

# Određivanje sadržaja kolesterola u žumanjcima jajima tekućinskom kromatografijom

---

Mikić, Slavica

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:803052>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Slavica Mikić

**Određivanje sadržaja kolesterola u  
žumanjcima jaja tekućinskom  
kromatografijom**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2019.

## Sažetak

Kolesterol, jedan od glavnih sastojaka žumanjka jajeta, je po kemijskom sastavu lipid, točnije sterol. Smatra ga se esencijalnim jer mijenja fluidnost životinjskim staničnim membranama i preteča je steroidnih hormona. Nalazi se u hrani životinjskog podrijetla. Do visokih koncentracija kolesterola u organizmu dolazi pretjeranom konzumacijom hrane bogate kolesterolom. Uz to, na visoku koncentraciju utječe i sposobnost organizma da sam sintetizira kolesterol. Višak kolesterola se taloži na stjenkama arterija kao LDL-kolesterol (eng. *low density cholesterol*) tzv. „loš“ kolesterol. Višak LDL-kolesterola uklanja HDL-kolesterol (eng. *high density cholesterol*) ili „dobar“ kolesterol.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentraciju kolesterola u uzorcima žumanjka tekućinskom kromatografijom vrlo visoke razlučivosti (UPLC, eng. *ultra performance liquid chromatography*). Tekućinska kromatografija je, uz plinsku kromatografiju, najčešća metoda određivanja koncentracije kolesterola.

Ključne riječi: kolesterol, žumanjak, HPLC, UPLC

## Abstract

Cholesterol, one of the main ingredient of an egg yolk, is by its chemical composition lipid, precisely sterol. It is considered to be essential because it changes fluidity of animal cell membranes and is forerunner for steroid hormones. Cholesterol can be found in food of animal origion. High concentrations of cholesterol in the body occur by excessive consuming cholesterol rich food. Cholesterol biosynthesis also affects on high concentration. Cholesterol excess deposits on artery walls as LDL-cholesterol (*low density cholesterol*) also known as „bad“ cholesterol. The LDL-cholesterol excess is removed by HDL-cholesterol (*high density cholesterol*) or „good“ cholesterol.

The purpose of this research was to quantify the concentration of cholesterol in the egg yolk samples by UPLC (*ultra performance liquid chromatography*). Liquid chromatography, along with gas chromatography, is the most common method to quantify the concentration of cholesterol.

Keywords: cholesterol, egg yolk, HPLC, UPLC

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Kolesterol .....	1
2.1. Biosinteza kolesterola .....	2
2.1.1. Sinteza izopentenil-pirofosfata .....	2
2.1.2. Nastanak skvalena .....	3
2.1.3. Nastanak kolesterola .....	4
2.2. Lipoproteini.....	5
2.3. Derivati kolesterola.....	7
2.4. Hrana kao izvor kolesterola .....	7
3. Tekućinska kromatografija .....	8
3.1. Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti .....	8
3.1.1. Dijelovi uređaja za HPLC.....	9
3.2. Tekućinska kromatografija vrlo visoke razlučivosti .....	10
4. Eksperimentalni dio .....	11
4.1. Reagensi i instrumentacija .....	11
4.2. Postupci pripreme za analizu.....	12
4.2.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu .....	12
4.2.2. Priprema UPLC za analizu .....	15
4.2.3. Kalibracija i provjera valjanosti metode.....	16
5. Rezultati i rasprava.....	16
5.1. Izrada kalibracijskog pravca .....	16
5.2. Provjera valjanosti metode.....	18
5.3. Određivanje sadržaja kolesterola u žumanjcima jaja .....	19
6. Zaključak .....	21
7. Literatura .....	22

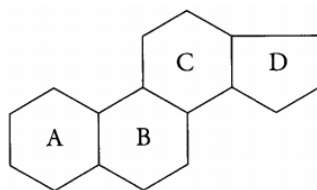
## 1. Uvod

Kolesterol je esencijalni lipid, točnije sterol. Neophodan je za normalan rad organizma jer mijenja fluidnost životinjskim staničnim membranama te je preteča steroidnim hormonima. Iako je neophodan za normalnu funkciju organizma, velike koncentracije kolesterola uzrokuju začepljenje arterija što dovodi do povećanog rizika oboljenja od kardiovaskularnih bolesti. Kolesterol se nalazi u hrani životinjskog podrijetla (jaja, sir, ...). Ne unosi se samo hranom, nego ga organizam može i sam sintetizirati, ponajprije u jetri.

