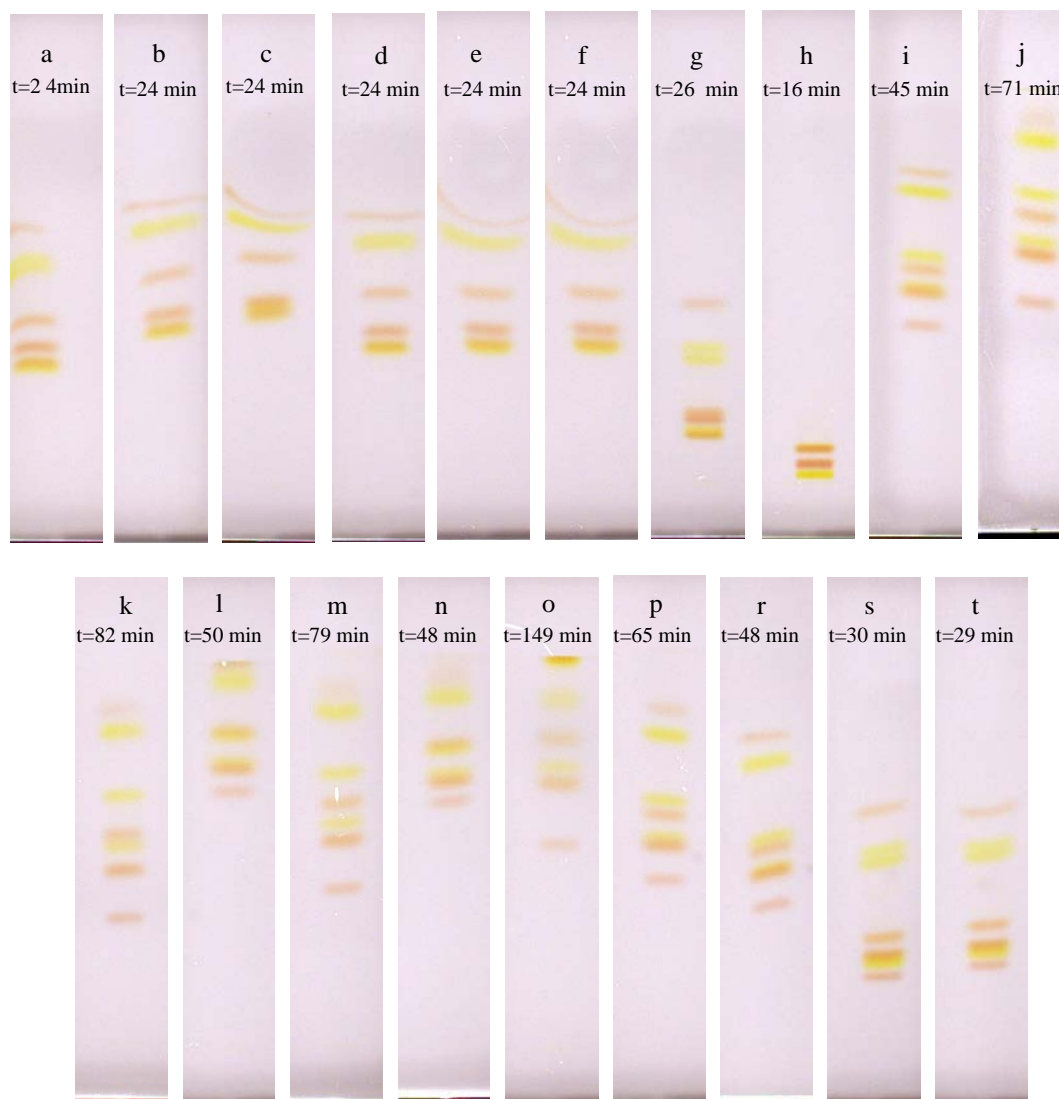
<sup>a, b</sup> naravno prisotna količina luteina ali zeaksantina, ki je bila odšteta pri izračunu znaša  $0,77 \pm 0,02$  mg luteina/100 g rumenjaka in  $0,43 \pm 0,02$  mg zeaksantina/100 g rumenjaka

#### 4.1.3 Razvoj kvalitativne TLC metode za določanje ksantofilov v jajcu

Ker do sedaj ni bilo objavljene metode za ločbo osmih ksantofilov (lutein, kapsantin, zeaksantin, kantaksantin,  $\beta$ -apo-8'-karotenal, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat,  $\beta$ -kriptoksantin) smo razvili TLC metodo, ki bi bila lahko uporabna za preprosto identifikacijo prisotnih ksantofilov v testnih raztopinah rumenjaka. Za ločbo smo izbrali ploščo HPTLC RP C<sub>18</sub> silikagel 60.

Optimizacija ločbe mešanice standardov MIX8 je potekala v horizontalni kadi z uporabo naslednjih topil za razvijanje (slika 22): metanol:aceton (7:3, v/v), metanol:aceton:*n*-heksan (14:5:1, v/v/v), metanol:aceton:*n*-heksan (12:5:3, v/v/v), metanol:aceton:THF (14:5:1, v/v/v), metanol:aceton:petroleter (2:1:1, v/v/v), metanol:aceton:petroleter, (13:5:2, v/v/v), metanol, acetonitril, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-propanol:etilacetat (4:1, v/v), 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v), 1-propanol:2-propanol:aceton (2:2:1, v/v/v), 1-butanol, 1-propanol:2-propanol:metanol (2:2:1, v/v/v), 2-propanol:metanol (3:2, v/v), metanol:2-propanol (4:1, v/v), metanol:1-propanol (4:1, v/v). Pri tem pa je čas razvijanja potekal od 16–149 min. Vse plošče so bile razvite do višine 8 cm. Kot je razvidno s slike 22 smo najboljšo ločbo dosegli z uporabo topila za razvijanje 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v), pri čemer pa smo dosegli ločbo sedmih karotenoidov od osmih.



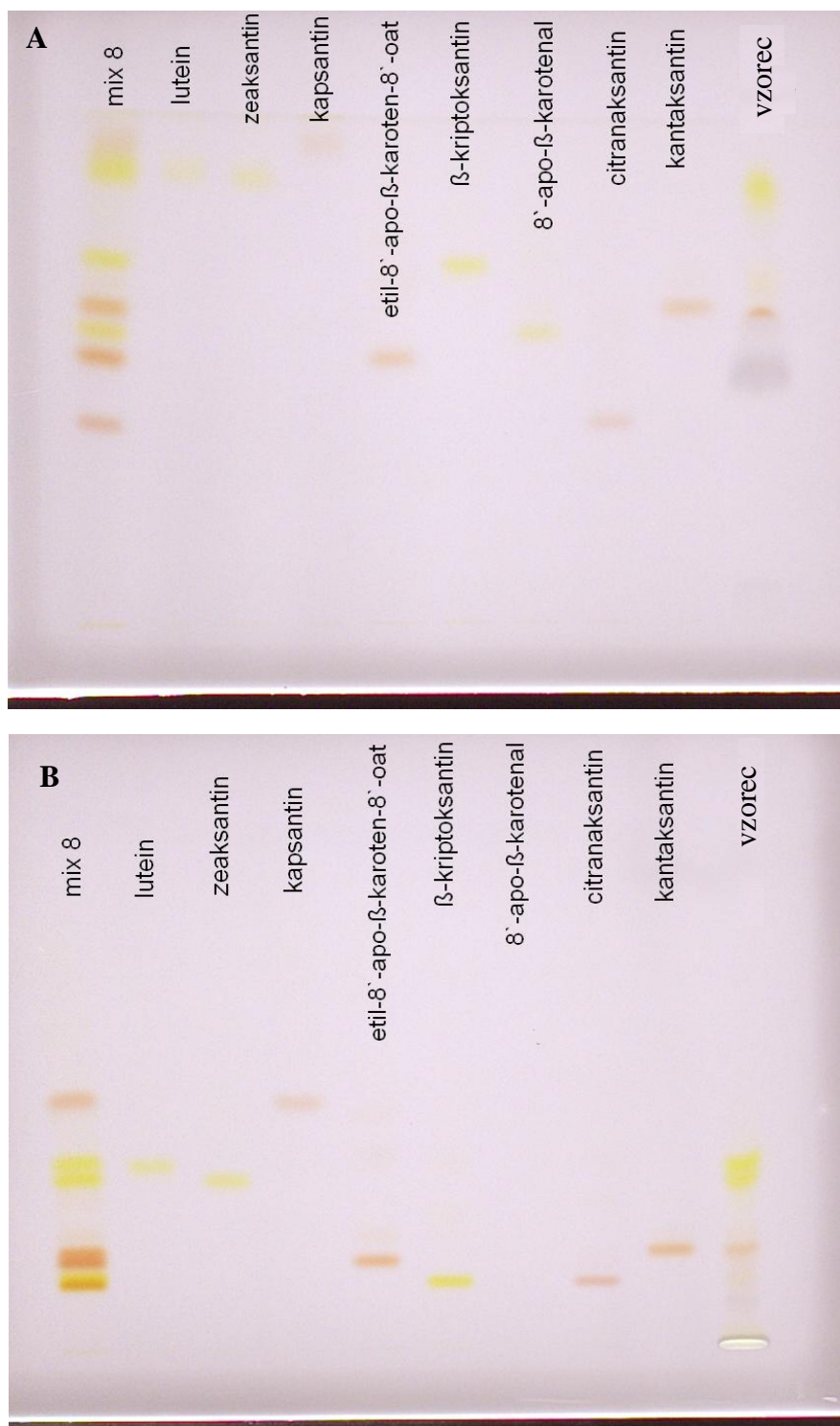


Slika 22: Optimizacija topila za razvijanje za ločbo standardov ksantofilov MIX8 na HPTLC RP C<sub>18</sub> silikagel 60 plošči z uporabo različnih topil za razvijanje: metanol:acetone, 7:3, v/v (a), metanol:acetone:*n*-heksan, 14:5:1, v/v/v (b), metanol:acetone:*n*-heksan, 12:5:3, v/v/v (c), metanol:acetone:THF, 14:5:1, v/v/v (d), metanol:acetone:petroleter, 2:1:1, v/v/v (e), metanol:acetone:petroleter, 13:5:2, v/v/v (f), metanol (g), acetonitril (h), etanol (i), 1-propanol (j), 2-propanol (k), 1-propanol:etilacetat,4:1, v/v (l), 1-propanol:2-propanol, 1:1, v/v (m), 1-propanol:2-propanol:acetone, 2:2:1, v/v/v (n), 1-butanol (o), 1-propanol:2-propanol:metanol, 2:2:1, v/v/v (p), 2-propanol:metanol, 3:2, v/v (r), metanol:2-propanol,4:1, v/v (s), metanol:1-propanol, 4:1, v/v (t)

Picture 22: Optimization of the developing solvent for the separation of xanthophyll standards MIX8 on HPTLC RP C<sub>18</sub> silica 60 plates, using various developing solvents: methanol:acetone, 7:3, v/v (a), methanol:acetone:*n*-hexane, 14:5:1, v/v/v (b), methanol:acetone:*n*-hexane, 12:5:3, v/v/v (c), methanol:acetone:THF, 14:5:1, v/v/v (d), methanol:acetone:petroleum ether, 2:1:1, v/v/v (e), methanol:acetone:petroleum ether, 13:5:2, v/v/v (f), methanol (g), acetonitrile (h) ethanol (i), 1-propanol (j), 2-propanol (k), 1-propanol:ethyl acetate, 4:1, v/v (l), 1-propanol:2-propanol, 1:1, v/v (m), 1-propanol:2-propanol:acetone, 2:2:1, v/v/v (n), 1-butanol (o), 1-propanol:2-propanol:methanol, 2:2:1, v/v/v (p), 2-propanol, methanol, 3:2, v/v (r), 2-propanol:methanol, 1:4, v/v (a) 1-propanol:methanol, 4:1, v/v (t)

Na sliki 23 je prikazana ločba mešanice vseh osmih standardov MIX8, vsakega standarda posebej in testne raztopine rumenjaka, pripravljene po postopku opisanem v podpoglavju 3.2.2.1.1. Kot je razvidno s slike 23A, z uporabo 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v) kot topila za razvijanje nismo uspeli ločiti luteina in zeaksantina. Ker pa tudi nismo zasledili ločbe zeaksantina in luteina na RP C<sub>18</sub> ploščah, smo želeli ločiti prav ta dva izomera, kar smo uspeli z uporabo metanola kot topila za razvijanje (slika 23B). Poleg luteina in zeaksantina pa z uporabo metanola ločimo le še kapsantin.

Z uporabo topila za razvijanje 1-propanol:2-propanol (1:1, v/v), dosežemo dobro ločbo sedmih ksantofilov v 84 min, če pa želimo ločiti še lutein in zeaksantin pa moramo narediti ponovno TLC analizo z uporabo metanola kot topila za razvijanje, pri čemer dosežemo ločbo v 28 min.



Slika 23: HPTLC kromatogram (plošča: HPTLC RP C<sub>18</sub> silikagel 60) standardov ksantofilov (20  $\mu$ L) in vzorca jajc (100  $\mu$ L), pri uporabi topila za razvijanje: 1-propanol:2-propanol, 1:1, v/v, t = 84 min (A) in metanol, t = 28 min (B)

Picutre 23: HPTLC chromatogram (plate: HPTLC RP C<sub>18</sub> silica 60) of xanthophylls standards (20  $\mu$ L) and a sample of eggs (100  $\mu$ L), when using the developing solvent: 1-propanol:2-propanol, 1:1, v/v, t = 84 min (A) and methanol, t = 28 min (B)

#### 4.1.4 Razlike v vsebnosti ksantofilov v kupljenih jajcih

Želeli smo ugotoviti, kolikšna je variabilnost vsebnosti ksantofilov znotraj škatle s šestimi jajci. Rezultate prikazuje preglednica 19. Variabilnost znotraj škatle je znašala za lutein in zeaksantin 7–17 % izražena kot RSD. Največja variabilnost je bila opažena pri jajcih iz ekološke in proste rejji, za kar je razlog v manjšem nadzoru pri krmljenju kokoši v teh dveh načinih rej.

Preglednica 19: Variabilnost vsebnosti karotenoidov 5 pakiranj jajc (n = 6) iz različnih načinov rej: ekološke (0), proste (1), hlevske (2) in baterijske reje (3<sup>a</sup> in 3<sup>b</sup>)

Table 19: Variability of the content of carotenoids in 5 egg boxes (n=6) from different husbandry classes: ecological (0) free range (1) barn (2) and cage (3<sup>a</sup> and 3<sup>b</sup>)

	0	1	2	3 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>
<b>lutein (mg/100 g)</b>	1,61 ± 0,24	1,67 ± 0,28	2,60 ± 0,20	2,84 ± 0,30	2,93 ± 0,21
<b>RSD (%)</b>	15,05	16,78	7,55	7,12	10,71
<b>zeaksantin (mg/100g)</b>	0,90 ± 0,14	0,88 ± 0,13	1,04 ± 0,8	1,26 ± 0,11	1,20 ± 0,17
<b>RSD (%)</b>	15,12	14,83	7,72	9,04	14,22
<b>kantaksantin (mg/100 g)</b>	n.d.	0,71 ± 0,21	0,47 ± 0,04	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,04
<b>RSD (%)</b>	n.d.	29,75	9,43	10,29	7,57
<b><math>\beta</math>-kriptoksantin (mg/100 g)</b>	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
<b>RSD (%)</b>	18,61	21,02	13,70	19,95	10,06

n.d. (ni detektirano): pod mejo detekcije < 0,02 mg/100 g rumenjaka

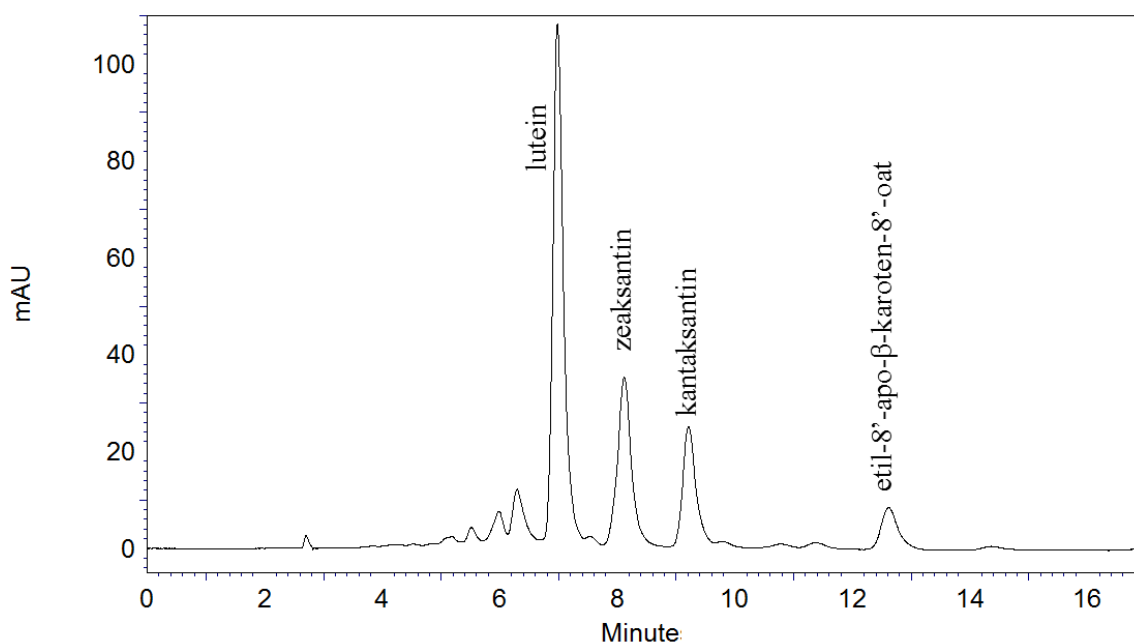
3<sup>a</sup> in 3<sup>b</sup> različno pakiranje jajc iz baterijske reje istega rejca in datuma pakiranja

#### 4.1.5 Ksantofili v jajcih s slovenskega tržišča

Objavljenih je bilo nekaj študij kakovosti jajc na slovenskem tržišču (Pajk-Žontar in sod., 2010; Holcman in sod., 1997), vendar do sedaj nobena ni vsebovala kvalitativnih in kvantitativnih podatkov o karotenoidih v rumenjkih, zato smo želeli analizirati kar največje število jajc različnih blagovnih znamk in rejcev. Na slovenskem tržišču najdemo pretežno jajca iz baterijske reje, malo pa je jajc iz proste in ekološke reje (Jajca in perutninsko meso, 2015). Za analizo smo kupili 64 pakiranj jajc različnih rejcev in blagovnih znamk, od katerih je bilo 31 pakiranj iz baterijske, 10 pakiranj iz proste, 9 iz pakiranj hlevske ter 14 pakiranj iz ekološke reje. Od vseh analiziranih vzorcev je bilo kar 18 pakiranj jajc uvoženih iz držav EU, od tega 6 iz baterijske reje, 2 iz hlevske reje, 5 iz proste in 5 iz ekološke reje. Vzorci so podrobneje opisani v podpoglavju 3.1.1.1.

Pri izračunih vsebnosti posameznih karotenoidov je bil upoštevan povprečni faktor učinkovitosti ekstrakcije (92 %) skupaj s povprečnim izplenom (95 %). Spektri kromatografskih vrhov testnih raztopin so bili primerjani s spektri kromatografskih vrhov standardnih raztopin, ki imajo isti retencijski čas. Slika 24 prikazuje reprezentativni kromatogram ene od testnih raztopin. Sestava karotenoidov v rumenjkih jajc na slovenskem tržišču je podana v preglednicah 20–23, kjer je razvidna velika variabilnost ne glede na to, kateremu načinu reje pripadajo jajca. V vzorcih smo določili 4 glavne

karotenoide, in sicer *all-E*-lutein, *all-E*-zeaksantin, *all-E*-kantaksantin in *all-E*-etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat. Jajca ekološke reje pa so vsebovala le *all-E*-lutein, *all-E*-zeaksantin in malo *all-E*- $\beta$ -kriptoksantina, z izjemo enega vzorca francoskega porekla, ki je poleg naštetih karotenoidov vseboval *all-E*-etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat in *all-E*-kantaksantin (vzorec 26) in zato ne bi smel biti uvrščen med jajca iz ekološke reje, saj ta dva ksantofila nista prisotna v naravnih virih karotenoidov. Med vzorci iz baterijske reje en vzorec (vzorec 22) zelo močno izstopa po vsebnosti karotenoidov (10,48 mg/100 g rumenjaka), še posebno po vsebnosti luteina (4,05 mg/100 g rumenjaka) in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (3,93 mg/100 g rumenjaka).



Slika 24: Primer HPLC kromatograma testne raztopine vzorca rumenjaka proste reje

Figure 24: HPLC chromatogram of egg yolk test solution from free range husbandry class

Podobno kot nemškem tržišču (Schlatterer in Breithaupt, 2006) tudi na slovenskem tržišču (preglednica 20–23) nismo v nobenem vzorcu določili prisotnega *all-E*-kapsantina, čeprav bi se ta v obliki paprike v prahu lahko dodajal jajcem iz ekološke reje za boljše obarvanje (Schlatterer in Breithaupt, 2006). Kot najbolj pogosta sintetična ksantofila smo določili *all-E*-kantaksantin in *all-E*-etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, medtem ko smo *all-E*-citranaksantin in *all-E*-apo-8'- $\beta$ -karotenal zasledili le v dveh vzorcih iz baterijske reje slovenskega (vzorec 22) in francoskega porekla (vzorec 34). Na kromatogramih pa se poleg preiskovanih karotenoidov pojavljajo tudi vrhovi neznanih karotenoidov pred vrhom *all-E*-luteina, ki po vsej verjetnosti pripadajo 13-*Z*-luteinu in 13'-*Z*-luteinu. Za določitev mesta

kromatografskega vrha posameznih Z izomer in njihove količine v jajčnem rumenjaku bi bila potrebna nadaljnja raziskava.