U ovom će se radu određivati količina kolesterola u žumanjku jajeta tekućinskom kromatografijom vrlo visoke razlučivosti (UPLC). Ta metoda je vrlo precizna i osjetljiva i daje pouzdane rezultate. Cilj ovog rada je izračunati udio kolesterola u uzorcima žumanjaka te odrediti odgovara li ona prosječnim vrijednostima kolesterola po žumanjku jajeta.

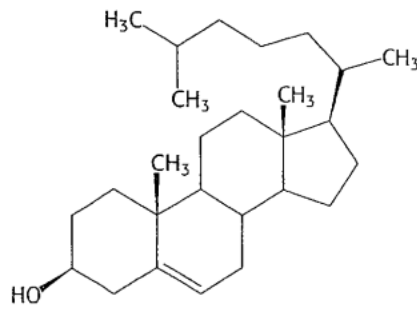
## 2. Kolesterol

Kolesterol je molekula koja pripada skupini lipida, točnije sterolima. Steroli su alkoholni derivati sterana koji nemaju hormonsko djelovanje. Zajedničko svim sterolima su ciklopentanoperhidrofenantrenska jezgra (Slika 1.), topljivost u organskim otapalima i sličan metabolizam. Unatoč tim zajedničkim karakteristikama, to su spojevi različitih fizioloških svojstava. [1]



**Slika 1.:** Ciklopentanoperhidrofenantrenska jezgra [1]

Molekulska formula kolesterola je  $C_{27}H_{46}O$ , a strukturna formula prikazana je na Slici 2.



**Slika 2.:** Strukturna formula kolesterola [2]

Kolesterol je odgovoran za promjenu fluidnosti životinjskih staničnih membrana te je preteče steroidnih hormona poput progesterona, testosterona, estradiola i mnogih drugih. Zbog toga što je preteče mnogim hormonima smatra se esencijalnim. [2]

## 2.1. Biosinteza kolesterola

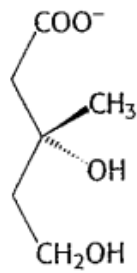
Osim što se kolesterol u organizam unosi hranom, on se i stvara u organizmu. Hranom se unose mnogi prekursori kolesterola kao što su: masne kiseline, ugljikohidrati i neke aminokiseline. Biosinteza kolesterola se najvećim dijelom odvija u jetri (1,5 g na dan). Većina tkiva može sintetizirati kolesterol, ali znatno manje od jetre (oko 0,5 g na dan). [1]

Biosinteza se sastoji od 3 koraka:

1. Sinteza izopentenil-pirofosfata, aktivirane izoprenske jedinice, koja je ključni gradivni dio kolesterola
2. Kondenzacija 6 molekula izopentenil-pirofosfata u skvalen
3. Ciklizacija skvalena i prevođenje tetracikličkog produkta u kolesterol. [2]

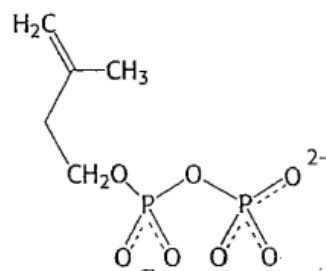
### 2.1.1. Sinteza izopentenil-pirofosfata

Izopentenil-pirofosfat stvara se iz acetil-CoA nizom reakcija koje se odvijaju u citoplazmi. Prva reakcija je nastanak 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) iz acetil-CoA i acetoacetyl-CoA. HMG-CoA se reducira u mevalonat (Slika 3.), a tu ireverzibilnu reakciju katalizira 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA-reduktaza (HMG-CoA-reduktaza). Sinteza mevalonata je odlučujući korak u sintezi kolesterola jer se na tom mjestu mehanizmom povratne sprege regulira sinteza kolesterola. Visoke koncentracije kolesterola u stanici inhibiraju enzim HMG-CoA-reduktazu, dok pri malim koncentracijama kolesterola u stanici enzim postaje aktivniji i stvara se više mevalonata. [1] [2]



**Slika 3.:** Mevalonat [2]

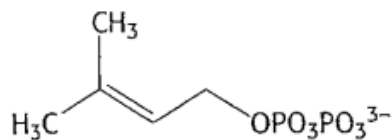
Mevalonat se u 3 uzastopne reakcije prevodi u 3-izopentenil-pirofosfat (Slika 4.) pri čemu se troše 3 molekule ATP-a. [2]



**Slika 4.:** 3-izopentenil-pirofosfat [2]

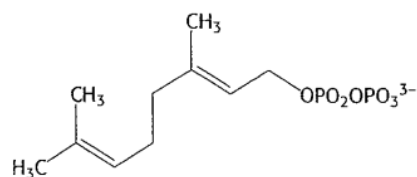
### 2.1.2. Nastanak skvalena

Ovaj korak odvija se u endoplazmatskom retikulumu. Najprije se izopentenil-pirofosfat izomerizira u dimetilalil-pirofosfat (Slika 5.). [2]



**Slika 5.:** Dimetilalil-pirofosfat [2]

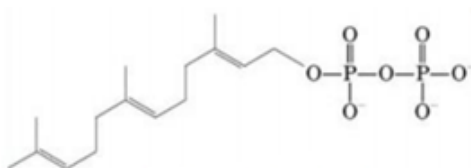
Te dvije izomerne C<sub>5</sub> jedinice, izopentenil-pirofosfat i dimetilalil-pirofosfat, kondenziraju u geranil-pirofosfat, C<sub>10</sub> jedinicu (Slika 6.). [2]



**Slika 6.:** Geranil-pirofosfat [2]

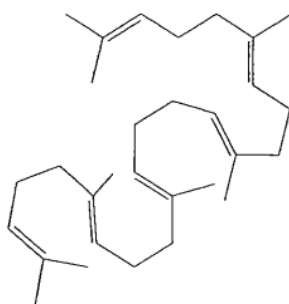


Nastali geranil-pirofosfat kondenzira s još jednom molekulom izopentil-pirofosfata pri čemu nastaje C<sub>15</sub> jedinica, ferenzil-pirofosfat (Slika 7.). [2]



**Slika 7.:** Ferenzil-pirofosfat [2]

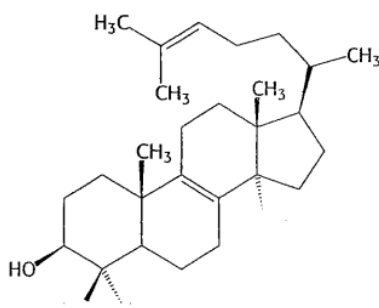
Konačno, kondenzacijom dviju molekula ferenzil-pirofosfata uz redukciju nastaje skvalen, C<sub>30</sub> jedinica (Slika 8.). [2]



**Slika 8.:** Skvalen [2]

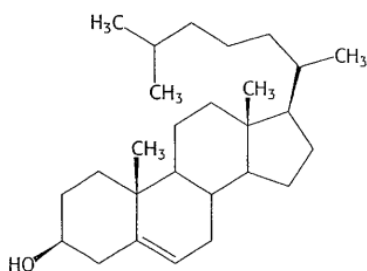
### 2.1.3. Nastanak kolesterola

Ovaj, kao i prethodni korak, odvija se u endoplazmatskom retikulumu. Skvalen se aktivira pretvorbom u skvalen-epoksid koji zatim ciklizira u lanosterol (Slika 9.) uz enzim oksidoskvalen-ciklazu. [2]