Preglednica 20: Ksantofili v rumenjakih jajc iz baterijske reje

Table 20: Xanthophylls in egg yolks from cage husbandry

št. vzorca	lutein	zeaksantin	kantaksantin	mg/100 g rumenjaka		celokupni karotenoidi	barva rumenjaka (Roche)
				etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat	$\beta$ -kriptoksantin		
1	3,01	1,04	0,82	n.d.	v sledovih	5,4	ni podatka
2	2,13	0,83	0,55	v sledovih	v sledovih	3,7	11,8
4	1,56	0,73	0,49	n.d.	v sledovih	3,1	11,0
6	1,67	0,65	0,46	n.d.	v sledovih	3,1	11,2
7	2,91	0,77	0,63	0,31	v sledovih	5,5	12,3
8	3,32	1,04	0,87	0,08	v sledovih	5,8	12,7
12	2,93	0,86	0,67	n.d.	v sledovih	4,9	12,7
13	1,76	0,83	0,65	0,21	v sledovih	4,1	13,0
14	1,69	1,09	1,02	n.d.	v sledovih	4,6	13,5
15	2,87	0,73	0,59	0,30	v sledovih	5,3	12,2
16	2,36	1,05	0,97	0,29	v sledovih	5,4	13,2
17	2,23	0,77	0,51	n.d.	v sledovih	3,4	11,8
18	1,90	0,80	0,59	0,23	v sledovih	3,6	13,0
19	2,59	0,90	0,56	v sledovih	v sledovih	3,9	12,2
20	2,54	0,88	0,56	v sledovih	v sledovih	3,8	12,8
22 <sup>a</sup>	4,05	1,02	0,98	3,93	v sledovih	10,5	14,2
23	2,10	0,93	0,96	0,34	0,06	5,2	13,5
28	1,72	0,79	n.d.	0,04	0,06	3,4	9,5
29	0,57	0,61	1,38	0,94	v sledovih	3,4	14,0
31	0,44	0,56	1,09	0,66	v sledovih	3,1	14,0
32	2,30	0,97	n.d.	0,09	0,06	4,2	10,3
34 <sup>b</sup>	1,18	0,72	n.d.	n.d.	v sledovih	2,9	10,2
35	3,63	1,06	0,89	0,25	n.d.	6,6	14,0
36	2,95	1,32	0,98	0,33	0,06	5,8	14,0
37	2,21	0,86	0,59	v sledovih	v sledovih	4,3	12,8
38	1,99	0,76	0,53	n.d.	v sledovih	3,7	12,3
39	2,12	0,92	0,79	0,27	v sledovih	4,23	13,2
40	0,54	0,63	1,27	0,89	v sledovih	3,5	13,7
44	0,75	0,45	0,74	0,41	v sledovih	2,4	12,5
45	1,87	0,72	0,47	n.d.	v sledovih	3,2	14,2
47	1,45	0,71	0,55	0,49	v sledovih	4,1	12,2

<sup>a</sup>poleg navedenih karotenoidov vsebuje tudi 0,06 mg  $\beta$ -apo-8'-karotenala/100 g rumenjaka

<sup>b</sup>poleg navedenih karotenoidov vsebuje tudi 0,10 mg citranaksantina/100 g rumenjaka

n.d. (ni detektirano): pod mejo zaznavnosti < 0,02 mg/100 g rumenjaka

v sledovih: pod mejo določanja < 0,06 mg/100 g rumenjaka

Preglednica 21: Ksantofili v rumenjakih jajc iz hlevske reje

Table 21: Xanthophylls in egg yolks from barn husbandry

št. vzorca	lutein	zeaksantin	kantaksantin	etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat	$\beta$ -kriptoksantin	celokupni karotenoidi	barva rumenjaka (Roche)
3	2,13	0,83	0,58	n.d.	v sledovih	3,9	12,0
9	2,30	0,58	0,65	n.d.	v sledovih	4,1	12,8
11	2,74	0,67	0,79	n.d.	v sledovih	4,6	13,2
21	2,34	0,98	0,91	0,30	v sledovih	5,3	13,8
24	2,34	1,00	0,92	0,28	v sledovih	4,8	12,8
27	1,83	1,01	0,29	n.d.	v sledovih	3,8	11,3
41	2,44	0,89	0,62	n.d.	v sledovih	4,7	12,8
42	0,61	0,71	1,43	1,03	v sledovih	3,5	14,7
46	0,99	0,66	0,81	n.d.	v sledovih	3,1	13,0
48	1,24	0,87	n.d.	n.d.	v sledovih	3,4	8,2

n.d. (ni detektirano): pod zaznavnosti < 0,02 mg/100 g rumenjaka  
v sledovih: pod mejo določanja < 0,06 mg/100 g

Preglednica 22: Ksantofili v rumenjakih jajc iz proste reje

Table 22: Xanthophylls in egg yolks from free range husbandry

št. vzorca	lutein	zeaksantin	kantaksantin	etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat	$\beta$ -kriptoksantin	celokupni karotenoidi	barva rumenjaka (Roche)
5	2,09	0,93	0,72	0,25	v sledovih	4,2	12,8
25	0,72	0,55	0,19	0,20	v sledovih	2,1	9,7
33	0,76	0,66	0,36	n.d.	v sledovih	2,8	11,2
49	1,36	0,57	0,25	0,06	v sledovih	3,8	10,7
59	1,98	0,95	0,05	n.d.	v sledovih	3,9	7,0
60	1,70	0,93	0,59	0,24	v sledovih	4,6	14,0
61	1,85	1,05	n.d.	n.d.	v sledovih	4,5	9,7
62	1,75	0,90	0,68	0,26	v sledovih	5,2	13,3
63	1,56	0,87	0,25	n.d.	v sledovih	4,4	12,3

n.d. (ni detektirano): pod mejo zaznavnosti < 0,02 mg/100 g rumenjaka  
v sledovih: pod mejo določanja < 0,06 mg/100 g

Preglednica 23: Ksantofili v rumenjakih jajc iz ekološke reje

Table 23: Xanthophylls in egg yolks from organic husbandry

št. vzorca	lutein	zeaksantin	kantaksantin	etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat	$\beta$ -kriptoksantin	celokupni karotenoidi	barva rumenjaka (Roche)
	mg/100 g rumenjaka						
10	0,63	0,43	n.d.	n.d.	v sledovih	1,4	6,2
26	0,81	0,53	0,32	0,14	v sledovih	2,4	10,8
30	3,05	0,71	n.d.	n.d.	0,06	4,6	10,3
43	1,42	0,96	n.d.	n.d.	0,06	2,9	8,2
50	2,37	1,35	v sledovih	n.d.	0,11	5,9	13,7
51	1,78	0,91	v sledovih	n.d.	v sledovih	4,1	10,0
52	2,07	0,65	n.d.	n.d.	v sledovih	4,1	9,3
53	1,38	1,24	v sledovih	n.d.	0,07	3,6	10,7
54	2,13	1,17	v sledovih	n.d.	0,09	4,8	10,3
55	1,94	0,97	v sledovih	n.d.	0,06	4,1	10,0
56	2,15	1,18	v sledovih	n.d.	0,07	4,8	12,0
57	0,78	0,48	v sledovih	n.d.	v sledovih	2,0	8,3
58	2,14	1,06	v sledovih	n.d.	v sledovih	4,9	10,7
64	1,78	1,01	v sledovih	n.d.	0,07	5,1	10,7

n.d. (ni detektirano): pod mejo zaznavnosti < 0,02 mg/100 g rumenjaka

v sledovih: pod mejo določanja < 0,06 mg/100 g

V preglednici 24 so povzeti parametri opisne statistike za vsebnost preiskovanih ksantofilov in celokupnih karotenoidov ter intenzivnost barve rumenjaka po načinu reje za jajca s slovenskega tržišča. Če primerjamo rezultate z ostalimi študijami vidimo, da v povprečju jajca na slovenskem tržišču vsebujejo več ksantofilov kot pa jajca na drugih tržiščih, z izjemo ekološke reje, kjer sta sestava in vsebnost ksantofilov primerljivi z določenimi v jajcih na nemškem trgu (Schlatterer in Breithaupt, 2006). V rumenjakih jajc z nemškega trga sta Schlatterer in Breithaupt (2006) določila v 100 g rumenjaka jajc iz baterijske reje 0,41 mg luteina in 0,40 mg zeaksantina, iz hlevske reje 0,54 mg luteina in 0,22 mg zeaksantina, iz proste reje 0,75 mg luteina in 0,33 mg zeaksantina ter iz ekološke reje 1,76 mg luteina in 1,02 mg zeaksantina. Iz tega je razvidno, da se v jajcih z nemškega tržišča vsebnost naravno prisotnih ksantofilov (luteina in zeaksantina) zmanjšuje po sledečem redu ekološka > prosta > hlevska > baterijska reja, v jajcih s slovenskega tržišča pa se vsebnost zmanjšuje v tem zaporedju baterijska > hlevska > ekološka > prosta. Eden izmed razlogov za razliko v vsebnosti ksantofilov je bo vsej verjetnosti uporaba različnih krmnih mešanic in pa uporaba različnih pasem kokoši nesnic (Campo in sod., 2013; Şekeroğlu in sod., 2008). Poleg luteina in zeaksantina pa se na nemškem tržišču v rumenjakih jajc iz baterijske, hlevske in proste reje pojavljata tudi kantaksantin in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, v rumenjakih jajc iz proste reje pa tudi citranaksantin (Schlatterer in Breithaupt, 2006). Le v rumenjakih jajc iz ekološke reje pa so določili 0,83 mg  $\beta$ -kriptoksantina/100 g rumenjaka. Handelamn in sodelavci (1999) so za študijo na ljudeh uporabili jajca, ki so vsebovala v 100 g rumenjaka 0,29 mg luteina in 0,21 mg zeaksantina.



Leth in sodelavci (2000) so kot del študije o uživanju karotenoidov na Danskem določali vsebnost luteina v jajcih. V 100 g rumenjaka jajc iz baterijske reje so določili 0,53 mg, iz proste reje 0,38 mg in iz ekološke reje 1,32 mg luteina. Perry in sodelavci (2009) pa so v 100 g rumenjaka določili 0,79 mg luteina in 0,76 mg zeaksantina.

Preglednica 24: Parametri opisne statistike za vsebnost luteina (1), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6),  $\beta$ -kriptoksantina (8) in barva rumenjaka v rumenjakih jajc na slovenskem trgu (n = 64)

Table 24: Parameters of descriptive statistics for the content of lutein (1), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4), etil-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (6),  $\beta$ -criptoxanthin (8) and yolk colour in egg yolks from Slovenian market (n = 64)

reja		1	3	4	6	8	celokupni	barva
		mg/100 g rumenjaka						karotenoidi
baterijska	povprečje	2,11	0,84	0,68	0,33	0,04	4,39	12,6
	SD	0,88	0,18	0,33	0,71	0,02	1,52	1,2
	mediana	2,12	0,83	0,63	0,09	0,04	4,10	12,8
	MIN	0,44	0,45	0,02	0,02	0,02	2,43	9,5
	MAKS	4,05	1,32	1,38	3,93	0,06	10,48	14,2
hlevska	povprečje	1,90	0,82	0,70	0,17	0,04	4,10	12,5
	SD	0,71	0,15	0,38	0,32	0,01	0,70	1,8
	mediana	2,22	0,85	0,72	0,02	0,04	3,97	12,8
	MIN	0,61	0,58	0,02	0,02	0,02	3,11	8,2
	MAKS	2,74	1,01	1,43	1,03	0,06	5,26	14,7
prosta	povprečje	1,53	0,82	0,34	0,12	0,03	3,95	11,2
	SD	0,49	0,18	0,26	0,11	0,01	0,95	2,2
	mediana	1,70	0,90	0,25	0,06	0,03	4,21	11,2
	MIN	0,72	0,55	0,02	0,02	0,02	2,11	7,0
	MAKS	2,09	1,05	0,72	0,26	0,05	5,17	14,0
ekološka	povprečje	1,75	0,90	0,04	0,03	0,06	3,93	10,1
	SD	0,68	0,30	0,08	0,03	0,02	1,30	1,8
	mediana	1,86	0,97	0,02	0,02	0,06	4,13	10,3
	MIN	0,63	0,43	0,02	0,02	0,03	1,44	6,17
	MAKS	3,05	1,35	0,32	0,14	0,11	5,91	13,7

Ker je več kot četrtnina jajc (n = 46), ki jih najdemo na slovenskem tržišču, uvoženih iz držav EU, smo želeli izračunati opisano statistiko le na podlagi rezultatov analize jajc kokoši slovenskih rejcev (preglednica 25). Z izključitvijo rezultatov analize jajc kokoši tujih rejcev (18 vzorcev) lahko opazimo (glej preglednici 24 in 25) večjo vsebnost ksantofilov in celokupnih karotenoidov ter večjo intenzitete barve rumenjaka v jajcih iz baterijske, hlevske in proste reje, z izjemo jajc iz ekološke reje. V vzorcih jajc kokoši tujih rejcev smo tako določili v 100 g rumenjaka jajc iz baterijske reje (n = 6)  $1,69 \pm 0,62$  mg

luteina in  $0,76 \pm 0,17$  mg zeaksantina, iz hlevske reje ( $n = 2$ )  $1,41 \pm 0,59$  mg luteina in  $0,84 \pm 0,25$  mg zeaksantina, iz proste reje ( $n = 5$ )  $1,37 \pm 0,60$  mg luteina in  $0,82 \pm 0,21$  mg zeaksantina ter iz ekološke reje ( $n = 5$ )  $1,89 \pm 0,85$  mg luteina in  $0,86 \pm 0,33$  mg zeaksantina. Vsebnost luteina je tako v rumenjakih jajc kokoši tujih rejcev, ki pripadajo baterijskemu, hlevskemu in prostemu načinu reje, za 10–25 % manjša kot v rumenjakih jajc kokoši slovenskih rejcev, medtem ko je v rumenjakih jajc iz ekološkega načina reje vsebnost luteina za 8 % večja. Vsebnost zeaksantina v jajcih kokoši slovenskih in tujih rejcev pa je zelo podobna ne glede na način reje. Tudi vsebnost kantaksantina ( $0,17$ – $0,55$  mg/100 g) in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata ( $0,02$ – $0,10$  mg/100 g) je v rumenjakih jajc kokoši tujih rejcev manjša. Iz tega lahko povzamemo, da imajo jajca kokoši tujih rejcev, ki jih uvozimo v Slovenijo, v povprečju manjšo vsebnost ksantofilov in posledično tudi manj intenzivno barvo rumenjaka.

Preglednica 25: Parametri opisne statistike za vsebnost luteina (1), zeaksantina (3), kantaksantina (4),  $\beta$ -apo-8'-karotenala (5), etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (6),  $\beta$ -kriptoksantina (8) in barvo rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev ( $n = 46$ )

Table 25: Parameters of descriptive statistics for the content of lutein (1), zeaxanthin (3), canthaxanthin (4), etil-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oate (6),  $\beta$ -criptoxanthin (8) and yolk colour in egg yolks from Slovenian farmers of laying hens ( $n = 46$ )

reja		1	3	4	6	8	celokupni	barva
		mg/100 g rumenjaka						karotenoidi
baterijska	povprečje	2,21	0,86	0,78	0,39	0,04	4,46	13,0
	SD	0,92	0,18	0,25	0,78	0,01	1,57	0,9
	mediana	2,13	0,86	0,67	0,23	0,04	4,10	13
	MIN	0,44	0,56	0,46	0,02	0,02	4,23	11
	MAKS	4,05	1,32	1,38	3,93	0,06	10,48	14,2
hlevska	povprečje	2,02	0,82	0,74	0,21	0,04	4,26	12,5
	SD	0,72	0,15	0,40	0,35	0,01	0,67	1,9
	mediana	2,32	0,85	0,72	0,02	0,04	4,33	12,8
	MIN	0,61	0,58	0,02	0,02	0,02	3,35	8,2
	MAKS	2,74	1,00	1,43	1,03	0,05	5,26	14,7
prosta	povprečje	1,72	0,83	0,56	0,20	0,03	4,46	12,7
	SD	0,30	0,18	0,22	0,10	0,01	0,57	1,4
	mediana	1,72	0,92	0,64	0,25	0,03	4,42	11,4
	MIN	1,34	0,57	0,25	0,06	0,02	3,84	10,7
	MAKS	2,09	0,93	0,72	0,26	0,05	5,17	14,0
ekološka	povprečje	1,66	0,93	0,03	0,02	0,06	3,93	9,8
	SD	0,61	0,30	0,01	0,02	0,02	1,50	2,9
	mediana	1,78	0,97	0,02	0,02	0,06	4,14	10,3
	MIN	0,63	0,43	0,02	0,02	0,03	1,44	6,2
	MAKS	2,37	1,35	0,05	0,02	0,11	5,91	13,7

Za dobro obarvanje rumenjaka je pomemben predvsem dodatek rumenih ksantofilov, ki ustvarijo dobro osnovo za dodatek rdečih ksantofilov in tako preprečijo neprimerno rozasto obarvanje (Beardsworth in Hernandez, 2004). Pri primerjavi podatkov za jajca kokoši kupljenih v nemški lokalni trgovini (Schlatterer in Breithaupt, 2006) opazimo, da je vsebnost kantaksantina v jajcih primerljiva na obeh tržiščih (nemška jajca 0,62–0,87 mg/100 g rumenjaka, slovenski rejci 0,56–0,78 mg/100 g), medtem ko je etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata za dva in večkrat več kot v jajcih na slovenskem tržišču (nemška jajca 0,67–0,81 mg/100 g rumenjaka, slovenski rejci 0,20–0,39 mg/100 g). Ob predpostavki, da so bila jajca iz nemškega tržišča tudi nemških rejcev lahko sklepamo, da slovenski rejci uporabljajo predvsem dodatke z naravnimi viri luteina za ustvarjanje rumene osnove, medtem ko pomanjkanje vsebnosti rumenih karotenoidov rejci v Nemčiji nadomeščajo z dodatkom sintetičnega etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata, saj ima boljše učinkovitost nalaganja v rumenjaki (Marusich in Bauernfeind, 1981). Za doseganje rumeno-oranžne barve pa se kot rdeči ksantofil na obeh trgih uporablja predvsem kantaksantin, čeprav k rumeno-oranžni barvi prispevata tudi zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin. Vsebnost celokupnih karotenoidov v rumenjakih jajc kokoši slovenskih rejcev pa je v povprečju pri vseh rejah kar izenačena in se giblje okoli 4 mg/100 g rumenjaka (preglednica 25), medtem ko vsebujejo jajca iz uvoza v povprečju 3,5 mg celokupnih karotenoidov /100 g rumenjaka.

Medtem ko je malo znanih podatkov o vsebnosti posameznih ksantofilov v rumenjakih jajc iz različnih rej na različnih tržiščih, pa je na voljo nekaj več podatkov o intenziteti barve rumenjaka, določeni po Rochejevi barvni lestvici. Tako kot v drugih študijah tudi v naši (preglednici 25) opazimo manjšo intenziteto barve rumenjaka pri jajcih iz ekološke reje, in sicer okoli 10, v primerjavi z jajcih iz ostalih načinov rej (Hidalgo in sod., 2008; Holcman in sod., 1997; Pajk-Žontar in sod., 2010), čeprav naj bi imeli rumenjaki jajc iz načina reje, kjer imajo kokoši prost dostop do pašne, večjo intenziteto barve (Krawczyk in sod., 2011; Campo in sod., 2013; Senčić in Butko, 2006). Pri jajcih iz uvoza pa smo opazili, da imajo jajca iz ekološke reje nekoliko intenzivnejše obarvane rumenjake (11 po Roche), medtem ko so rumenjaki pri jajcih iz ostalih načinov rej manj intenzivno obarvani.

Iz preglednice 25 je razviden tudi velik razpon med najmanjšo in največjo vsebnostjo posameznih ksantofilov, kar lahko pripisujemo uporabi različnih krmnih mešanic, tako lahko recimo pri baterijski reji opazimo minimalno vsebnost luteina 0,44 mg/100 g rumenjaka, medtem ko je maksimalna vsebnost celo 10-krat večja. Pri tem pa je bila variabilnost vsebnosti karotenoidov znotraj ene reje za lutein 17–42 % (RSD), za zeaksantin pa 18–32 % (RSD). Najmanjša variabilnost vsebnosti karotenoidov je bila določena pri jajcih iz proste reje, največja pa pri jajcih iz baterijske reje, kar je podobno objavljenim podatkom, kjer je bila največja variabilnost vsebnosti ravno tako pri jajcih iz baterijske vendar najmanjša pri jajcih iz ekološke reje (Schlatterer in Breithaupt, 2006).

Da bi ugotovili, kateri od preiskovanih karotenoidov bi lahko bil uporabljen kot marker za razlikovanje med jajci iz različnih načinov rej, smo naredili analizo variance (ANOVA).

Ker sta bila  $\beta$ -apo-8'-karotenal in citranaksatin prisotna le v dveh vzorcih, smo ta dva ksantofila kot parametra izključili iz statističnega vrednotenja. Pred statistično analizo smo analizirali normalnost porazdelitve podatkov s tremi testi: D'Agostinov K-kvadrat, Bonnet-Seier in Shapiro-Wilkov test. Pri tem smo prišli do ugotovitev, da so vsi podatki normalno porazdeljeni z izjemo etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata. Za vsak analiziran ksantofil, celokupno vsebnost karotenoidov in intenzivnost barve rumenjaka smo naredili enosmerni ANOVA test ločeno kot odvisno spremenljivko, z načinom reje pa kot neodvisno spremenljivko. Kot dopolnilni test smo uporabili Fisherjev LSD (Least Significant Difference, najmanjša značilna razlika) test za določanje statistično značilne razlike med sredinami vzorcev. Rezultati so predstavljeni v preglednici 26. Na osnovi ANOVA testa smo ugotovili, da so ksantofila kantaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin ter barva rumenjaka pomembni parametri, ki vplivajo na razlikovanje jajc iz različnih načinov rej. Še posebno lahko izpostavimo  $\beta$ -kriptoksantin, ki ločuje jajca iz ekološke od jajc iz ostalih načinov rej, kar je v skladu z objavljenimi podatki (Schlatterer in Breithaupt, 2006), kjer je  $\beta$ -kriptoksantin prisoten le v jajcih iz ekološke reje. Poleg  $\beta$ -kriptoksantina pa naj bi se ekološka jajca razlikovala od ostalih tipov tudi glede vsebnosti zeaksantina in luteina (Schlatterer in Breithaupt, 2006; van Ruth in sod., 2011), vendar tega v naši študiji nismo potrdili. Noben drugi parameter pa ni ločil jajc iz baterijske, hlevske in proste reje v tri ločene skupine. Lutein, zeaksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat in vsebnost celokupnih karotenoidov pa so parametri, ki niso imeli vpliva na razlikovanje med jajci iz različnih načinov reje.

Preglednica 26: Analiza variance 64 rumenjakov različnih blagovnih znamk in rejcev s slovenskega tržišča (baterijska – 3, hlevska – 2, prosta – 1, ekološka – 0)

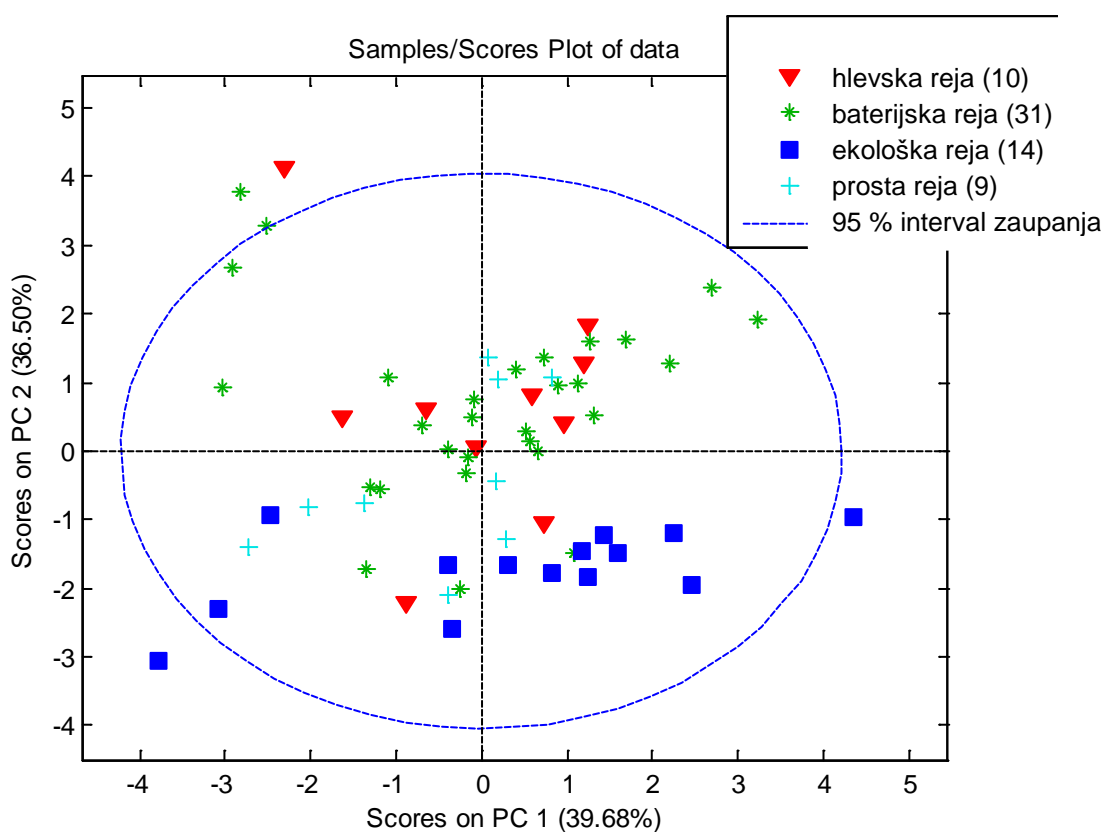
Table 26: Analysis of variances 64 egg samples different breeds and farmers of laying hens from Slovenian market (cage – 3, barn – 2, free range – 1, ecological – 0)

parameter	ANOVA test		
	$F^a$ ( $^aF_{cr} = 2,76$ )	$P$	Fisherjev LSD test (ločene regije so podane v oklepajih)
lutein	1,41	0,2477	-
zeaksantin	0,48	0,6941	-
kantaksantin	17,36	< 0,0001	3 (1, 0) 2 (1, 0) 1 (3, 2, 0) 0 (1, 3, 2)
etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat	1,32	0,3340	-
$\beta$ -kriptoksantin	9,03	< 0,0001	3 (0) 2 (0) 1 (0) 0 (3, 2, 1)
celokupni karotenoidi	0,45	0,7148	-
barva rumenjaka (Roche)	8,86	< 0,0001	3 (1, 0) 2 (0) 1 (3) 0 (3, 2)

Poleg analize variance smo izvedli tudi analizo rezultatov po metodi glavnih osi (Principal Component Analysis - PCA) z namenom, da bi dobili vpogled v osnovno strukturo podatkov, odkrili morebitne ubežnike in videli morebitno specifično grupiranje vzorcev. Pred multivariantno analizo so bili vsi podatki središčeni s skaliranjem na enoto standardnega odklona. Samoskaliranje je bilo izbrano kot metoda preobdelave podatkov, da bi preprečili, da bi podatki, ki predstavljajo velike količine, dominirali. Rezultat PCA analize je model treh glavnih osi, ki predstavljajo 88,72 % celotne variance podatkov. Prva glavna os (PC1) znaša 39,68 %, druga glavna os (PC2) 36,59 % in tretja glavna os (PC3) 12,54 % celotne variance podatkov. Na sliki 25 je prikazana porazdelitev 64 vzorcev rumenjakov jajc različnih blagovnih znamk in rejcev v ravnini prvih dveh glavnih osi (PC1 in PC2), ki razkrivata dve različni skupini vzorcev, ločeni po PC2 osi. Jajca iz ekološke reje so združena v spodnjem delu grafa, medtem ko se jajca iz baterijske in hlevske reje, združujejo v kompaktno skupino predvsem na nasprotni strani PC2 osi, jajca iz proste reje pa se porazdeljujejo po celotnem grafu PC1 in PC2 osi. Vz dolž osi PC1 se vzorci med seboj ne ločujejo. Slika 26 prikazuje, da so kantaksantin, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat in lutein spremenljivke, ki imajo najbolj pozitiven vpliv,  $\beta$ -kriptoksantin in zeaksantin pa izrazito negativen vpliv na os PC2. Spremenljivke lutein, zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin ter celokupni karotenoidi pa vplivajo pozitivno na os PC1, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat in

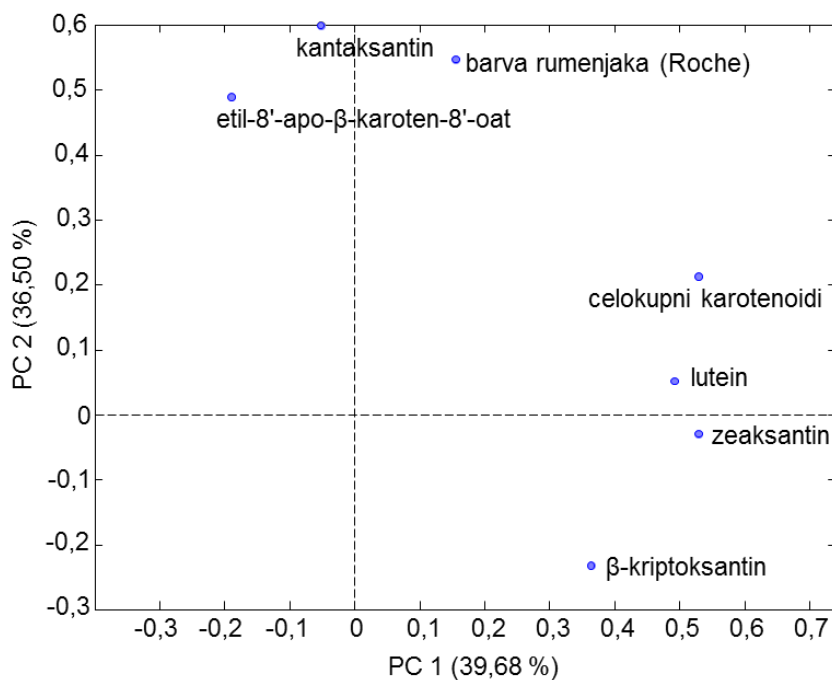
kantaksantin pa negativno. Van Ruth in sodelavci (2011) so ravno tako s pomočjo PCA analize ločili jajca iz ekološkega načina reje od jajc iz ostalih načinov rej. Jajca so se grupirala v majhnem delu treh glavnih osi predvsem v ravnini prvih dveh glavnih osi (PC1 in PC2). Naši rezultati so v skladu z objavljenimi (van Ruth in sod, 2011; van Ruth in sod 2013) kar narekuje, da je mogoče s pomočjo PCA analize določiti način reje.

Več vzorcev med drugim tudi presega mejne vrednosti Hotelling T2 95 % verjetnostne elipse, zato bi te vzorce lahko izločili kot ubežnike. Ti prihajajo iz baterijske in hlevske reje in imajo večjo vsebnost kantaksantina in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata (vzorci 29, 40, in 42) ter iz ekološke reje, ker imajo večjo ali manjšo vsebnost zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina (vzorca 10 in 50).



Slika 25: Porazdelitev vzorcev 64 rumenjakov različnih blagovnih znamk in rejcev s slovenskega tržišča po metodi glavnih osi

Figure 25: Distribution of 64 egg yolks samples of different breeds and farmers of laying hens form Slovenian market in Principal Component Analysis



Slika 26: Vpliv spremenljivk na porazdelitev vzorcev 64 rumenjakov različnih blagovnih znamk in rejcev s slovenskega tržišča po metodi glavnih osi

Figure 26: The impact of variables on distribution of 64 egg yolks samples of different breeds and farmers of laying hens from Slovenian market in Principal Component Analysis

Ker pa na porazdelitev vpliva veliko neznank, kot so pasma kokoši, geografska lega, načini reje, smo naredili enosmerni ANOVA test in PCA analizo samo na podlagi rezultatov analiz rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev. Tudi tu smo na osnovi ponovnega ANOVA testa (slika 27) ugotovili, da so ksantofila kantaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin ter barva rumenjaka pomembni parametri, ki pa v tem primeru vplivajo le na razlikovanje jajc iz baterijske reje od jajc iz ostalih načinov rej.

Preglednica 27: Analiza variance 46 vzorcev jajc kokoši slovenskih rejcev različnih blagovnih znamk (baterijska – 3, hlevska – 2, prosta – 1, ekološka – 0)

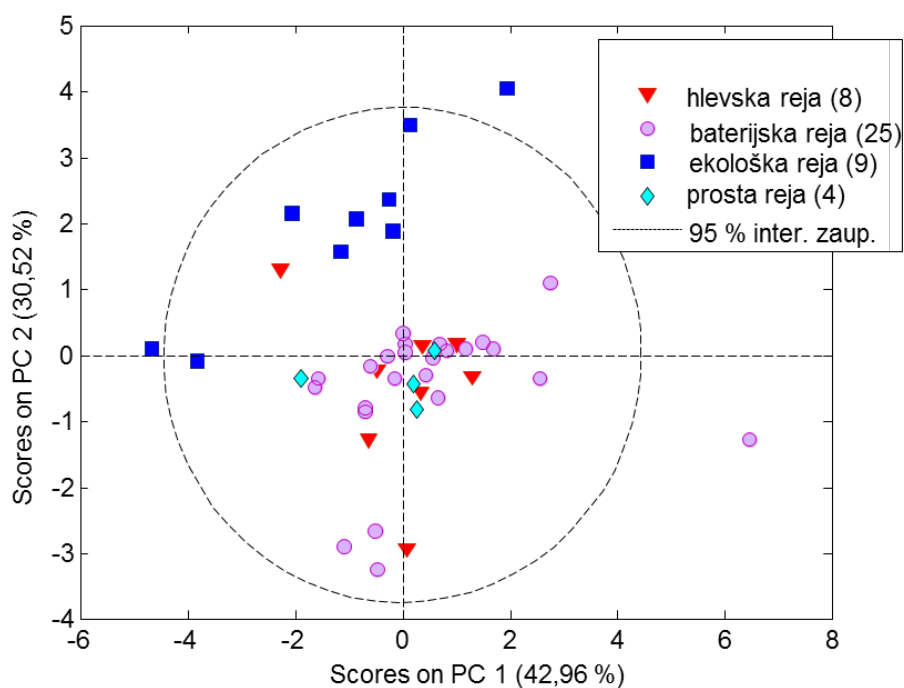
Table 27: Analysis of variances of 46 egg samples from different Slovenian farmers of laying hens and breeds (cage – 3, barn – 2, free range – 1, ecological – 0)

parameter	ANOVA test		
	$F^a$ ( $^aF_{cr} = 2,76$ )	$P$	Fisherjev LSD test (ločene regije so podane v oklepajih)
lutein	1,06	0,3752	-
zeaksantin	0,47	0,7029	-
kantaksantin	18,63	< 0,0001	ekološka (1, 2, 3)
etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat	0,92	0,4374	-
$\beta$ -kriptoksantin	6,43	0,0011	0(1, 2, 3)
celokupni karotenoidi	0,56	0,6426	-
RYCF indeks	10,86	< 0,0001	0(1, 2, 3)

Porazdelitev vzorcev rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev je prikazana na sliki 27, ker prve tri osi zajemajo 85,39 % celotne variance (PC1 42,96 %, PC2 30,52 % in PC3 11,91 %). Pri primerjavi slik 25 in 27 lahko vidimo, da se na sliki 27, ker pri izračunu nismo upoštevali rezultatov analiz rumenjakov jajc kokoši tujih rejcev, jajca iz ekološke reje združujejo še v kompaktnejšo skupino, medtem ko se jajca iz baterijske, hlevske in proste reje, združujejo v kompaktno skupino predvsem na nasprotni strani PC2 osi. Pri primerjavi vpliva posameznih spremenljivk na porazdelitev (slika 28), vidimo da je vpliv posameznih spremenljivk na porazdelitev po PC2 osi obraten, kot pri prejšnji PCA analizi (slika 26), medtem ko imajo vse spremenljivke pozitiven vpliv na PC1 os.

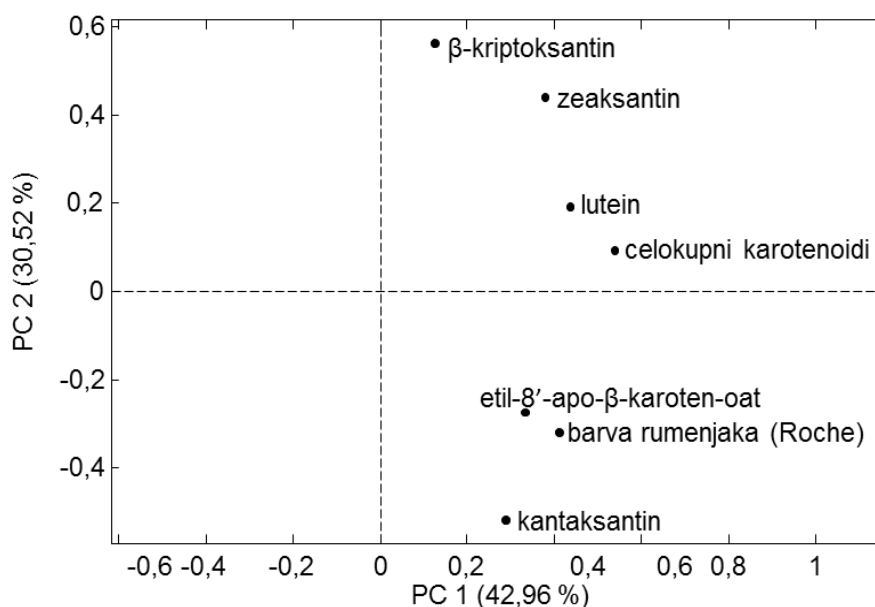
Tudi tu najdemo nekaj ubežnikov in sicer dva vzorca jajc iz ekološke reje (vzorec 10 in 50) in en vzorec iz baterijske reje (vzorec 22).





Slika 27: Porazdelitev vzorcev 46 rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev različnih blagovnih znamk po metodi glavnih osi

Figure 27: Distribution of 46 egg yolks samples from different Slovenian farmers of laying hens and breeds in Principal Component Analysis



Slika 28: Vpliv spremenljivk na porazdelitev 46 rumenjakov jajc kokoši slovenskih rejcev različnih blagovnih znamk vzorcev jajc po metodi glavnih osi

Figure 28: The impact of variables on distribution of 46 egg yolks samples from different Slovenian farmers of laying hens and breeds in Principal Component Analysis

Nadalje smo s pomočjo toplotnega grafa (heatmap) med vsemi 64 vzorci in parametri ugotovili, da obstaja povezava med kantaksantinom in intenzivnost barve rumenjaka ter med zeaksantinom,  $\beta$ -kriptoksantin in celokupnimi karotenoidi (Priloga A). Iz povezav lahko sklepamo, da na barvo jajčnega rumenjaka v veliki meri vpliva vsebnost kantaksantina, medtem ko na vsebnost celokupnih karotenoidov vplivajo predvsem zeaksantin ( $\beta$ -kriptoksantin ne vpliva zaradi premajhne vsebnosti v rumenjakih) malo manj pa lutein in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat. Razlog vpliva zeaksantina na celokupne karotenoide je absorpcijski maksimum, ki se ujema z valovno dolžino, pri kateri smo merili celokupne karotenoide. Lutein in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat imata nižji specifični koeficient absorpcije pri 450 nm, zato njuna vsebnost ne vpliva v tolikšni meri na vsebnost celokupnih karotenoidov, še manj vpliva pa ima prisotni kantaksantin. S spektrofotometričnim določanjem celokupnih karotenoidov v acetonu pri 450 nm zajamemo predvsem vsebnost zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, ter v manjši meri lutein in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat, zajamemo pa tudi manj kantaksantina. Da pa na barvo rumenjaka vpliva predvsem kantaksantin, je razlog v rdeči obarvanosti kantaksantina, ki zato najbolj pripomore k večji (nad 11) intenzivnosti barve rumenjaka.

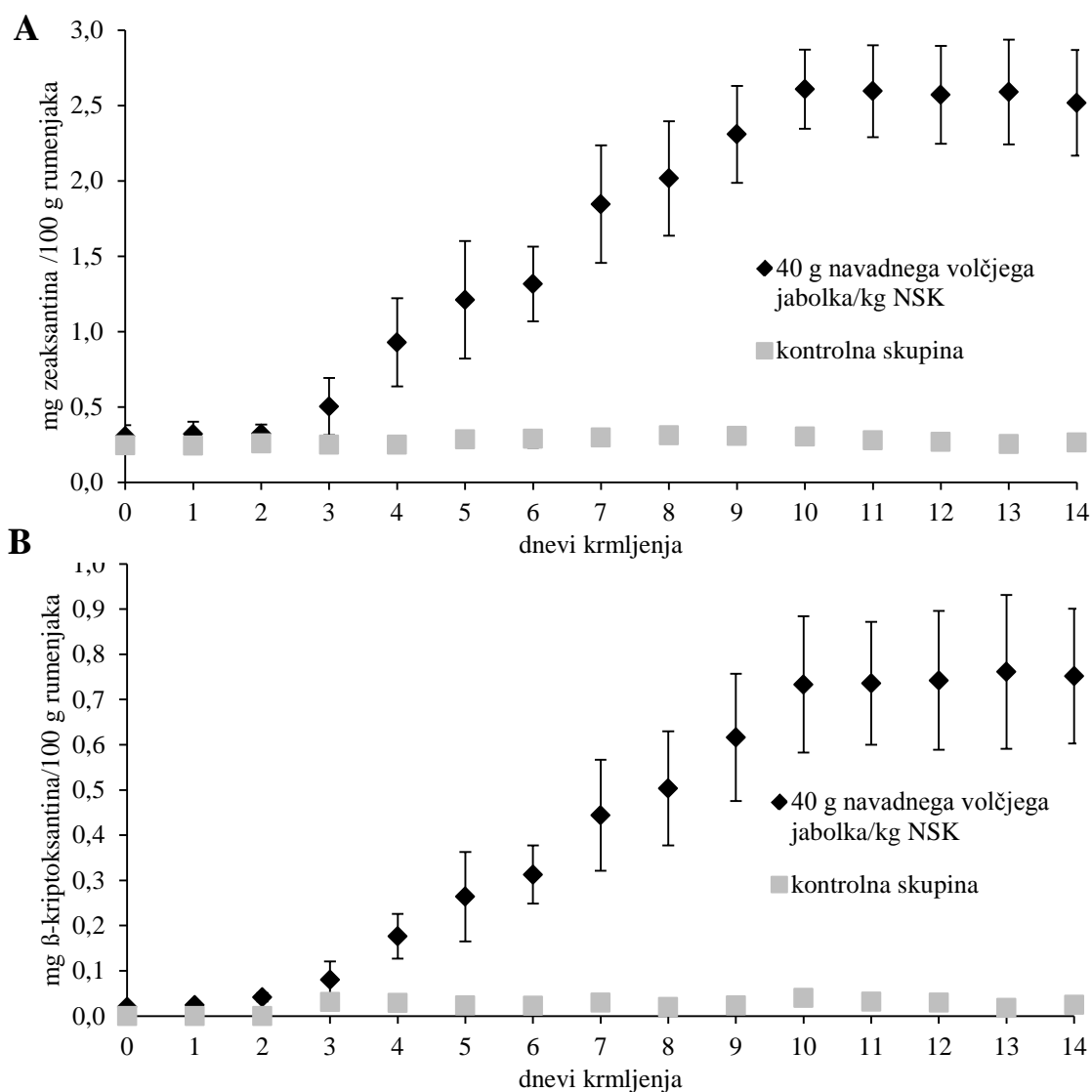
Pridobljeni rezultati o vsebnosti karotenoidov v jajcih, ki se pojavljajo na trgovskih policah, predstavljajo pomemben prispevek k oceni prehranske vrednosti jajc, ki jih kupujejo slovenski potrošniki. Jajca, ki jih potrošnik kupuje na slovenskem tržišču, imajo veliko vsebnost ksantofilov, pri čemer so se jajca kokoši slovenskih rejcev izkazala za boljše v primerjavi z uvoženimi jajci.

#### **4.1.6 Ksantofili v jajcih nesnic krmljenih z dodatkom navadnega volčjega jabolka**

Ksantofila zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin (provitamin A) sta pomembna predvsem za zdravje naših oči, slednji v obliki vitamina A, ki nastane iz njega. Naravno sta oba prisotna tudi v jajčnem rumenjaku, ki je zaradi matriksa in enostavnega manipuliranja vsebnosti ksantofilov preko krme odličen medij za prenos ksantofilov. Med drugim naj bi bila absorpcija ksantofilov celo veliko boljše iz jajca kot pa iz zelenjave in prehranskih dopolnil (Chung in sod., 2004). Zaradi dobre absorpcije hranil iz jajc (Surai in sod., 2000) se na trgu pojavljajo obogatena jajca z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, nekaterimi vitamini, selenom in luteinom (Sparks, 2006; Rajasekaran in Kalaivani, 2013; Surai in Sparks, 2001). Navkljub velikemu pomenu pa danes jajca še niso obogatena z zeaksantinom in  $\beta$ -kriptoksantinom. Na voljo je tudi malo raziskav o obogatitvi jajca z zeaksantinom (Karunajeewa in Hofmann, 1992) ali  $\beta$ -kriptoksantinom (Liu in sod., 2012). Le en poskus iz leta 1932 pa je bil narejen z dodatkom navadnega volčjega jabolka, kot vira zeaksantina, h krmi kokoši (Kuhn in Brockmann, 1932).

Za študijo smo 14 dni pet kokoši krmili s krmo NSK, ki smo ji primešali suhe povečane čaše in jagode navadnega volčjega jabolka (40 g/kg krme NSK). Kontrolna skupina petih kokoši pa je bila krmljena s krmo NSK. Analiza končne krmne mešanice s primešanimi deli navadnega volčjega jabolka pred začetkom in na koncu študije je pokazala, da sta preiskovana karotenoida v krmni mešanici stabilna, saj je krma pred študijo vsebovala 102,5 zeaksantina mg in 16,2 mg  $\beta$ -kriptoksantina na kg krme NSK, po študiji pa 110,8 mg zeaksantina in 18,7  $\beta$ -kriptoksantina na kilogram krme NSK, kar je v območju napake. V povprečju (pred in po študiji) je krmna mešanica s primešanimi deli navadnega volčjega jabolka vsebovala 106,6 g zeaksantina in 17,5 g  $\beta$ -kriptoksantina na kg krme NSK, medtem ko je obrok kontrolne skupine vseboval 1,1 g zeaksantina na kg krme NSK in v majhni količini  $\beta$ -kriptoksantina (0,15 g/kg krme NSK). Vsebnost dodanih ksantofilov v krmi je daleč od največje dovoljene vsebnosti dodanih ksantofilov, ki je 80 mg/kg krme (EFSA, 2009). Med študijo smo jajca tehtali, spremljali barvo in maso rumenjakov, sestavo in vsebnost karotenoidov ter vsebnost celokupnih karotenoidov v rumenjakih.

Slika 29 prikazuje povečanje vsebnosti zeaksantina,  $\beta$ -kriptoksantina in luteina v rumenjakih v odvisnosti od dneva krmljenja s krmo NSK, kateri smo dodali 40 g mešanice suhih povečanih čaš in jagod navadnega volčjega jabolka na kilogram. Koncentracija zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina se je v rumenjakih stabilizirala deseti dan po začetku krmljenja z obogateno krmo, brez zviševanja v naslednjih dneh, kar potrjuje ugotovitve drugih avtorjev (Lai in sod., 1996; Marusich in Bauernfeind., 1981), o stabilizaciji koncentracije karotenoidov v okoli desetih dneh. Po stabilizaciji je rumenjak v povprečju vseboval  $2,57 \pm 0,29$  mg zeaksantina/100 g rumenjaka in  $0,74 \pm 0,14$  mg  $\beta$ -kriptoksantina/100 g rumenjaka (preglednica 28). Z dodatkom 40 g suhih jagod in povečanih čaš na kg NSK smo v primerjavi s kontrolno skupino uspeli v rumenjakih doseči povečanje vsebnosti ksantofilov in sicer zeaksantina za 9,4-krat,  $\beta$ -kriptoksantina za 26,8-krat in luteina za 2,1-krat. V primerjavi z jajci, ki se prodajajo na slovenskem tržišču (glej poglavje 4.1.4 preglednica 24), smo v povprečju dosegli 3-kratno povečanje vsebnosti zeaksantina in 10-kratno povečanje  $\beta$ -kriptoksantina. Dosežena vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina je več kot 3-krat večja kot v študiji, kjer so spremljali vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina s pomočjo koruze obogatene z  $\beta$ -kriptoksantinom in je vsebnost znašala 4,20 nmol/g, kar je 0,23 mg/100 g rumenjaka (Liu in sod., 2012). Kelly in sodelavci (2014) so v okviru študije uporabili z zeaksantinom obogatena jajca, ki so vsebovala  $174,3 \pm 14,5$   $\mu$ g luteina in  $478 \pm 31,0$   $\mu$ g zeaksantina na rumenjak, kar je malo več v primerjavi z našimi, kjer eno jajce vsebuje 0,43 mg zeaksantina, 0,18 mg luteina in 0,12 mg  $\beta$ -kriptoksantina.



Slika 29: Povprečna vsebnost ( $\pm$  SD) zeaksantina (**A**) in  $\beta$ -kriptoksantina (**B**) v 5 rumenjakih glede na čas krmljenja s 40 g mešanice suhih povečanih čaš in jagod navadnega volčjega jabolka na kg popolne krmne mešanice za kokoši nesnice (NSK)

Figure 29: The average content ( $\pm$  SD) of zeaxanthin (**A**) and  $\beta$ -cryptoxanthin (**B**) in 5 egg yolks in relation to the day of feeding with 40 g of mixture of dry berries and husks of Chinese lantern per kg of complete feeding mixture for laying hens (NSK)

Preglednica 28: Parametri opisne statistike za vsebnosti luteina, zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina po stabilizaciji njihove vsebnosti (po 10. dnevu) v rumenjakih jajc pri kontrolni skupini (krma NSK) in pri poskusni skupini (40 mg navadnega volčjega jabolka na kg krme NSK)

Table 28: Parameters of descriptive statistics of the content of lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin after stabilization of their content (after 10<sup>th</sup> day) in the egg yolks in the control (fodder NSK) and experimental groupe (40 g Chinese lantern/kg fodder NSK)

	zeaksantin (mg/100 g rumenjaka)		$\beta$ -kriptoksantin (mg/100 g rumenjaka)	
	kontrolna skupina	poskusna skupina	kontrolna skupina	poskusna skupina
<b>aritmetična sredina</b>	0,27	2,57	0,03	0,74
<b>SD</b>	0,04	0,29	0,01	0,14
<b>mediana</b>	0,26	2,59	0,03	0,74
<b>MIN</b>	0,21	2,06	0,02	0,53
<b>MAKS</b>	0,33	2,99	0,06	0,95

Relativna vsebnost karotenoidov v jajcih odraža tisto v krmi. Pri tem pa ima lutein večjo učinkovitost nalaganja v rumenjaki od  $\beta$ -kriptoksantina. Od provitaminov A se zaradi kemijske strukture  $\beta$ -kriptoksantin najbolje nalaga v rumenjaki in s tem posledično vpliva na večjo vsebnost vitamina A v jajcu (Liu in sod., 2012).

Vsebnost celokupnih karotenoidov se je trikrat povečala v primerjavi s kontrolno skupino (preglednica 27) in je znašala  $4,43 \pm$  mg/100 g rumenjaka, kar je nekje v povprečju z vzorci jajc s slovenskega tržišča (glej preglednica 24). Za barvo karotenoidov pa ni pomembna njihova koncentracija, pač pa je pomemben predvsem spekter karotenoidov. Z naravnimi izvori karotenoidov, kot so: koruza, koruzni gluten, pokončna žametnica, lucerna, ki se uporabljajo kot krmni dodatki in vsebujejo predvsem veliko luteina, lahko obarvamo karotenoide do intenzivnosti barve rumenjaka 11 po Rochejevi barvni lestvici (Nys, 2000; Chowdhury in sod., 2008; Lokaewmanee in sod., 2011), z izjemo ekstrakta paprike (Galobart in sod., 2004) ali dodatka velike količine luteina (250 mg /kg krme) (Leeson in Caston, 2004), kar pa ni ekonomično. Z dodatkom prostega zeaksantina h krmi (35 mg/kg) je mogoče doseči intenzivnost barve rumenjaka 12,9 (Karunajeewa in Hofmann, 1992), kar potrjujejo tudi naši rezultati, saj je bila po stabilizaciji dosežena povprečna intenzivnost barve rumenjaka 13,2 (preglednica 29). Poleg zeaksantina pa tudi  $\beta$ -kriptoksantin prispeva k rumeno-oranžnemu obarvanju rumenjaka (Liu in sod., 2012).

Nesnost se je pri kokoših, ki so prejemale suhe dele navadnega volčjega jabolka, malenkost poslabšala (95 %) v primerjavi s kontrolno skupino (97 %). Poleg upada nesnosti pa smo opazili rahlo povečanje mase jajc skozi študijo v obeh skupinah (preglednica 29). Jajca kokoši, krmljenih z navadnim volčjim jabolkom, so bila v dneh krmljenja od 10 do 14 dni (plato koncentracija zeaksantina 2,57 mg/100 g rumenjaka in  $\beta$ -kriptoksantina 0,74 mg/100 g rumenjaka; slika 29) malo težja (za okoli 3 %) od jajc kontrolne skupine. Masa rumenjakov se med študijo ni spremenila. Vpliv dodatka

navadnega volčjega jabolka na nesnost, maso jajca in rumenjaka niso ravno zanesljivi in bi ga morali posebej raziskati na večjem številu kokoši in dlje časa.

Preglednica 29: Parametri opisne statistike vsebnosti celokupnih karotenoidov, barve rumenjaka, mase jajca in rumenjaka po stabilizaciji vsebnosti ksantofilov (po 10. dnevu) pri kontrolni (krma NSK) in pri poskusni skupini (40 mg navadnega volčjega jabolka/kg krme NSK)

Table 29: Parameters of descriptive statistics of the content of total carotenoids, yolk colour, egg and yolk weight after stabilizing level of xanthophylls (after 10<sup>th</sup> day) in the control (fodder NSK) and experimental group (40 mg Chinese lantern/kg fodder NSK)

	celokupni karotenoidi (mg/100 g)		barva rumenjaka (Roche)		masa jajca (g)		masa rumenjaka (g)	
	kontrolna skupina	poskusna skupina	kontrolna skupina	poskusna skupina	kontrolna skupina	poskusna skupina	kontrolna skupina	poskusna skupina
<b>aritmetična sredina</b>	1,59	4,38	8,3	13,2	61,3	63,1	16,4	16,8
<b>SD</b>	0,15	0,47	1,1	0,6	2,5	4,2	1,2	1,3
<b>mediana</b>	1,62	4,41	8,0	13,0	60,7	63,0	16,2	17,1
<b>MIN</b>	1,38	3,57	7,0	12,0	58,3	55,4	14,2	14,0
<b>MAKS</b>	1,90	5,03	11,0	14,0	68,0	75,5	18,5	18,3

Čeprav do danes še ni bila določena referenčna vrednost za vnos zeaksantina pa se priporoča vnos 2 mg/dan, saj naj bi ta vsebnost v eni izmed novejših kliničnih študij, skupaj z 10 mg luteina/dan, vplivala na upočasnjeno napredovanje starostne degeneracije makule (Chew in sod., 2013). Ob tej predpostavki, bi z enim jajcem, ki vsebuje 0,43 mg zeaksantina in 0,12 mg  $\beta$ -kriptoksantina, zagotovili kar 21,5 % priporočenega dnevnega vnosa zeaksantina, z dvema pa kar 43 %. Zaradi velike vsebnosti holesterola (glej preglednico 1) pa zaužitje dveh jajc na dan ni priporočljivo, čeprav zadnje študije dokazujejo, da prehrana bogata z jajci nima vpliva na aterosklerozo in povečanje rizika za kardiovaskularne bolezni (Gray in Griffin, 2009)

Vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina je kljub občutno povečani vsebnosti v jajcu premajhna, da bi imela velik doprinos k nastanku vitamina A (10  $\mu$ g retinolnega ekvivalenta). Z večanjem  $\beta$ -kriptoksantina v krmnem obroku nesnic pa obstaja verjetnost, da je kokoš pretvorila  $\beta$ -kriptoksantin v vitamin A, zato je verjetno da to jajce vsebuje povečano vsebnost vitamina A, ki pa ga v naši študiji nismo določali.

Zaradi povečane vsebnosti zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina bi lahko imelo tako jajce specifično funkcionalno vrednost, predvsem bi zmanjšalo tveganje za pojav nekaterih zdravstvenih težav, predvsem z očmi, saj prav zeaksantinu skupaj z luteinom pripisujejo ugoden vpliv na preprečevanje starostne degeneracije makule in nastanku sive mreže

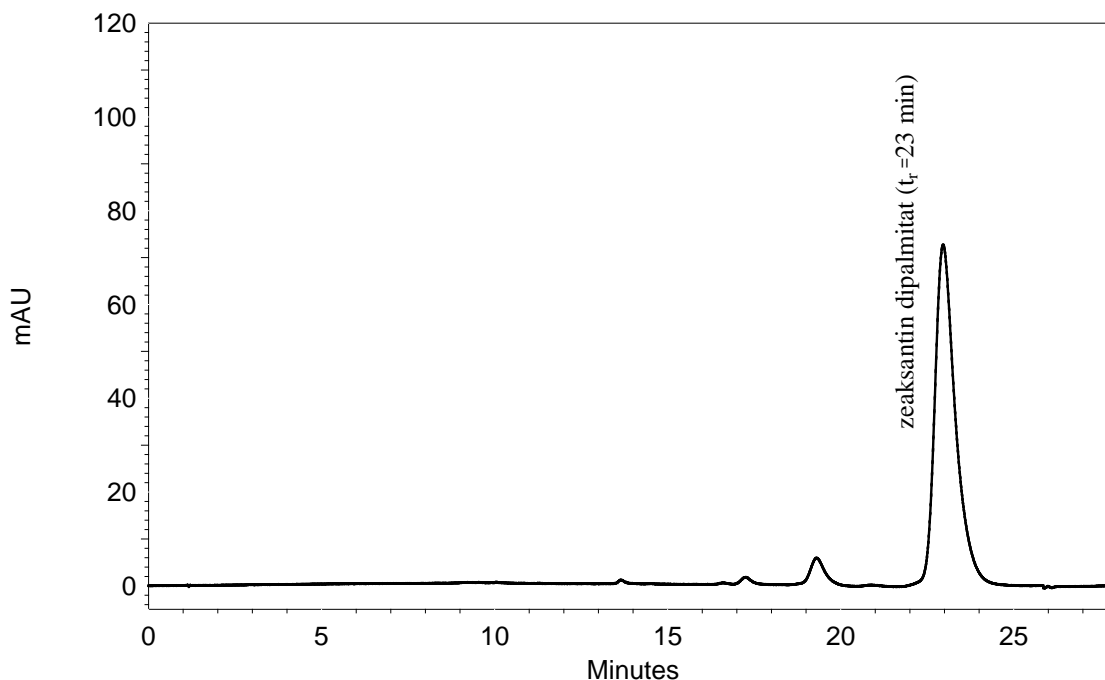
(Schalch in sod., 2009; Ma in Lin, 2010). Za potrditev njegove funkcionalne vrednosti pa bi morali narediti še vrsto kliničnih študij.

## 4.2 ANALIZE ZA KARAKTERIZACIJO POVEČANIH ČAŠ IN JAGOD NAVADNEGA VOLČJEGA JABOLKA

### 4.2.1 Določitev zeaksantin dipalmitata in $\beta$ -kriptoksantina palmitata

Do sedaj so bile objavljene različne vsebnosti karotenoidov v povečanih čašah in jagodah navadnega volčjega jabolka (glej podpoglavje 2.2.2). Želeli smo ugotoviti, če imajo naši vzorci ustrezno sestavo in vsebnost ksantofilov zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, da bi navadno volčje jabolko lahko uporabili kot dodatek h krmi kokoši.

Za določanje karotenoidov v navadnem volčjem jabolku, ker se karotenoidi večinoma nahajajo zaestreni z maščobnimi kislinami (Pintea in sod., 2005; Deineka in sod., 2008; Weller in Breithaupt, 2003), smo morali najprej razviti metodo za določanje estrov na koloni C<sub>30</sub> (250 mm × 4,6 mm, 5  $\mu$ m). To smo storili z modifikacijo metode za ločevanje karotenoidov v rumenjaku, ki nam prvotno omogoča ločevanje le prostih ksantofilov in iz nje naredili gradientno metodo za ločevanje prostih in zaestrenih ksantofilov. Za mobilni fazi smo uporabili mešanici topil (A) aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v) in (B) aceton:TEAA pH 7 (99:1, v/v), gradient pa je bil 6,8 min 100 % A, 1,2 min 0–100 % B, 16 min 100 % B, 4 min 100 % A. Pri tej metodi se do 6,8 minute eluirajo prosti ksantofili, v istem zaporedju kot pri metodi za ločevanje karotenoidov v jajčnem rumenjaku, kasneje pa zestreni. Zeaksantin dipalmitat se zaradi svoje nepolarnosti zelo dolgo zadržuje na koloni in se eluira šele v 23 minutah. Pri pretoku mobilne faze 2,5 mL/min in temperaturi kolone 27 °C je bil čas analize 27 min. Na sliki 30 je prikazan kromatogram pri injiciranju 50  $\mu$ g/mL standarda zeaksantin dipalmitata.



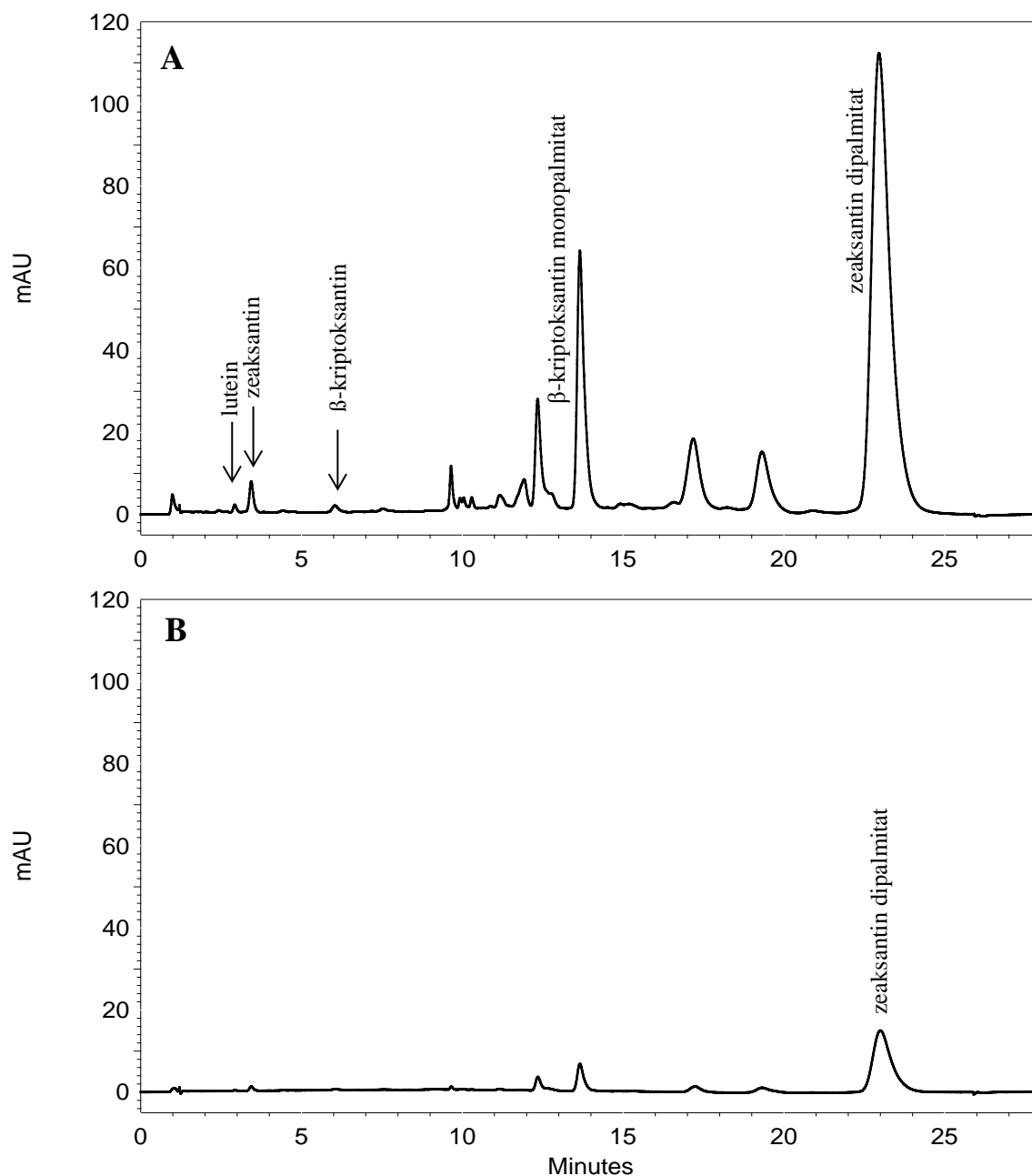
Slika 30: HPLC kromatogram zeaxantin dipalmitata na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilni fazi (A) aceton ter (B) aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); gradient: 6,8 min 100 % A, 1,2 min 0–100 % B, 16 min 100 % B, 4 min 100 % A; T = 27 °C; pretok 2,5 mL/min

Figure 30: Chromatogram of zeaxanthin dipalmitate on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phases (A) acetone, (B) acetone:methanol:0.5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v); gradient: 6.8 min 100% A, 1.2 min 0–100% B, 16 min 100% B, 4 min 100% A; T = 27 °C; flow rate 2.5 mL/min

Testnim raztopinam jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka smo najprej spektrofotometrično izmerili vsebnost celokupnih karotenoidov (glej podpoglavje 3.2.2.1.2). Ta je znašala 8,7 mg/g suhih povečanih čaš in 1,1 mg/g suhih jagod, kar je približen rezultat zaradi nespecifičnosti spektrofotometrične metode.

Testno raztopino smo nadalje uporabili tudi za HPLC ločbo. Zaradi pomanjkanja standardov estrov karotenoidov smo v vzorcu določili le zeaxantin dipalmitat. Glede na objavljene podatke (Pintea in sod., 2005; Deineka in sod., 2008; Weller in Breithaupt, 2003) in spekter, pa smo sklepali, kateri vrh naj bi pripadal  $\beta$ -kriptoksantin palmitatu. Reprezentativna kromatograma jagod in povečanih čaš sta prikazana na sliki 31, s katere je razvidno, da so karotenoidi v povečanih čašah in jagodah zaestreni, glavna predstavnika estrov pa sta zeaxantin dipalmitat in  $\beta$ -kriptoksantin palmitat. Poleg tega sestava karotenoidov v jagodah sledi tisti v povečanih čašah, le da je v jagodah vsebnost karotenoidov približno 10-krat manjša. Vsebnost zaestrenih in prostih karotenoidov je podana v preglednici 30.





Slika 31: HPLC kromatogram testne raztopine povečanih čaš (A) in jagod (B) navadnega volčjega jabolka na koloni ProntoSIL C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilni fazi (A) aceton ter (B) aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v); gradient: 6,8 min 100 % A, 1,2 min 0-100 % B, 16 min 100 % B, 4 min 100 % A; T = 27 °C; pretok 2,5 mL/min

Figure 31: Chromatogram of test solution form husks (A) and berries (B) of Chinese lantern on ProntoSIL C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phases (A) acetone, (B) acetone:methanol:0.5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v); gradient: 6.8 min 100 % A, 1.2 min 0-100 % B, 16 min 100 % B, 4 min 100 % A; T = 27 °C; flow rate 2,5 mL/min

Dobljeni rezultati so za polovico nižji kot tisti, ki jih je objavila Pinteá s sodelavci (2005) in sicer naj bi bilo v g suhih povečanih čašah prisotnega 9,02 mg zeaksantina v dipalmitatu in 3,92 mg  $\beta$ -kriptoksantina v palmitatu. Poleg omenjenih estrov so v manjši količini prisotni tudi drugi estri zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, ki sta v večini zaestrena s palmitinsko in/ali miristinsko maščobno kislino (Pinteá in sod., 2005; Weller in Breithaupt, 2003). V prosti obliki naj bi bilo v navadnem volčjem jabolku le okoli 1,2 % od celokupnih karotenoidov (Pinteá in sod., 2005).

Preglednica 30: Vsebnost ksantofilov v posušenem navadnem volčjem jabolku

Table 30: Content of xanthophylls in dry Chinese lantern

<b>spojina</b>	<b>povečane čaše</b>	<b>jagode</b>
<sup>a</sup> zeaksantin dipalmitat (mg/g)	10,35 ± 0,22	1,44 ± 0,015
<sup>b</sup> $\beta$ -kriptoksantin palmitat (mg/g)	1,78 ± 0,01	0,18 ± 0,02
zeaksantin ( $\mu$ g/g)	84,19 ± 0,60	12,00 ± 0,89
$\beta$ -kriptoksantin ( $\mu$ g/g)	27,69 ± 0,53	3,36 ± 0,31
lutein ( $\mu$ g/g)	17,07 ± 0,34	1,41 ± 0,06

<sup>a</sup>v zeaksantin dipalmitatu je 54,4 % zeaksantina

<sup>b</sup>v  $\beta$ -kriptoksantin palmitatu je 69,9 %  $\beta$ -kriptoksantina

#### 4.2.2 Kvantitativna TLC določitev sladkorjev

Rezultati analize vsebnosti enostavnih sladkorjev (glukoze, fruktoze in saharoze) v suhih liofiliziranih jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka s pomočjo TLC metode so podani v preglednici 31. Pri preračunu vsebnosti sladkorjev v svežih jagodah in povečanih čašah smo upoštevali, da so jagode vsebovale 76,6 % in povečane čaše 39,8 % vode. V skladu s pričakovanji, povečane čaše vsebujejo predvsem saharozo, jagode pa vsebujejo veliko glukoze in fruktoze, ki pa sta značilna sladkorja sadežev. Poleg določenih monosaharidov (glukoze in fruktoze) ter disaharida (saharoze), pa navadno volčje jabolko vsebuje tudi vrsto polisaharidov z visokim antioksidativnim potencialom (Cheng in sod., 2008; Ge in sod., 2009; Kuang in sod., 2011; Tong in sod., 2011b), ki delujejo protivnetno (Tong in sod., 2011a), povečujejo imunski odziv (Yang in sod., 2014) ter imajo anti-diabetični učinek (Tong in sod., 2008). Tong in sodelavci (2008) so določili strukturo enemu od polisaharidov v jagodah navadnega volčjega jabolka. Poročajo, da je ta kislinski heteropolisaharid sestavljen iz arabinoze, galaktoze, glukoze in galakturonske kisline v razmerju 2,6:3,6:2:1, pri čemer je ogrodje sestavljeno iz arabinoze in galaktoze, vsa glukoza in večina galakturonske kisline pa se nahaja na stranskih verigah. Kuang in sodelavci (2011) pa so določili vsebnost osmih sladkorjev v polisaharidih povečanih čaš in sicer so polisaharidi povečanih čaš zgrajeni v večji meri iz galakturonske kisline, galaktoze in arabinoze, malo pa je ksiloze, glukoze, manoze, ramnoze in glukuronske kisline.

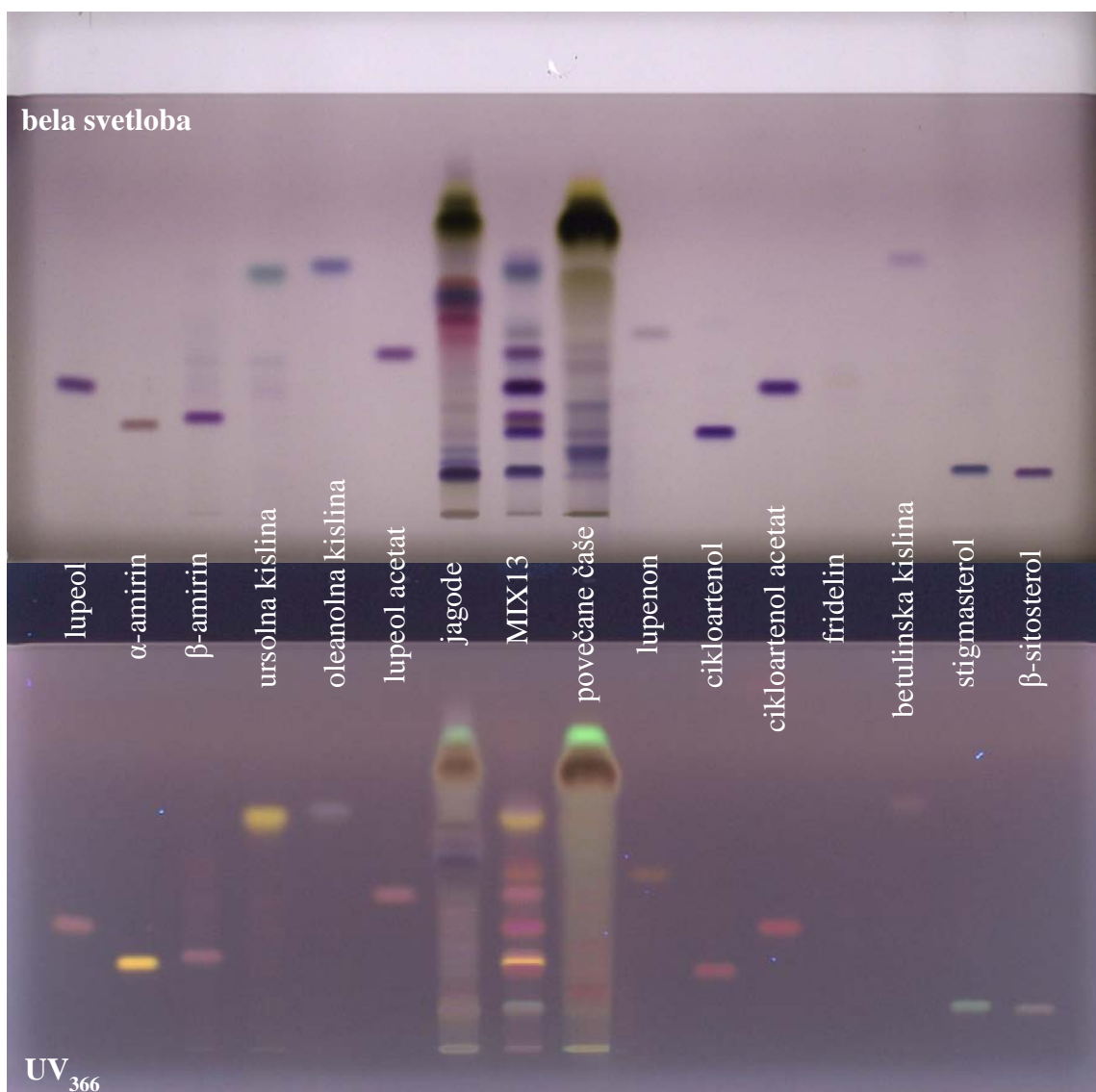
Preglednica 31: Vsebnost saharoze, glukoze in fruktoze v suhih delih navadnega volčjega jabolka

Table 31: The content of sacharose, glucose, fructose in dry parts of Chinese lantern

<b>vzorec</b>	<b>saharoza (g/100 g vzorca)</b>	<b>glukoza (g/100 g vzorca)</b>	<b>fruktoza (g/100 g vorca)</b>
povečane čaše	4,68 $\pm$ 0,19	0,61 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02
jagode	2,65 $\pm$ 0,19	14,83 $\pm$ 0,68	13,11 $\pm$ 0,45

#### 4.2.3 TLC presejalna metoda za detekcijo triterpenoidov na površini povečanih čaš in jagod

Malo je znanega o prisotnih triterpenoidih v navadnem volčjem jabolku (*Physalis alkekengi* L.), saj so do sedaj določili le vsebnost triterpenolov v semenih in sicer lanost-8-en-3- $\beta$ -ol, 24-metilenlanost-8-en-3- $\beta$ -ol, cikloartanol, cikloartenol 24-metilencikloartenol ter lanosterol v sledovih (Itoh in sod., 1977). TLC presejalne analize 11 triterpenoidov iz skupine triterpenolov (lupeol,  $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin in cikloartenol), ketonov (fridelin in lupenon), acetatov (cikloartenol acetat in lupeol acetat) in kislin (ursolna, oleanolna in betulinska kislina) ter 2 fitosterolov ( $\beta$ -sitosterol in stigmasterol), ki skupaj sestavljajo MIX 13, so bile narejene na ekstraktih površinskih voskov svežih povečanih čaš in jagod navadnega volčjega jabolka. Presejalne analize (slika 32) so pokazale verjetnost prisotnosti cikloartenola, cikloartenol acetata,  $\beta$ -sitosterola in stigmasterola v jagodah ter  $\beta$ -sitosterola, cikloartenola ter lupeol acetata v povečanih čašah. Tako kot v semenih se tudi v povečanih čašah in jagodah nahaja cikloartenol (Itoh in sod., 1977). Od preiskovanih fitosterolov sta v jagodah prisotna oba, v povečanih čašah pa le  $\beta$ -sitosterol. Iz skupine acetatov smo detektirali v jagodah cikloartenol acetat, v povečanih čašah lupeol acetat, medtem ko nismo detektirali nobenega preiskovanega triterpenoida iz skupine kislin in ketonov. Za potrditev prisotnosti navedenih spojin bi bila potrebna identifikacija spojin z masno spektrometrijo po eluciji kromatografskih con s HPTLC sorbenta (Naumoska in Vovk, 2015) oziroma HPLC in GC (Gas Chromatography, plinska kromatografija) analiza vzorcev.



Slika 32: Kromatogram presejalne analize 13 triterpenoidov testnih raztopin jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka pri osvetlitvi z belo svetlobo in UV<sub>366</sub>

Figure 32: The chromatogram analysis screening 13 triterpenoids in the extracts of berries and husks of Chinese lantern in white light and UV<sub>366</sub> illumination

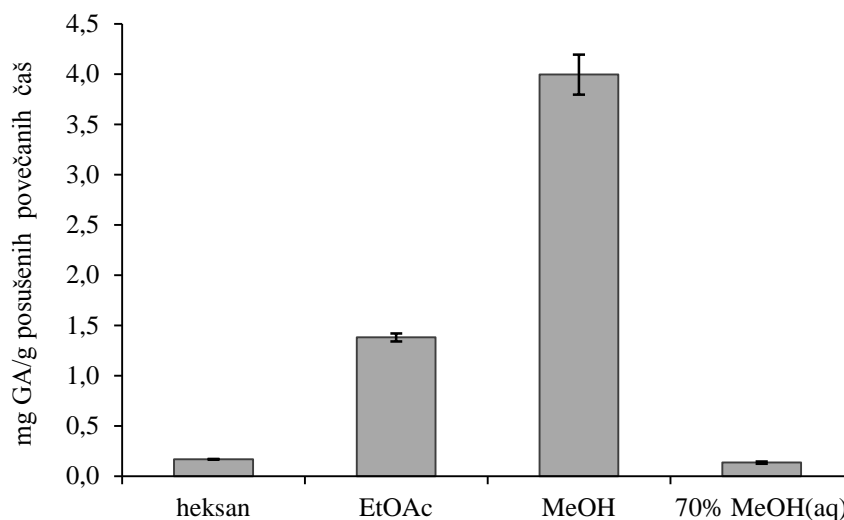
#### 4.2.4 Metode za določanje antioksidativne aktivnosti

Do sedaj je bilo objavljenih malo raziskav o antioksidativnem potencialu navadnega volčjega jabolka (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*). Obstajajo le literaturni podatki o antioksidativnem potencialu jagod (Barreto in sod., 2009; Diaz in sod., 2012), medtem ko ni znanih podatkov o antioksidativnem potencialu povečanih čaš. Za oceno antioksidativnega potenciala smo uporabili dve spektrofotometrični metodi: učinkovitost lovljenja prostih radikalov z DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testom ter antioksidativno moč redukcije železa s FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) testom. Učinkovitost

lovljenja prostih radikalov posameznih spojin oziroma skupin spojin smo spremljali tudi po derivatizaciji razvitih HPTLC plošč z DPPH reagentom. Ker obstaja močna korelacija ( $> 0,9$ ) med vsebnostjo fenolnih spojin in DPPH/FRAP testom (Gil in sod., 2002), smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin (SFS) z uporabo metode Folin-Ciocalteu.

Testne raztopine čaj navadnega volčjega jabolka smo pripravili s sukcesivno ekstrakcijo v sledečem zaporedju: *n*-heksan, etilacetat, metanol in 70 % metanol<sub>(aq)</sub>, pri čemer so izpleni ekstrakcij znašali  $43,3 \pm 2,2 \%$  za *n*-heksansko,  $2,4 \pm 0,6 \%$  za etilacetatno,  $17,2 \pm 0,5 \%$  za metanolno in  $12,3 \pm 0,8 \%$  za 70 % metanolno<sub>(aq)</sub> ekstrakcijo.

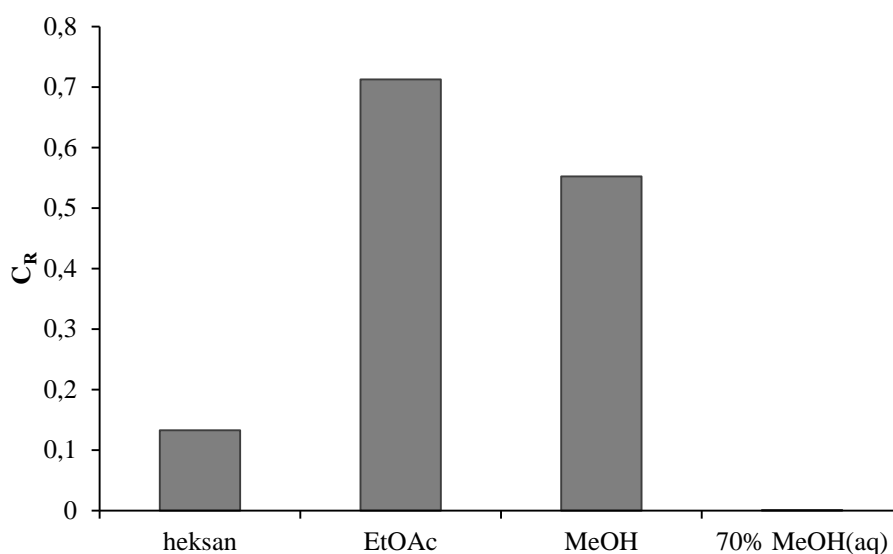
Vsebnost SFS v testnih raztopinah suhih povečanih čaj navadnega volčjega jabolka, izražena z maso galne kisline (GA), je grafično prikazana na sliki 33. Največja vsebnost SFS je bila pričakovano v testni raztopini pridobljeni z metanolno ekstrakcijo, saj smo tam pričakovali večino fenolnih spojin, kar precejšnji delež pa jih je tudi v etilacetatu. Skupaj (seštevek vseh štirih ekstraktov) je bilo v suhih povečanih čajah prisotnih  $5,68 \pm 0,36$  mg SFS na g posušenih povečanih čaj. V jagodah pa naj bilo po literaturnih podatkih prisotnih 51,80 – 53,09 mg SFS/g suhih jagod pridobljenih z etanolno ali vodno ekstrakcijo (Diaz in sod., 2012), medtem ko druga študija navaja bistveno manjšo vrednost 0,4 mg SFS/g svežih jagod pri ekstrakciji z 80 % metanolom<sub>(aq)</sub> (Barreto in sod., 2009).



Slika 33: Vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena z mg galne kisline (GA) na 1 g suhih povečanih čaj navadnega volčjega jabolka (n = 3)

Figure 33: Total phenolic content expressed as mg of gallic acid (GA) per 1g dry husks of Chinese lantern (n = 3)

Sposobnost antioksidanta, da reducira kovine ali radikale, smo določili s FRAP testom. Sposobnost redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  ionov smo izrazili kot naklon premice ( $C_R$ ), rezultati pa so prikazani na sliki 34. V primerjavi z vsebnostjo SFS vidimo, da moč redukcije ne sledi vsebnosti fenolnih spojin. Najboljšo redukcijsko moč ima testna raztopina pridobljena z etilacetatno ekstrakcijo, v katerem so spojine sposobne redukcije 0,71 mL/mg železovih ionov v 25 minutah. Ker v objavljeni študiji na jagodah navadnega volčjega jabolka redukcijska moč ni izražena z naklonom premice (Diaz in sod., 2012), ampak v miligramih klorogenske kisline na gram suhega vzorca, rezultatov ne moremo primerjati.



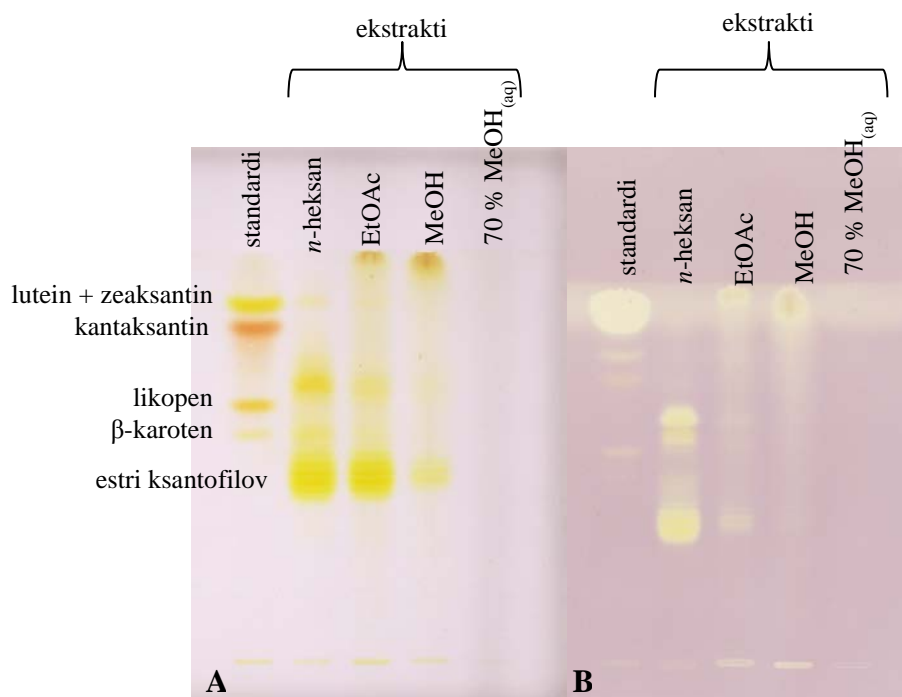
Slika 34: Moč redukcije, izražena kot naklon premice ( $C_R$ ), ki predstavljajo odvisnost  $A_{740}$  nm od koncentracije testne raztopine v reakcijski zmesi

Figure 34: Reducing capacity expressed as the slope of the lines ( $C_R$ ) representing the dependence of  $A_{740}$  nm on the concentration of test solution in the reaction mixture

Učinkovitost lovljenja prostih radikalov smo preverili z DPPH testom, s katerim smo želeli izmeriti efektivno koncentracijo  $\text{EC}_{50}$ , definirano kot koncentracijo substrata, ki povzroči zmanjšanje aktivnosti radikalov DPPH $\cdot$  za 50 %. Pri določanju le-te pa nismo bili uspešni, saj nismo dosegli 50 % redukcije DPPH reagenta. Učinkovitost lovljenja prostih radikalov smo testirali tudi na HPTLC ploščah, kjer smo za razvijanje uporabili metode za določanje karotenoidov, flavonoidov in triterpenoidov, po razvijanju pa smo za post-kromatografsko derivatiziracijo uporabili DPPH reagent. Poleg spremljanja učinkovitosti lovljenja prostih radikalov pa metoda z nanosom standardov omogoča tudi identifikacijo posameznih spojin in njihovo antioksidativno učinkovitost. HPTLC kromatogrami karotenoidov,

triterpenoidov in flavonoidov brez in z DPPH derivatizacijo so predstavljeni na slikah 35-37.

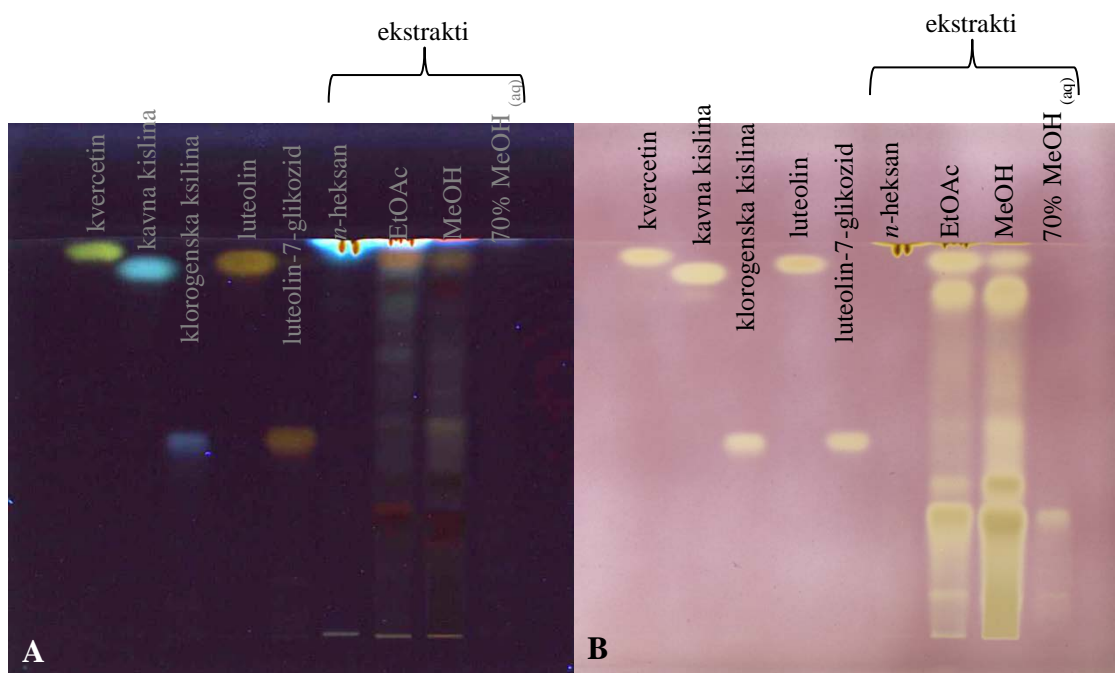
Slika 35 predstavlja HPTLC kromatogram karotenoidov in testnih raztopin. Z nje je razvidno, da so karotenoidi v večini prisotni v testni raztopini pridobljeni z *n*-heksansko in etilacetatno ekstrakcijo. V povečanih čašah navadnega volčjega jabolka nismo dokazali prisotnosti prostih karotenoidov kot so lutein, zeaksantin, kantaksantin, likopen in  $\beta$ -karoten, saj se tu nahajajo predvsem estri zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina (Pintea in sod., 2005; Weller in Breihaupt, 2003), ki se verjetno nahajajo v spodnjem delu TLC kromatograma. Vsebnost prisotnih estrov smo določili s HPLC metodo, katere rezultat je predstavljen v poglavju 4.2.2. Kljub temu, da ksantofili podobno kot karoteni nimajo aktivnosti lovljenja DPPH radikala pri spektrofotometričnem testu (Müller in sod., 2011), pa smo na TLC plošči dokazali njihovo aktivnost. Beta-karoten je bil najslabši izmed standardov karotenoidov, saj je imel najmanjšo sposobnost razbarvati DPPH reagent. Ksantofili naj bi bili celo boljši reducenti  $\text{Fe}^{3+}$  ionov v primerjavi s karoteni (Müller in sod., 2011).



Slika 35: HPTLC kromatogram (plošča: HPTLC RP  $\text{C}_{18}$  silikagel 60; topilo za razvijanje: aceton:metanol:*n*-heksan, 1:1:1, v/v/v) standardov karotenoidov (4  $\mu\text{L}$ ) in testnih raztopin suhih povečanih čaj navadnega volčjega jabolka (4  $\mu\text{L}$ ) pred (A) in po (B) derivatizaciji z DPPH

Figure 35: HPTLC chromatograms (plate: HPTLC RP  $\text{C}_{18}$  silica 60; developing solvent:acetone:methanol:*n*-hexane, 85:10:15, v/v/v) of carotenoid standards (4  $\mu\text{L}$ ) and test solutions of Chinese lantern dry husks (4  $\mu\text{L}$ ) before (A) and after (B) derivatization with DPPH

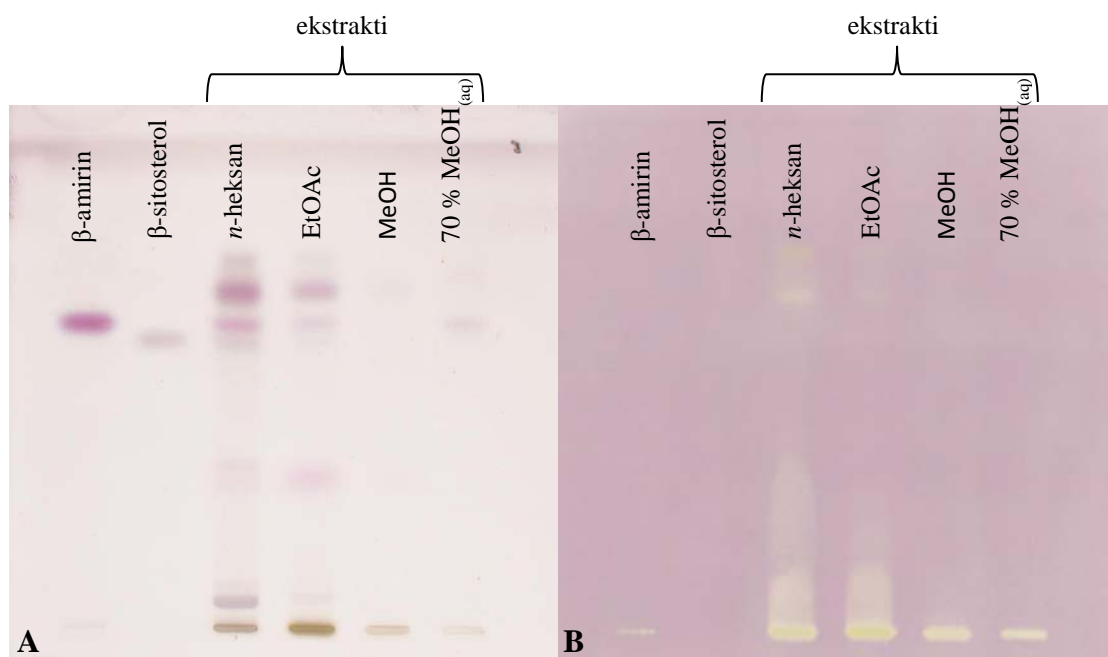
S presejalno TLC analizo flavonoidov in njihovih glikozidov smo uspeli identificirati luteolin v etilacetatnem ekstraktu. Poleg luteolina so Qui in sodelavci (2008) v povečanih čašah identificirali ombuin, luteolin-7-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, luteolin-4'-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, kvercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, kvercetin-3,7-di-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid, luteolin-7,3'-di-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid in luteolin-7,4'-di-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozid. Glede na intenzivnost razbarvanja DPPH reagenta (slika 36) lahko vidimo, da imajo flavonoidi in njihovi glikozidi največjo učinkovitost lovljenja prostih radikalov. Kot pričakovano jih je bilo največ prisotnih v testni raztopini, pridobljeni z metanolno ekstrakcijo, kar precejšnji delež pa tudi v etilacetatnem ekstraktu. Flavonoidi v ekstraktu metanola so pokazali največjo učinkovitost reakcije z radikalom DPPH $\cdot$ , vendar pa je bila redukcijska moč največjo v etilacetatnem ekstraktu, kjer imamo poleg flavonoidov prisotne tudi karotenoide. Triterpenoidi (slika 37), ki so bili prisotni predvsem v testni raztopini *n*-heksanskega ekstrakta, pa niso reagirali z DPPH reagentom. Presejalna TLC analiza je bolj podrobno predstavljena v poglavju 4.2.1.



Slika 36: HPTLC kromatograma (plošča: HPTLC silikagel 60; topilo za razvijanje: etilacetat:mravljična kislina:voda, 85:10:15, v/v/v) standardov flavonoidov (0,1  $\mu$ g) in testnih raztopin (4  $\mu$ L) pri UV<sub>366</sub> detekciji (A) in po derivatizaciji z DPPH (B)

Figure 36: HPTLC chromatograms (plate: HPTLC silica 60; developing solvent: ethylacetate:formic acid:water, 85:10:15, v/v/v) of flavonoid standards (0.1  $\mu$ g) and test solutions (4  $\mu$ L) in UV<sub>366</sub> detection (A) and after derivatization with DPPH (B)





Slika 37: TLC kromatogram (plošča: HPTLC silikagel 60; topilo za razvijanje: *n*-heksan: etilacetat, 5:1, v/v) standarda  $\beta$ -amirina (0,6  $\mu$ g),  $\beta$ -sitosterola (0,5  $\mu$ g) in testnih raztopin pred (A) in po (B) derivatizaciji z DPPH

Figure 37: TLC chromatograms (plate: HPTLC silica 60; developing solvent: *n*-hexane:ethylacetate, 5:1, v/v) of  $\beta$ -amirin (0.6  $\mu$ g) and  $\beta$ -sitosterol standards (0.5  $\mu$ g) and extracts (4  $\mu$ L) before (A) and after (B) derivatization with DPPH

## 5 SKLEPI

Razvili smo enostavno izokratsko HPLC metodo za rutinsko in kvantitativno analizo osmih ksantofilov (luteina, zeaksantina, kapsantina,  $\beta$ -kriptoksantina, citranaksantina, kantaksantina, 8'-apo- $\beta$ -karotenala, etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oata), ki so dovoljeni kot dodatek h kokošji krmi za povečanje obarvanosti rumenjaka pa tudi za povečanje njegove tehnološke kakovosti. Za ločbo smo uporabili kolono RP-C<sub>30</sub> (250 × 4,6 mm, 5  $\mu$ m) Pri optimizaciji HPLC metode smo prišli do naslednjih sklepov:

- Temperatura kolone je ključna za ločbo preučevanih karotenoidov. S preučevanjem temperature od 19–31 °C smo prišli do ugotovitev, da je vpliv temperature na našo ločbo velik. Optimalna temperatura kolone za dobro ločbo je med 25 °C in 27 °C.
- Že minimalni dodatek TEAA pufru pH 7 pufru (5 mM) je povečal ploščino vrha  $\beta$ -kriptoksantina za 54 %, zeaksantina za 50 % in luteina za 27 % v primerjavi z mobilno fazo, ki je vsebovala vodo. Povečanje koncentracije s 5 mM na 25 mM je povzročilo predvsem krajše retencijske čase brez vpliva na resolucijo in obliko vrhov. Verjetno tudi poveča obstojnost ksantofilov med kromatografijo.

Optimalna separacija *all-E*-izomer osmih ksantofilov je bila na tej koloni dosežena v manj kot 16 min pri temperaturi kolone 27 °C z uporabo mobilne faze aceton:metanol:0,5 M TEAA pH 7 (14:5:1, v/v/v), pri pretoku 1 mL/min in detekciji pri 450 nm. Vseh osmih ksantofilov nikoli ne pričakujemo v vzorcu. Morebitnih interferenc preiskovanih spojin z Z izomerami nismo preučevali.

Metodo smo validirali na petih analitih (lutein, zeaksantin, kantaksantin, 8'-apo- $\beta$ -karotenal,  $\beta$ -kriptoksantin). Povprečni izkoristek metode za vseh pet spojin je znašal 95 %. Ponovljivost metode znotraj dneva, izražena z RSD, je bila manjša od 5 % za vse preiskovane ksantofile. Območje umeritvene krivulje za kvantitativno določanje je bilo v območju med približno 0,04 in 2  $\mu$ g/mL (kar odgovarja 0,08–4 mg/100 g rumenjaka). Določena meja zaznavnosti (LOD) in meja določanja (LOQ) za vsako spojino je bila 0,01 in 0,03  $\mu$ g/mL (kar odgovarja 0,02 in 0,06 mg/100 g rumenjaka).

Pri študiji ekstrakcije karotenoidov iz jajca smo izmed preučevanih ekstrakcijskih topil (aceton; etanol; etanol:aceton, 1:1, v/v) dobili največji izplen karotenoidov z uporabo acetona. Najboljše topilo smo izbrali s pomočjo merjenja absorbance pri 450 nm. Pri izvajanju enojne ekstrakcije namesto trojne smo dobili učinkovitost, ki znaša 92 %. Pri izračunu smo namesto trojne ekstrakcije upoštevali faktor učinkovitost enojne ekstrakcije. Z razvojem in validacijo HPLC metode smo potrdili prvo hipotezo, da je za kvantitativno analizo ksantofilov v jajčnem rumenjaku mogoče razviti enostavnejšo metodo, kot so objavljene.

Sestavo in vsebnost ksantofilov smo določili v vzorcih 64 jajc kokoši različnih rejcev in blagovnih znamk kupljenih na slovenskem trgu. Ugotovili smo, da se vsebnost ksantofilov

močno razlikuje in to ne glede na način reje. V vzorcih smo določili 4 glavne karotenoide in sicer *all-E*-lutein, *all-E*-zeaksantin, *all-E*-kantaksantin in *all-E*-etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat. V sledovih pa je prisoten tudi *all-E*- $\beta$ -kriptoksantin. Jajca kokoši iz ekološke reje pa vsebujejo predvsem *all-E*-lutein, *all-E*-zeaksantin. En vzorec iz ekološke reje je vseboval med drugim tudi *all-E*-etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat in *all-E*-kantaksantin. V nobenem vzorcu pa nismo zasledili prisotnega *all-E*-kapsantina. Rezultati statistične analize vsebnosti ksantofilov v jajcih s slovenskega trga so bili naslednji:

- Na osnovi ANOVA testa smo ugotovili, da sta ksantofila kantaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin ter barva rumenjaka pomembni parametri, ki vplivajo na razlikovanje jajc iz različnih načinov rej. Še posebno lahko izpostavimo  $\beta$ -kriptoksantin, ki ločuje jajca iz ekološke reje od ostalih načinov rej. Noben drugi parameter pa ni ločil jajc iz baterijske, hlevske in proste reje v tri ločene skupine.
- Metoda glavnih osi je pokazala, da se le vzorci jajc iz ekološke reje oddvojujejo od jajc iz ostalih načinov rej. Razlog razlikovanja je predvsem večja vsebnost zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina. Več vzorcev med drugim tudi presega mejne vrednosti Hotteling T2 95 % verjetnostne elipse, zato bi te vzorce lahko izločili kot ubežnike.
- Iz povezav na toplotnem grafu lahko sklepamo, da na barvo jajčnega rumenjaka (določeno po Rochejevi barvni lestvici) vpliva v veliki meri vsebnost kantaksantina. Na vsebnosti karotenoidov, določeno s pomočjo spektrofotometrične metode, pa predvsem zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin, malo manj pa lutein in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat.

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali imajo jagode in povečane čaše navadnega volčjega jabolka (*Physalis alkekengi* L.) ustrežno sestavo in vsebnost ksantofilov zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, da bi jih lahko uporabili kot dodatek h krmi kokoši nesnic. Obenem pa smo želeli identificirati ostale spojine, kot so triterpenoidi, flavonoidi, steroli in enostavni sladkorji, kar nas je pripeljalo do naslednjih ugotovitev:

- Jagode in povečane čaše navadnega volčjega jabolka so bogat vir zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, ki sta predvsem zastopana kot zeaksantin dipalmitat in  $\beta$ -kriptoksantin palmitat. V gramu suhih povečanih čašah smo določili 10,4 mg zeaksantin dipalmitata in 1,78 mg  $\beta$ -kriptoksantin palmitata, v jagodah pa ju je za 7-10 krat manj (1,4 mg zeaksantin dipalmitata/g in 0,18 mg  $\beta$ -kriptoksantin palmitata /g).
- Presejalne analize 11-ih triterpenoidov (lupeola,  $\alpha$ - in  $\beta$ -amirina, lupenona, lupeol acetata, cikloartenola, cikloartenol acetata, fridelina, betulinske, oleanolne in ursolne kisline) in dveh fitosterolov ( $\beta$ -sitosterola in stigmasterola) so pokazale prisotnost cikloartenola, cikloartenol acetata,  $\beta$ -sitosterola, stigmasterola v jagodah ter  $\beta$ -sitosterola, cikloartenola in lupeol acetata v povečanih čašah.
- Izmed flavonoidov smo v povečanih čašah identificirali luteolin.

- Jagode navadnega volčjega jabolka vsebujejo veliko sladkorjev, predvsem glukozo (3,47 g/100 g) in fruktozo (3,07 g/100 g) ter nekaj saharoze (0,62 g/100 g). V povečanih čašah pa je prisotna predvsem saharoza (2,82 g/100 g), manj pa glukozе (0,37 g/100 g) in fruktoze (0,76 g/100 g).
- Flavonoidi v metanolnem ekstraktu so pokazali največjo moč lovljenja prostih radikalov, medtem ko je bila moč redukcije boljša v etilacetatnem ekstraktu, kjer so bili poleg flavonoidov prisotni tudi karotenoidi.
- Potrebno bi bilo narediti še dodatne raziskave o prisotnosti ostalih spojin, kot so alkaloidi in fizalini, ki bi lahko imeli negativen vpliv na zdravje ljudi.
- Z zgornjimi ugotovitvami smo delno potrdili hipotezo, da imajo izbrani deli rastline navadno volčje jabolko ustrezno sestavo in vsebnost ksantofilov zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina, da bi lahko iz njih izdelali prehransko dopolnilo.

Eden izmed ciljev doktorske naloge je bilo povečanje vsebnosti zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina v jajcih z dodatkom mešanice suhih jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka v krmo za kokoši nesnice. To nas je pripeljalo do naslednjih sklepov:

- Z dodatkom 40 g mešanice suhih povečanih čaš in jagod na kg popolne krmne mešanice za kokoši nesnic (NSK) smo naredili krmno mešanico, ki je v enem kg vsebovala 106,6 mg zeaksantina in 17,5 mg  $\beta$ -kriptoksantina, medtem ko je bil v krmi kontrolne skupine prisoten predvsem zeaksantin (1,1 mg/kg) in v majhni količini  $\beta$ -kriptoksantin (0,15 mg/kg).
- Povečane vsebnosti zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina se v jajcu stabilizirajo deseti dan po začetku krmljenja nesnic.
- Po stabilizaciji je obogateno jajce vsebovalo 0,43 mg zeaksantina (2,6 mg/100 g rumenjaka), 0,18 mg luteina (1,1 mg/100 g rumenjaka) in 0,12 mg  $\beta$ -kriptoksantina (0,7 mg/100 g rumenjaka). Vsebnost celokupnih karotenoidov je znašala 4,38 mg/100 g rumenjaka, povprečna intenzivnost barve rumenjaka, določena po Rochejevi barvi lestvici, pa je bila 13,2. Glede na komercialna jajca so z zeaksantinom in  $\beta$ -kriptoksantinom obogatena jajca vsebovala v povprečju 3-krat več zeaksantina in 10-krat več  $\beta$ -kriptoksantina.
- Ob predpostavki, da je priporočen vnos zeaksantina 2 mg/dan, bi z enim jajcem zaužili kar 21,5 % priporočenega vnosa, z dvema pa 43 %.
- S temi ugotovitvami smo potrdili zadnjo hipotezo, da se vsebnost zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina lahko poveča z dodatkom delov rastline navadno volčje jabolko v prehrano kokoši nesnic.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Jajce je živilo z odlično prehransko vrednostjo, saj vsebuje veliko kakovostnih beljakovin, vitaminov in mineralov, z visoko biološko dostopnostjo ter relativno majhno vsebnostjo energije in maščob. Poleg omenjenih snovi pa so lahko jajca bogat vir ksantofilov, saj je njihova sestava in vsebnost odvisna od krmljenja kokoši. Dandanes se v prireji jajc uporabljajo krmni dodatki predvsem za obarvanje jajc in za boljše zdravstveno stanje nesnic v baterijski reji. Krmni dodatki vsebujejo veliko luteina hkrati z nekaterimi sintetičnimi ksantofili. Za obarvanje jajčnega rumenjaka je dovoljenih kot dodatek h krmi osem ksantofilov (lutein, zeaksantin, kapsantin,  $\beta$ -kriptoksantin, citranaksantin, kantaksantin, 8'-apo- $\beta$ -karotenal in etil-8'-apo- $\beta$ -karoten-8'-oat). Ker je bila do sedaj objavljena le ena relativno dolgotrajna gradientna ločba teh ksantofilov, smo razvili in validirali izokratsko HPLC metodo, ki omogoča ločbo osmih ksantofilov na koloni C<sub>30</sub> v relativno kratkem času. Pri optimizaciji metode smo preučevali, kako na ločbo vplivata temperatura in dodatek TEAA pufra pH 7 v mobilno fazo. Obenem pa smo razvili tudi enostavno metodo priprave testnih raztopin rumenjaka z acetonom v dušikovi atmosferi.

V okviru raziskave slovenskega tržišča smo z razvito in validirano HPLC metodo določili vsebnost in sestavo ksantofilov 64 različnim vzorcem jajc (31 iz baterijske, 10 iz proste, 9 iz hlevske ter 14 iz ekološke reje), kar je pomembna informacija za oceno prehranske kakovosti jajc, ki jih uživajo slovenski potrošniki. Prišli smo tudi do ugotovitev, da imajo jajca kokoši slovenskih rejcev v povprečju boljše sestavo in večjo vsebnost ksantofilov kot jajca kokoši nemških rejcev ali od uvoženih jajc, ki se pojavljajo na slovenskih trgovskih policah. Da bi ugotovili, če bi bil kateri od preiskovanih karotenoidov lahko uporabljen kot marker za razlikovanje med jajci iz različnih načinov rej, smo naredili analizo variance. Pri tem smo ugotovili, da je vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina marker ekološkega načina reje. Poleg analize variance smo izvedli tudi analizo rezultatov po metodi glavnih osi predvsem z namenom, da bi videli morebitno specifično grupiranje vzorcev. Le jajca iz ekološke reje so se ločila od jajc iz ostalih načinov rej.

Primerjali smo ločbo osmih *all-E*-ksantofilov (MIX8) na različnih HPLC kolonah in sicer treh kolonah C<sub>30</sub> s poroznimi delci (250 × 4,6 mm, 3  $\mu$ m ali 5  $\mu$ m) in petih C<sub>30</sub> ali C<sub>18</sub> kolonah nove generacije imenovanih tudi »core-shell« (150 × 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m ali 4  $\mu$ m). Uporabljena kolona C<sub>30</sub> s 5  $\mu$ m poroznimi delci se je izkazala kot najbolj robustna, čeprav je mogoče hitrejšo ločbo dobiti na nekaterih kolonah C<sub>18</sub> z 2,6  $\mu$ m delno poroznimi delci (Kinetex, Accucore).

Ker je vsebnost luteina v rastlinskih živilih relativno velika, je kljub nižji biološki dostopnosti kot iz jajc preskrba s tem ksantofilom v prehrani mnogo manj problematična kot preskrba z zeaksantinom. Dober vir zeaksantina in tudi  $\beta$ -kriptoksantina je navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.), ki raste v naših vrtovih kot okrasna rastlina. V jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka se ksantofili nahajajo predvsem v

obliki estrov, zato smo razvili novo HPLC metodo, s katero lahko poleg prostih *all-E*-ksantofilov določimo tudi vsebnost zeaksantin dipalmitata in  $\beta$ -kriptoksantin palmitata. Poleg sestave in vsebnosti ksantofilov smo določili tudi vsebnost enostavnih ogljikovih hidratov (glukoza, fruktoza, saharoza) ter identificirali nekaj glavnih spojin, kot so triterpenoidi (cikloratenol, cikloartenol acetat, lupeol acetat), steroli (stigmasterol in  $\beta$ -sitosterol), flavonoidi (luteolin) v jagodah in povečanih čašah navadnega volčjega jabolka. Zaradi velike vsebnosti zeaksantina (571 mg zeaksantina/100 g suhih povečanih čaš in 79 mg/100 g suhih jagod) in  $\beta$ -kriptoksantina (127 mg/100 g suhih povečanih čaš in 13 mg/100 g suhih jagod), bi bilo navadno volčje jabolko primerno za izdelavo prehranskega dopolnila, a bi bilo potrebno narediti še dodatne raziskave o prisotnosti ostalih spojin, kot so alkaloidi in fizalini, ki bi lahko imeli negativen vpliv na zdravje ljudi.

Poleg luteina sta tudi zeaksantin in  $\beta$ -kriptoksantin pomembna za zdravje oči. Ker so hranilne snovi iz jajca, med drugim tudi ksantofili, visoko biološko dostopne, je bil naš cilj z dodatkom mešanice suhih jagod in povečanih čaš navadnega volčjega jabolka v krmo (40 g/kg) doseči nesenje jajc s povečano vsebnostjo zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina. Po desetih dneh krmljenja smo dobili jajca z 0,43 mg zeaksantina (2,6 mg/100 g rumenjaka) in 0,12 mg  $\beta$ -kriptoksantina (0,7 mg/100 g rumenjaka), pri čemer smo uspeli povečati vsebnost zeaksantina za 3-krat in vsebnost  $\beta$ -kriptoksantina za 9-krat v primerjavi z jajci, ki so sedaj dostopna potrošniku v Sloveniji. Ob predpostavki, da je priporočen vnos zeaksantina 2 mg/dan, bi z enim jajcem zaužili kar 21,5 % priporočenega vnosa, z dvema pa 43 %. Kljub večji vsebnosti  $\beta$ -kriptoksantina v jajcu je njegov vnos premajhen, da bi imel večji doprinos k nastanku vitamina A. Zaradi povečane vsebnosti zeaksantina in  $\beta$ -kriptoksantina pa bi lahko imela taka jajca specifično funkcionalno vrednost, njihovo uživanje bi lahko zmanjšalo tveganje za pojav različnih zdravstvenih težav, predvsem z očmi, vendar bi bilo za potrditev funkcionalne vrednosti potrebno narediti še različne klinične študije.

## 6.2 SUMMARY

The egg is a food with excellent nutritional value. It contains a lot of high-quality proteins, vitamins and minerals with high biological availability and is relatively low in fat and energy. In addition, eggs can also be a rich source of xanthophylls, because their composition and content is dependent on the feeding of laying hens. Nowadays, the egg production feed additives are used primarily for egg yolk coloring and providing better health of laying hens. Feed additives provide a high content of lutein together with certain synthetic xanthophylls. Eight xanthophylls (lutein, zeaxanthin, capsanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, citranaxanthin, canthaxanthin, 8'-apo- $\beta$ -carotenal and ethyl-8'-apo- $\beta$ -carotene-8'-oat) are permitted for use as a feed additive for egg yolk coloring. So far, only a relatively long gradient separation of these xanthophylls was reported. Therefore, an isocratic HPLC method, which allows the separation of eight xanthophylls on a C<sub>30</sub> column in a relatively short period of time, was developed and validated. In the method optimization process, the effects of temperature and the addition of TEAA buffer pH 7 in the mobile phase on the compound separation were studied. At the same time, a simple sample preparation method for yolk test solutions was developed, employing acetone for extraction in a nitrogen atmosphere.

By using the developed and validated HPLC method, Slovenian egg market was investigated for xanthophylls. The identity and quantity of xanthophylls in 64 different egg samples (31 from the cage, 10 from the free range, 9 from the barn and 14 from the organic husbandry) were determined, which represents important information in assessing the nutritional quality of eggs, consumed by Slovenian consumers. It was also concluded that the eggs produced by Slovenian farmers have in average better composition and higher content of xanthophylls in comparison to eggs produced by German farmers of laying hens or to imported eggs that appear on Slovenian market. In order to detect if any of the investigated xanthophylls might be used as a marker to differentiate between the studied conditions of egg production, one-way analysis of variance was made. It was found that  $\beta$ -cryptoxanthin is a marker of the eggs obtained from the organic husbandry. To investigate the specific grouping patterns, Principal Component Analysis was also carried out. Only eggs from the organic husbandry were differentiated from the eggs of the other husbandry classes.

The separation of eight *all-E*-xanthophylls using three different C<sub>30</sub> HPLC columns: (250 × 4.6 mm; 3  $\mu$ m or 5  $\mu$ m) and five »core-shell« C<sub>30</sub> or C<sub>18</sub> columns (150 × 4.6 mm; 2.6  $\mu$ m or 4  $\mu$ m) was compared. Applied C<sub>30</sub> column with 5  $\mu$ m particle size has proven to be the most robust, although faster separation can be obtained on some »core-shell« C<sub>18</sub> columns with 2.6  $\mu$ m particle size (Kinetex, Accucore).

Despite lower bioavailability of lutein from edible plants compared to that obtained from eggs, its content is relatively high. Therefore, the supply of this xanthophyll in the diet is much less problematic than zeaxanthin supply. A good natural source of zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin is Chinese lantern (*Physalis alkekengi* L.), grown as an ornamental plant.

Since xanthophylls found in berries and husks of Chinese lantern are mainly in the form of esters, an HPLC method was developed for determining zeaxanthin dipalmitate,  $\beta$ -cryptoxanthin palmitate, as well as free all-E-xanthophylls. In addition, simple carbohydrates (glucose, fructose, sucrose) were also determined and some secondary metabolites, such as triterpenoids (cycloartenol, cycloartenol acetate, lupeol acetate), sterols (stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol), and flavonoids (luteolin) were identified. Due to the high content of zeaxanthin (571 mg / 100 g dry husks and 79 mg / 100 g dry berries) and  $\beta$ -cryptoxanthin (127 mg / 100 g dry husks and 13 mg / 100 g dry berries), Chinese lantern (particularly its husks) would be suitable for manufacturing of nutritional supplements. However, additional toxicity studies of this plant are needed as some compounds such as alkaloids and physalins, could have a negative impact on the human health.

Besides lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin are also important for eye health. Since egg xanthophylls among the other egg compounds are highly bioavailable, the goal was to achieve the production of eggs with increased content of zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin. This was achieved with a supplement of a mixture of dried berries and husks of Chinese lantern in the chicken feed (40 g/kg ). After 10 days of feeding, the analyzed eggs possessed 0.43 mg zeaxanthin (2.6 mg/100 g yolk) and 0.12 mg of  $\beta$ -cryptoxanthin (0.7 mg/100 g yolk). The contents of zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin were increased 3- and 9-fold, respectively, in comparison to the respective contents measured for the commercially available eggs found at the Slovenian market. Assuming that the recommended zeaxanthin intake is 2 mg/day, one enriched eaten egg would correspond to 21.5%, while two of them will provide us with 43% of the recommended daily zeaxanthin intake. Despite the higher levels of  $\beta$ -cryptoxanthin in the yolk, its intake is too low to be able to contribute to the formation of vitamin A. Because of the increased levels of zeaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin, the enriched eggs could have a specific functional value. Their consumption could reduce the risk of development of various health problems, especially in the ophthalmologic area, but in order to confirm the functional value of these eggs, it would be necessary to make a number of clinical studies.



## 7 VIRI

- Albert K. 1998. Correlation between chromatographic and physicochemical properties of stationary phases in HPLC: C30 bonded reversed-phase silica. *Trends in Analytical Chemistry*, 17, 10: 648-658
- Aman R., Biehl J., Carle R., Conrad J., Beifuss U., Schieber A. 2005. Application of HPLC coupled with DAD, APcI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chemistry*, 92, 4: 753-763
- AOAC Official Method 975.23. Carotenoids in eggs. 2011. V: Official methods of analysis of AOAC International. Horwitz W., Latime G.W. (eds.). 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, AOAC International, Chapter 34: 1-1
- Asano N., Kato A., Kizu H., Matsui K. 1996.  $1\beta$ -amino- $2\alpha,3\beta,5\beta$ -trihydroxycycloheptane from *Physalis alkekengi* var *Francheti*. *Phytochemistry*, 42, 3: 719-721
- Asano N., Kato A., Oseki K., Kizu H., Matsui K. 1995. Calystegins of *Physalis-alkekengi* var *francheti* (*Solanaceae*) - structure determination and their glycosidase inhibitory activities. *European Journal of Biochemistry*, 229, 2: 369-376
- Barreto G.P.M., Benassi M.T., Mercadante A.Z. 2009. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 10: 1856-1861
- Basey K., Woolley J.G. 1973. Alkaloids of *Physalis-alkekengi*. *Phytochemistry*, 12, 10: 2557-2559
- Basey K., McGaw B., Woolley J.G. 1992. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry*, 31, 12: 4173-4176
- Baucells M.D., Crespo N., Barroeta A.C., López-Ferrer S., Grashorn M.A. 2000. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poultry Science*, 97, 1: 51 - 59
- Beardsworth P.M., Hernandez J.M. 2004. Yolk colour – an important egg quality attribute. *International Poultry Production*, 12, 5: 17-18
- Bell C.M., Sander L.C., Wise S.A. 1997. Temperature dependence of carotenoids on C<sub>18</sub>, C<sub>30</sub> and C<sub>34</sub> bonded stationary phases. *Journal Chromatography A*, 757, 1: 29-39
- Bennett D.C., Cheng K.M. 2010. Selenium enrichment of table eggs. *Poultry Science*, 89, 10: 2166-2172
- Bhat S.V., Nagasampagi B.A., Sivakumar M. 2005. Chemistry of natural products. Berlin, Springer: 840 str.

- Bijttebier S., D'Hondt E., Noten B., Hermans N., Apers S., Voorspoels S. 2014. Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening. *Journal of Chromatography A*, 1332: 46-56
- Blount J.D., Surai P.F., Nager R.G., Houston D.C., Møller A.P., Trewby M.L., Kennedy M.W. 2002. Carotenoids and egg quality in the lesser black-backed gull *Larus fuscus*: a supplemental feeding study of maternal effects. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 269, 1486: 29-36
- Böhm V. 2001. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C<sub>30</sub> high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 24, 12: 955-959
- Borel P., Grolier P., Armand M., Partier A., Lafont H., Lairon D., Azais-Braesco V. 1996. Carotenoids in biological emulsions: Solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research*, 37, 2: 250-261
- Bovšková H., Míková K., Panovská Z. 2014. Evaluation of egg yolk colour. *Czech Journal of Food Sciences*, 32, 3: 213-217
- Bowen P.E., Espinosa S.M., Hussain E.A., Stacewicz-Sapuntzakis M. 2002. Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *Journal of Nutrition*, 132, 12: 3668-3673
- Breithaupt D.E. 2007. Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 10: 501-506
- Breithaupt D.E., Weller P., Grashorn M.A. 2003. Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Poultry Science*, 82, 3: 395-401
- Britton G. 1995. UV/visible spectroscopy. V: Carotenoids. Vol. 1B. Carotenoids, spectroscopy. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser: 13-61
- Britton G., Khachik F. 2009. Carotenoids in food. V: Carotenoids. Vol. 5. Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser: 45-66
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. 2004. Introduction and guidelines on the use of the handbook. V: Carotenoids. Handbook. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser: 5-33
- Brulc L., Simonovska B., Vovk I., Glavnik V. 2013. Determination of egg yolk xanthophylls by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1318:134-141

- Butnaru C., Vlase L., Lazar D., Agoroaei L., Lazar M.I. 2011. HPLC/MS analysis of solanine in *Physalis alkekengi* and *Solanum dulcamara*. *Farmacia*, 59, 2: 172-178
- Burns-Withmore B.L., Haddad E.H., Sabaté J., Jaceldo-Siegl K., Tanzman J., Rajaram S. 2010. Effect of n-3 fatty acid enriched eggs and organic eggs on serum lutein in free-living lacto-ovo vegetarians. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 11: 1332-1337
- Cacciola F., Donato P., Giuffrida D., Torre G., Dugo P., Mondello L. 2012. Ultra high pressure in the second dimension of a comprehensive two-dimensional liquid chromatographic system for carotenoid separation in red chili peppers. *Journal of Chromatography A*, 1255, SI: 244-251
- Campo J.L., Cabezas R., Torres O., Briones I.G., Alonso C. 2013. Egg quality and welfare of white-, tinted-, and brown-shell egg layers in three different non-cage housing systems. *Archiv für Geflügelkunde*, 77, 3: 179-188
- Canene-Adams K., Erdman Jr J.W. 2009. Absorption, transport, distribution in tissues and bioavailability. V: Carotenoids. Vol. 5. Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser: 115-148
- Chen L.X., Xia G.Y., Liu Q.Y., Xie Y.Y., Qiu F. 2014. Chemical constituents from the calyces of *Physalis alkekengi* var. *franchetii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54: 31-35
- Cheng Y.K., Li L., Meng Z.K., Hou AL., Wu Y.J., Teng L.R. 2008. Component analysis and free radicals scavenging activity of *Physalis alkekengi* L. polysaccharide. *Chemical Research in Chinese Universities*, 24, 2: 167-170
- Chew E.Y., Clemons T.E., SanGiovanni J.P., Danis R., Ferris F.L., Elman M., Antoszyk A., Ruby A., Orth, D., Bressler S., Fish G., Hubbard B., Klein M., Chandra S., Blodi B., Domalpally A., Friberg T., Wong W., Rosenfeld P., Agron E., Toth C., Bernstein P., Sperduto R. 2013. Lutein plus zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration the age-related eye disease study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 309, 19: 2005-2015
- Chowdhury S.D., Hassin B.M., Das S.C., Rashid M.H., Ferdaus A.J.M. 2008. Evaluation of marigold flower and orange skin as sources of xanthophyll pigment for the improvement of egg yolk color. *Journal of Poultry Science*, 45, 4: 265-272
- ChromQuest 5.0 Reference Guide. 2008. Waltham, Thermo Fisher Scientific Inc: 263 str.
- Chung H.Y., Rasmussen H.M., Johnson E.J. 2004. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *Journal of Nutrition*, 134, 8: 1887-1893

- Clevidence B.A., Bieri J.G. 1993. Association of carotenoids with human plasma-lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 214: 33-46
- Commission Directive 100/2008/EC of 28 October 2008 amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. 2008. *Official Journal of the European Union*, 51, L285: 9-12
- Cruickshank E.M. 1934. Studies in fat metabolism in the fowl. I. The composition of the egg fat and depot fat of the fowl as affected by the ingestion of large amounts of different fats. *Biochemical Journal*, 28: 965-977
- Dachtler M., Glaser T., Kohler K., Albert K. 2001. Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Analytical Chemistry*, 73, 3: 667-674
- Davis C., Jing H., Howe J.A., Rocheford T., Tanumihardjo S.A. 2008.  $\beta$ -Cryptoxanthin from supplements or carotenoid-enhanced maize maintains liver vitamin A in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) better than or equal to  $\beta$ -carotene supplements. *British Journal of Nutrition*, 100, 4: 786-793
- Deineka V.I., Sorokopudov V.N., Deineka L.A., Tret'yakov M.Y., Fesenko V.V. 2008. Studies of *Physalis alkekengi* L. fruits as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42, 2: 87-88
- Delcourt C., Carrière I., Delage M., Barberger-Gateau P., Schalch W.F. 2006. Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: The POLA study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47, 6: 2329-2335
- Delezie E., Rovers M., Van der Aa A., Ruttens A., Wittoox S., Segers L. 2014. Comparing responses to different selenium sources and dosages in laying hens. *Poultry Science*, 93, 12: 3083-3090
- Diaz P., Jeong S.C., Lee S., Khoo C., Koyyalamudi S.R. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 7, 26: 1-9
- Donovan J.L., Manach C., Faulkus R.M., Kroon P.A. 2006. Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. V: Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (eds.). Melbourne, Blackwell Publishing: 303-351
- Dornberger K. 1986. The potential antineoplastic acting constituents of *Physalis alkekengi* L. var *franchetii* Mast. *Pharmazie*, 41, 4: 265-268

- EFSA. 2009. Scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on a request from the European Commission on the safety of use of colouring agents in animal nutrition (Part III). *EFSA Journal*, 7, 5: 1098 doi:10.2903/j.efsa.2009.1098: 48 str.
- FAO/WHO. 2004. Summary of the evaluation performed by the joint FAO/WHO expert committee on food additives: Zeaxanthin (synthetic). Geneva, Food and Agriculture Organization of the United Nations: baza podatkov  
<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4907> (april, 2015)
- FAOSTAT. 2014. Production of commodity in selected country. Geneva, Food and Agriculture Organization of the United Nations: baza podatkov  
<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E> (december, 2014)
- Fekete S., Guillarme D., Dong M.W. 2014. Superficially porous particles: perspectives, practices, and trends. *LC GC Europe*, 27, 6: 312-323
- Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Jarén-Galán M. Garrido-Fernández J., Pérez-Gálvez A., Hornero-Méndez D. 2012. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 2: 438-450
- Ford E.S., Giles W.H. 2000. Serum vitamins, carotenoids, and angina pectoris: findings from the national health and nutrition examination survey III. *Annals of Epidemiology*, 10, 2: 106-116
- Fredriksson S., Elwinger K., Pickova J. 2006. Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chemistry*, 99, 3: 530-537
- Froescheis O., Moalli S., Liechi H., Bausch J. 2000. Determination of lycopene in tissues and plasma of rats by normal-phase high-performance liquid chromatography with photometric detection. *Journal of Chromatography B*, 739, 2: 291-299
- Furusawa N. 2011. A simple and small-scale sample preparation technique to determine canthaxanthin in hen egg yolk. *Food Chemistry*, 124, 4: 1643-1646
- Galobart J., Sala R., Rincón-Carruyo X., Manzanilla E.G., Vila B., Gasa J. 2004. Egg yolk color as affected by saponification of different natural pigmenting sources. *Journal of Applied Poultry Research*, 13, 2: 328-334
- García-Casal M.N. 2006. Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. *Nutrition Research*, 26, 7: 340-344
- Ge Y., Duan Y.F., Fang G.Z., Zhang Y., Wang S. 2009. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 77, 2: 188-193

- Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Kader A.A. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 17: 4976-4982
- Glaser T., Lienau A., Zeeb D., Krucker M., Dachtler M., Albert K. 2003. Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling. *Chromatographia*, 57, 1: S19-S25
- Granado F., Olmedilla B., Gil-Martinez E., Blanco I. 1998. Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 80, 5: 445-449
- Gray J., Griffin B. 2009. Eggs and dietary cholesterol – dispelling the myth. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 34, 1: 66–70
- Hammershøj M., Kidmose U., Steenfeldt S. 2010. Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 7: 1163-1171
- Hammond B.R., Johnson E.J. Russell R.M., Krinsky N.I., Yeum K.J., Edwards R.B., Snodderly D.M. 1997. Dietary modification of human macular pigment density. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 38, 9: 1795-1801
- Handelman G.J. 2001. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*, 17, 10: 818-822
- Handelman G.J., Nightingale Z.D., Lichtenstein A.H., Schaefer E.J., Blumberg J.B. 1999. Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 2: 247-251
- Hargitai R., Matus Z., Hegyi G., Michl G., Tóth G., Török J. 2006. Antioxidants in egg yolk of a wild passerine: Differences between breeding seasons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 2: 145-152.
- Hasin B.M., Ferdaus M.A., Islam M.A., Uddin M.J., Islam M.S. 2006. Marigold and orange skin as egg yolk color promoting agents. *International Journal of Poultry Science*, 5, 10: 979-987
- Hencken H. 1992. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*, 71, 4: 711-717
- Hernandez J.M. 2005. Egg quality – meeting consumer expectations. *International Poultry Production*, 13, 3: 20-23

- Hidalgo A., Rossi M., Clerici F., Ratti S. 2008. A market study on the quality characteristics of eggs from different housing systems. *Food Chemistry*, 106, 3: 1031-1038
- Holcman A., Kovač M., Kmecl A., Zajec M. 1997. Kakovost jajc na slovenskem tržišču. V: 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo. Knjiga del. Vol. 2. Beld, 21-25. april 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevvar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 667-674
- Huang C., Xu Q.M., Chen C., Song C.W., Xu Y., Xiang Y., Feng Y.L., Ouyang H., Zhang Y., Jiang H.L. 2014. The rapid discovery and identification of physalins in the calyx of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry together with a novel three-step data mining strategy. *Journal of Chromatography A*, 1361: 139-152
- Huang L.L., Coleman H.R., Kim J., de Monasterio F., Wong W.T., Schleicher R.L., Ferris F.L., Chew E.Y. 2008. Oral supplementation of lutein/zeaxanthin and omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in persons aged 60 years or older, with or without AMD. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49, 9: 3864-3869
- Humphrey A.J., Beale M.H. 2006. Terepenes. V: *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (eds.). Melbourne, Blackwell Publishing: 47-101
- Itoh T., Tamura T., Matsumoto T. 1977. Triterpene alcohols in seeds of *Solanaceae*. *Phytochemistry*, 16, 11: 1723-1726
- Jajca in perutninsko meso. 2015. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 2 str.  
[http://www.mkgp.gov.si/si/delovna\\_podrocja/kmetijstvo/kmetijski\\_trgi/jajca\\_in\\_perutninsko\\_meso/](http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/jajca_in_perutninsko_meso/) (april, 2015).
- Jalal F., Nesheim M.C., Agus Z., Sanjur D., Habicht J.P. 1998. Serum retinol concentrations in children are affected by food sources of beta-carotene, fat intake, and anthelmintic drug treatment. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 3: 623-629
- Javdan N., Estakhr J. 2011. *Physalis alkekengi* reduces spermatogenesis and camp - responsive element modulator gene expression in rat. *Pharmacologyonline*, 2: 866-873
- Ji L., Yuan Y.L., Luo L.P., Chen Z., Ma X.Q., Ma Z.J., Cheng L. 2012. Physalins with anti-inflammatory activity are present in *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and can function as Michael reaction acceptors. *Steroids*, 77, 5: 441-447

- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. 1989. Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden, Bd. 1a, Physikalische und chemische Nachweismethoden: Grundlagen, reagenzien I. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft: 468 str.
- Karadas F., Grammenidis E., Surai P.F., Acamovic T., Sparks C. 2006. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*, 47, 5: 561-566
- Karunajeewa H., Hofmann A. 1992. The egg-yolk color response to the inclusion of increasing levels of zeaxanthin in the diet of crossbred layers. *Archiv für Geflügelkunde*, 56, 3: 109-112
- Kean E.G., Hamaker B.R., Ferruzzi M.G. 2008. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and degermed maize meal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 21: 9918-9926
- Kelly E.R., Plat J., Haenen G.R.M.M., Kijlstra A., Berendschot T.T.J.M. 2014. The effect of modified eggs and an egg-yolk based beverage on serum lutein and zeaxanthin concentrations and macular pigment optical density: Results from a randomized trial. *Plos One*, 9, 3: e92659, doi: 10.1371/journal.pone.0092659: 9 str.
- Keser S. 2009. Vpliv informacije o blagovni znamki in sistemu reje kokoši na potrošnikovo senzorično vrednotenje jajc. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 89 str.
- Kljak K., Drdić M., Karolyi D., Grbeša D. 2012. Pigmentation efficiency of Croatian corn hybrids in egg production. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 7, SI: 23-27
- Kotrbaček V., Skřivan M., Kopecký J., Pěnkava O., Hudečková P., Uhríková I., Doubek J. 2013. Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*. *Czech Journal of Animal Science*, 58, 5: 193-200
- Krawczyk J., Sokołowicz Z., Szymczyk B. 2011. Effect of housing system on cholesterol, vitamin and fatty acid content of yolk and physical characteristics of eggs from Polish native hens. *Archiv für Geflügelkunde*, 75, 3: 151-157
- Kuang H.X., Xia Y.G., Liang J., Yang B.Y., Wang Q.H., Sun Y.P. 2011. Fast classification and compositional analysis of polysaccharides from TCMs by ultra-performance liquid chromatography coupled with multivariate analysis. *Carbohydrate Polymers*, 84, 4: 1258-1266
- Kuhn R., Brockmann H. 1932. Bestimmung von Carotinoiden. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 206, 1-3: 41-64



- Lai S.M., Gray J.I., Flegal C.J. 1996. Deposition of carotenoids in eggs from hens fed diets containing saponified and unsaponified oleoresin paprika. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 2: 166-170
- Liaaen-Jensen S., Frode Lutnæs B. 2008. E/Z Isomers and isomerization. V: Carotenoids. Vol. 4. Natural functions. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser: 15-36
- Leeson S., Caston L. 2004. Enrichment of eggs with lutein. *Poultry Science*, 83, 10: 1709-1712
- Leeson S., Caston L.J. 2003. Vitamin enrichment of eggs. *Journal of Applied Poultry Research*, 12, 1: 24-26
- Lesellier E. 2012. Extension of the carotenoid test to superficially porous C<sub>18</sub> bonded phases, aromatic ligand types and new classical C<sub>18</sub> bonded phases. *Journal of Chromatography A*, 1266: 34-42
- Leth T., Jakobsen J., Andersen N.L. 2000. The intake of carotenoids in Denmark. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 2: 128-132
- Li X.L., Zhang C.L., Wu D.C., Tang L., Cao X.J., Xin Y. 2012. *In vitro* effects on intestinal bacterium of physalins from *Physalis alkekengi* var. *francheti*. *Fitoterapia*, 83, 8: 1460-1465
- Li X.L., Zhang C.L., Li W.L., Wu D.C., Liu J.J., Tang L., Xin Y. 2013. *In vivo* effects on the intestinal microflora of *Physalis alkekengi* var. *francheti* extracts. *Fitoterapia*, 87: 43-48
- Li X., Zhao J.P., Yang M., Liu Y.L., Li Z.C., Li R.Y., Li X.R., Li N., Xu Q.M., Khan I.A., Yang S. 2014. Physalins and withanolides from the fruits of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and the inhibitory activities against human tumor cells. *Phytochemistry Letters*, 10: 95-100
- Liu Y.Q., Davis C.R., Schmaelzle S.T., Rocheford T., Cook M.E., Tanumihardjo S.A. 2012.  $\beta$ -Cryptoxanthin biofortified maize (*Zea mays*) increases  $\beta$ -cryptoxanthin concentration and enhances the color of chicken egg yolk. *Poultry Science*, 91, 2: 432-438
- Loetscher Y., Kreuzer M., Messikommer R.E. 2013. Utility of nettle (*Urtica dioica*) in layer diets as a natural yellow colorant for egg yolk. *Animal Feed Science and Technology*, 186, 3-4: 158-168
- Lokaewmanee K., Yamauchi K., Komori T., Saito K. 2011. Enhancement of yolk color in raw and boiled egg yolk with lutein from marigold flower meal and marigold flower extract. *Journal of Poultry Science*, 48, 1: 25-32
- Lord T. 2003. *Flora: the gardener's bible*. Vol. 2. London, Cassell: 1584 str.

- Ma L., Lin X.M. 2010. Effect of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1: 2-12
- Magdelaine P. 2011. Egg and egg product production and consumption in Europe and the rest of the world. V: *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Vol. 1: Egg safety and nutritional quality. Nys Y., Bain M., Van Immerseel F. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing: 83-132
- Maiani G., Castón M.J., Catasta G., Toti E., Cambrodón I.G., Bysted A., Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Knuthsen P., Valoti M., Böhm V., Mayer-Miebach E., Behnsilian D., Schlemmer U. 2009. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53: S194-S218
- Martelanc M., Vovk I., Simonovska B. 2009. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 38: 6662-6670
- Marusich W.L., Bauernfeind J.C. 1981. Oxycarotenoids in poultry feeds. V: Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, technological and nutritional applications, A volume in *Food Science and Technology*. Bauernfeind J.C., Stewart G.F., Schweigert B.S., Hawthorn J. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Waltham, Academic Press: 319-460
- Matus Z., Ohmacht R. 1990. Selectivity of some aromatic-compounds and carotenoids on C18 packings made with different endcapping procedures. *Chromatographia*, 30, 5-6: 318-322
- Min K.B., Min, J.Y. 2014. Serum carotenoid levels and risk of lung cancer death in US adults. *Cancer Science*, 105, 6: 736-743
- Moeller S.M., Volland R., Tinker L., Blodi B.A., Klein M.L., Gehrs K.M. Johnson E.J., Snodderly M., Wallace R.B., Chappell R.J., Parekh N., Ritenbaugh C., Mares J.A. 2008. Associations between age-related nuclear cataract and lutein and zeaxanthin in the diet and serum in the carotenoids in the age-related eye disease study (CAREDS), an ancillary study of the women's health initiative. *Archives of Ophthalmology*, 126, 3: 354-364
- Montaserti A., Pourheydar M., Khazaei M., Ghorbani R. 2007. Anti-fertility effects of *Physalis alkekengi* alcoholic extract in female rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 5, 1: 13-16
- Moros E.E., Darnoko D., Cheryan M., Perkins E.G., Jerrell J. 2002. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 21: 5787-5790

- Müller L., Fröhlich K., Böhm V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (alpha TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129, 1: 139-148
- Na J.C., Song J.Y., Lee B.D., Lee S.J., Lee C.Y., An G.H. 2004. Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 117, 3-4: 305-315
- Naumoska K., Vovk I. 2015. Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1381: 229-238
- Nimalaratne C., Lopes-Lutz D., Schieber A., Wu J. 2012. Effect of domestic cooking methods on egg yolk xanthophylls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 51: 12547-12552
- Niu Z., Fu J., Gao Y., Liu F. 2008. Influence of paprika extract supplement on egg quality of laying hens fed wheat-based diet. *International Journal of Poultry Science*, 7, 9: 887-889
- Nys Y. 2000. Dietary carotenoids and egg yolk coloration - a review. *Archiv für Geflügelkunde*, 64, 2: 45-54
- Nys Y., Guyot N. 2011. Egg formation and chemistry. V: Improving the safety and quality of eggs and egg products. Vol. 1: Egg safety and nutritional quality. Nys Y., Bain M., Van Immerseel F. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Cambridge, Woodhead Publishing: 83-132
- O'Connell O.F., Ryan L., O'Brien N.M. 2007. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, 27, 5: 258-264
- Okubo T., Akachi S., Hatta H. 1996. Structure of hen eggs and physiology of egg laying. V: Hen eggs: Basic and applied science. Yamamoto T., Juneja L.R., Hatta H., Kim H. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 1-12
- Olmedilla B., Granado F., Gil-Martinez E., Blanco I., Rojas-Hidalgo E. 1997. Reference values for retinol, tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clinical Chemistry*, 43: 1066-1071
- Olmedilla B., Granado F., Southon S., Wright A.J.A., Blanco I., Gil-Martinez E., van den Berg H., Corridan B., Roussel A.M., Chopra M., Thurnham D.I. 2001. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *British Journal of Nutrition*, 85, 2: 227-238

- O'Neill M.E., Carroll Y., Corridan B., Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Van den Berg H., Hininger I., Rousell A.M., Chopra M., Southon S., Thurnham D.I. 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85, 4: 499-507
- Opaliński S., Dolińska B., Korczyński M., Chojnacka K., Dobrzański Z., Ryszka F. 2012. Effect of iodine-enriched yeast supplementation of diet on performance of laying hens, egg traits, and egg iodine content. *Poultry Science*, 91, 7: 1627-1632
- Pajk Žontar T., Golob T., Skvarča M., Korošec M. 2010. Svežost kokošjih jajc na slovenskem tržišču. V: *Trendi in izzivi v živilstvu, prehrani, gostinstvu in turizmu*. 1. mednarodna strokovna konferenca. Ljubljana 25-27. oktober 2010. Cvitkovič D., Loborec V., Vulić G. (ur.). Ljubljana, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana: 210-217
- Pattison D.J., Symmons D.P., Lunt M., Welch A., Bingham S.A., Day N.E., Silman A.J. 2005. Dietary  $\beta$ -cryptoxanthin and inflammatory polyarthritis: results from a population-based prospective study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 2: 451-455
- Pérez-Gálvez A., Negro-Balmaseda J.J., Mínguez-Mosquera M.I., Cascajo-Almenara M.V., Garrido-Fernández J. 2008. Astaxanthin from crayfish (*Procambarus clarkii*) as a pigmentary ingredient in the feed of laying hens. *Grasas Y Aceites* 59, 2: 139-145
- Perry A., Rasmussen H., Johnson E.J. 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 1: 9-15
- Pintea A., Varga A., Stepnowski P., Socaciu C., Culea M., Diehl H.A. 2005. Chromatographic analysis of carotenol fatty acid esters in *Physalis alkekengi* and *Hippophae rhamnoides*. *Phytochemical Analysis*: 16, 3: 188-195
- Pukl M., Prošek M. 1990. Rapid quantitative TLC analysis of sugars using an improved commonly used solvent system. *Journal of Planar Chromatography*, 3, 3: 173-176.
- Pursch M., Strohschein S., Händel H., Albert K. 1996. Temperature-dependent behavior of C30 interphases. A solid-state NMR and LC-NMR study. *Analytical Chemistry*, 68, 2: 386-393
- Qiu L., Zhao F., Jiang Z.H., Chen L.X., Zhao Q., Liu H.X., Yao X.S., Qiu F. 2008. Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Products*, 71, 4: 642-646
- Quattrocchi U. 2012. *CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology* (Five volume set). 1st ed. Boca Raton, CRC Press: 4017 str.

- Rafferty J.L., Siepmann J.I., Schure M.R. 2012. A molecular simulation study of the effects of stationary phase and solute chain length in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1223: 24-34
- Rajasekaran A., Kalaivani M. 2013. Designer foods and their benefits: A review. *Journal of Food Science and Technology Mysore*, 50, 1: 1-16
- Rao A.V., Rao L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 3: 207-216
- Rathert T.C., Gökmen C., Gürbüz Y. 2010. Effect of watercress (*Nasturtium Officinale* R.Br.) on egg quality, yolk colour and yolk fatty acid composition in laying hens. *Archiv für Geflügelkunde*, 74, 3: 178-182
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje RS: 215 str.
- Reif C., Arrigoni E., Schärer H., Nyström L., Hurrell R.F. 2013. Carotenoid database of commonly eaten Swiss vegetables and their estimated contribution to carotenoid intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 1: 64-72
- Řezanka T., Olšovská J., Sobotka M., Sigler K. 2009. The use of APCI-MS with HPLC and other separation techniques for identification of carotenoids and related compounds. *Current Analytical Chemistry*, 5, 1: 1-25
- Rivera S.M., Canela-Garayoa R. 2012. Analytical tools for analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 2: 1-10
- Roberts R.L., Green J., Lewis B. 2009. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clinics in Dermatology*, 27, 2: 195-201
- Rodić Z., Simonovska B., Albreht A., Vovk I. 2012. Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of Chromatography A*, 1231: 59-65
- Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. 2004. HarvestPlus technical monograph series 2. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. 1<sup>st</sup> ed., New York, HarvestPlus: 58 str.
- Sá M.S., de Menezes M.N., Krettli A.U., Ribeiro I.M., Tomassini T.C., Ribeiro dos Santos R., de Azevedo W.F. Jr, Soares M.B. 2011. Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G. *Journal of Natural Products*, 74, 10: 2269-2272
- Sajilata M.G., Singhal R.S., Kamat M.Y. 2008. The carotenoid pigment zeaxanthin - a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 1: 29-49
- Sander L.C., Sharpless K.E., Craft N.E., Wise S.A. 1994. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Analytical Chemistry*, 66, 10: 1667-1674

- Sander L.C., Sharpless K.E., Pursch M. 2000. C<sub>30</sub> stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 880: 189-202
- Sandeski L.M., Ponsano E.H.G., Neto M.G. 2014 Optimizing xanthophyll concentrations in diets to obtain well-pigmented yolks. *Journal of Applied Poultry Research*, 23, 3: 409-417
- Santos-Bocanegra E., Ospina-Osorio X., Oviedo-Rondón E.O. 2004. Evaluation of xanthophylls extracted from *Tagetes erectus* (marigold flower) and *Capsicum Sp.* (red pepper paprika) as a pigment for egg-yolks compared with synthetic pigments. *International Journal of Poultry Science*, 3, 11: 685-689
- Schaeffer J.L., Tyczkowski J.K., Parkhurst C.R., Hamilton P.B. 1988. Carotenoid composition of serum and egg-yolks of hens fed diets varying in carotenoid composition. *Poultry Science*, 67, 4: 608-614
- Schalch W., Bone R.A., Landrum J.T. 2010. The functional role of xanthophylls in the primate retina. V: Carotenoids: physical, chemical, and biological functions and properties. Landrum J.T. (ed.). Boca Raton, CRC press: 257-282
- Schalch W., Landrum J.T., Bone R.A. 2009. The eye. V: Carotenoids. Vol. 5. Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser: 301-334
- Schlatterer J., Breithaupt D.E. 2006. Xanthophylls in commercial egg yolks: quantification and identification by HPLC and LC-(APCI)MS using C<sub>30</sub> phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6: 2267-2273
- Seddon J.M., Ajani U.A., Sperduto R.D., Hiller R., Blair N., Burton T.C., Farber M.D., Gragoudas E.S., Haller J., Miller D.T., Yannuzzi L.A., Willett W. 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *Journal of the American Medical Association*, 272, 18: 1413-1420
- Şekeroğlu A., Sarica M., Demir E., Ulutaş Z., Tilki M., Saatci M. 2008. The effects of housing system and storage length on the quality of eggs produced by two lines of laying hens. *Archiv für Geflügelkunde*, 72, 3: 106-109
- Senčić Đ., Butko D. 2006. Proizvodnost nesilica i kvaliteta kokošnjih jaja iz slobodnog i kaveznog sustava držanja. *Poljoprivreda*, 12, 2: 1-5
- Seuss-Baum I., Nau F., Guérin-Dubiard. 2011. The nutritional quality of eggs. V: Improving the safety and quality of eggs and egg products. Vol. 2: Egg safety and nutritional quality. Van Immerseel F., Nys Y., Bain M. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing: 201-236

- Shekar-Foroosh S., Changizi-Ashtiyani S., Akbarpour B., Attari M.M., Zarei A., Ramazani M. 2012. The effect of alcoholic extract of *Physalis alkekengi* on serum concentration of thyroid hormones in rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 14, 5: 7-11
- Simonovska B., Vovk I., Glavnik V., Černelič K. 2013. Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach. *Journal of Chromatography A*, 1276: 95-101
- SI-STAT. 2013. Perutnina, prireja mesa in jajc, Slovenija, letno. 2013. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije: baza podatkov [http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1517303S&ti=&path=/Database/Okolje/15\\_kmetijstvo\\_ribistvo/05\\_zivinoreja/02\\_15173\\_prireja\\_mesa/&lang=2](http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1517303S&ti=&path=/Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/05_zivinoreja/02_15173_prireja_mesa/&lang=2) (december, 2014)
- Skřivan M., Englmaierová M. 2014. The deposition of carotenoids and alpha-tocopherol in hen eggs produced under a combination of sequential feeding and grazing. *Animal Feed Science and Technology*, 190: 79-86
- Snyder L.J., Kirkland J.J., Dolan J.W. 2010. Introduction to modern liquid chromatography. 3<sup>rd</sup> ed., Hoboken, John Wiley & Sons Inc.: 912 str.
- Song W.O., Kerver J.M. 2000. Nutritional contribution of eggs to American diets. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 5: 556S-562S
- Sparks N.H.C. 2006. The hen's egg - is its role in human nutrition changing. *Worlds Poultry Science Journal*, 62, 2: 308-315
- Stadelman W.J., Pratt D.E. 1989. Factors influencing composition of the hens egg. *Worlds Poultry Science Journal*, 45, 3: 247-266
- Stadelman. 1990. Quality identification of shell eggs. V: *Egg science and technology*. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. New York, Food Products Press: 37-61
- Sugiura M., Nakamura M., Ikoma Y., Yano M., Ogawa K., Matsumoto H., Kato M., Ohshima M., Nagao A. 2006. Serum carotenoid concentrations are inversely associated with serum aminotransferases in hyperglycemic subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 71, 1: 82-91
- Sujatha T., Narahari D. 2011. Effect of designer diets on egg yolk composition of 'White Leghorn' hens. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 4: 494-497
- Surai P.F., Noble R.C., Speake B.K. 1996. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1304, 1: 1-10
- Surai P.F., MacPherson A., Speake B.K., Sparks N.H.C. 2000. Designer egg evaluation in a controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 4: 298-305

- Surai P.F., Sparks N.H.C. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 1: 7-16
- Surai P.F., Speake B.K. 1998. Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 11: 645-651.
- Taiz L., Zeigler E. 2006. *Plant physiology*. 4<sup>th</sup> ed. Sunderland, Sinauer Associates: 764 str.
- Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58, 2: 100-110
- Terčič D., Žlender B., Holcman A. 2012. External, internal sensory qualities of table eggs as influenced by two different production systems. *Agroznanje*, 13, 4: 555-562
- Terpinc P., Polak T., Šegatin N., Hanzlowsky A., Poklar Urlih N., Abramovič H. 2011. Antioxidant properties of vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*, 128, 1: 62-69
- Thakkar S.K., Failla M.L. 2008. Bioaccessibility of pro-vitamin a carotenoids is minimally affected by non pro-vitamin a xanthophylls in maize (*Zea mays* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 23: 11441-11446
- Tisaj K. 2011. Pomen jajc v prehrani študentov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 114 str.
- Tong H., Liang Z., Wang G. 2008 Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. *Carbohydrate Polymers*, 71, 2: 316-323
- Tong H.B., Wang R.F., Liu X.M., Wang G.Y., Du F.G., Zeng X.L. 2011a. Structural characterization and *in vitro* inhibitory activities in P-selectin-mediated leukocyte adhesion of polysaccharide fractions isolated from the roots of *Physalis alkekengi*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 2: 210-217
- Tong H.B., Zhu M., Feng K., Sun L.W. 2011b. Purification, characterization and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharide fractions isolated from the fruits of *Physalis alkekengi* L. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 2: 524-541
- Torabzadeh P., Panahi P. 2011. Evaluation of antifungal activity of *Physalis alkekengi* L. extracts on *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Nocardia asteroides*. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 11, 6: 863-866
- USDA. 2014. National Nutrient Database for Standard Reference Release 27. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service: baza podatkov <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/> (december, 2014)



- van het Hof K.H., Brouwer I.A., West C.E., Haddeman E., Steegers-Theunissen R.P.M., van Dusseldorp M., Weststrate J.A., Eskes T.K.A.B., Hautvast J.G.A.J. 1999. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of beta-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 2: 261-268
- van het Hof K.H.V., West C.E., Weststrate J.A., Hautvast J.G.A.J. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130, 3: 503-506
- van Ruth S., Alewijn M., Rogers K., Newton-Smith E., Tena N., Bollen M., Koot A. 2011. Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling. *Food Chemistry*, 126, 3: 1299-1305
- van Ruth S.M., Koot A.H., Brouwer S.E., Boivin N., Carcea M., Zerva C.N., Haugen J.E., Höhl A., Köroglu D., Mafra I., Rom S. 2013. Eggspection: organic egg authentication method challenged with produce from ten different countries. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 5, 1: 7-14
- Vaughan J.G., Geissler C.A. 2009. *The new Oxford book of food plants*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Oxford University Press: 249 str.
- Vishwanathan R., Goodrow-Kotyla E.F., Wooten B.R., Wilson T.A., Nicolosi R.J. 2009. Consumption of 2 and 4 egg yolks/d for 5 wk increases macular pigment concentrations in older adults with low macular pigment taking cholesterol-lowering statins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 5: 1272-1279
- Vreš B., Gilčvert-Berdnik D., Seliškar A. 2014. *Rastlinstvo življenjskih okolij v Sloveniji: z navodili za pripravo herbarija*. Ljubljana, Pipinova knjiga: 492 str.
- Wang W., Connor S.L., Johnson E.J., Klein M.L., Hughes S., Connor W.E. 2007. Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 3: 762-769
- Weber E.J. 1987. Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 64, 8: 1129-1134
- Weller P., Breithaupt D.E. 2003. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 24: 7044-7049
- Wenzel A.J., Gerweck C., Barbato D., Nicolosi R.J., Handelman G.J., Curran-Celentano J. 2006. A 12-wk egg intervention increases serum zeaxanthin and macular pigment optical density in women. *Journal of Nutrition*, 136, 10: 2568-2573
- Wenzel M., Seuss-Baum I., Schlich E. 2010. Influence of pasteurization, spray- and freeze-drying, and storage on the carotenoid content in egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3: 1726-1731

- Wenzel M., Seuss-Baum I., Schlich E. 2011. Influences of storage time and temperature on the xanthophyll content of freeze-dried egg yolk. *Food Chemistry*, 124, 4: 1343-1348
- Yamaguchi M. 2008.  $\beta$ -Cryptoxanthin and bone metabolism: the preventive role in osteoporosis. *Journal of Health Science*, 54, 4: 356-369
- Yamaguchi M., Igarashi A., Uchiyama S., Morita S., Sugawara K., Sumida T. 2004. Prolonged intake of juice (*Citrus unshiu*) reinforced with  $\beta$ -cryptoxanthin has an effect on circulating bone biochemical markers in normal individuals. *Journal of Health Science*, 50, 6: 619-624
- Yamaguchi M., Igarashi A., Uchiyama S., Sugawara K., Sumida T., Morita S., Ogawa H., Nishitani M., Kajimoto Y. 2006. Effect of  $\beta$ -cryptoxanthin on circulating bone metabolic markers: intake of juice (*Citrus unshiu*) supplemented with  $\beta$ -cryptoxanthin has an effect in menopausal women. *Journal of Health Science*, 52, 6: 758-768
- Yang H.M., Han S.Y., Zhao D.Y., Wang G.Y. 2014. Adjuvant effect of polysaccharide from fruits of *Physalis alkekengi* L. in DNA vaccine against systemic candidiasis. *Carbohydrate Polymers*, 109: 77-84
- Yu B., Wang J., Suter P.M., Russell R.M., Grusak M.A., Wang Y., Wang Z., Yin S., Tang G. 2012. Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans. *British Journal of Nutrition*, 108, 4: 611-619
- Yuan J.M., Stram D.O., Arakawa K., Lee H.P., Yu M.C. 2003. Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: The Singapore Chinese health study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 12, 9: 890-898
- Zajec M. 1995. Kakovost jajc na slovenskem tržišču. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 98 str.
- Zhu P.L., Dolan J.W., Snyder L.R., Djordjevic N.M., Hill D.W., Lin J.T., Sander L.C., Van Heukelem L. 1996. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution.VI. Selectivity for neutral (non-ionized) samples as a function of sample type and other separation conditions. *Journal Chromatography A*, 756, 1: 63-72

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS (ARRS), ki mi je dodelila finančna sredstva za usposabljanje.*

*Iskreno se zahvaljujem dr. Bredi Simonovski in dr. Ireni Vovk za mentorstvo ter pomoč pri pisanju člankov in doktorske disertacije. Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem Laboratorija za prehrambno kemijo za pomoč in podporo pri delu, še posebno bi se zahvalila Mateji Puklavec, Katerini Naumoski in dr. Vesni Glavnik.*

*Iskrena zahvala gre tudi doc. dr. Jeleni Trišković iz Kemijske fakultete Univerze v Beogradu za statistično obdelavo podatkov.*

*Hvala tudi članom komisije za njihove predloge in popravke ter njihovo angažiranost, da smo v najkrajšem možnem času zaključili s postopkom.*

*Marku, družini in prijateljem pa se zahvaljujem za vsestransko podporo in pomoč.*

*Hvala tudi vsem ostalim, ki ste na kakršni koli način pomagali na poti do doktorskega dela.*

## PRILOGE

### PRILOGA A: Toplotni graf (heatmap)