**Slika 9.:** Lanosterol [2]

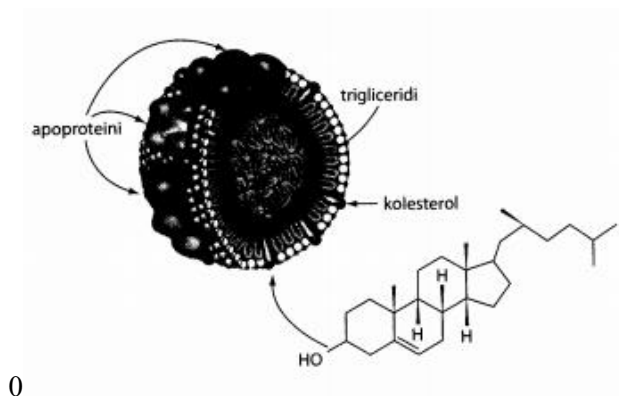
Uklanjanjem triju metilnih skupina, redukcijom jedne i premještanjem druge dvostruke veze nastaje kolesterol (Slika 10.). [2]



**Slika 10.:** Kolesterol [2]

## 2.2. Lipoproteini

Kolesterol se u tjelesnim tekućinama prenosi kao esterificirani kolesterol kojeg prenose lipoproteini u druge organe. Lipoproteini su sferične čestice koje nastaju povezivanjem nepolarnih lipida (triglicerida, kolesterol-estera) s polarnim lipidima (kolesterol, fosfolipidi) i specifičnim proteinima tzv. apolipoproteini (apoproteini). Lipoproteinska čestica se sastoji od jezgre nepolarnih lipida okružene polarnim lipidima i apoproteinima kao što je prikazano na slici 11. [1] [2]

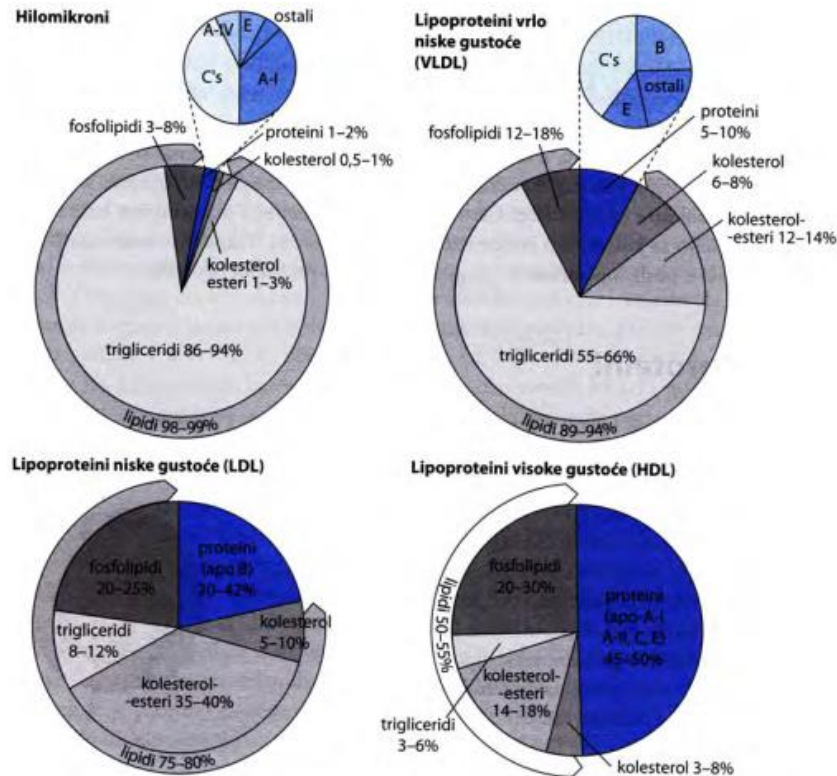


**Slika 11.:** Struktura lipoproteinske čestice [1]

Apoproteine sintetiziraju i izlučuju jetra i crijeva, a uloge su im: solubilizacija hidrofobnih lipida, usmjeravanje prema određenoj stanici pomoću specifičnih signalnih sekvenci koje sadrže, te aktivatorsko ili inhibitorско djelovanje na neke enzime. [1] [2]

Lipoproteini se klasificiraju prema rastućoj gustoći na: hilimikrone, hilimikronske ostatke, lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDL, eng. *very low density lipoproteins*), lipoproteine srednje gustoće (IDL, eng. *intermediate-density lipoproteins*), lipoproteine niske gustoće

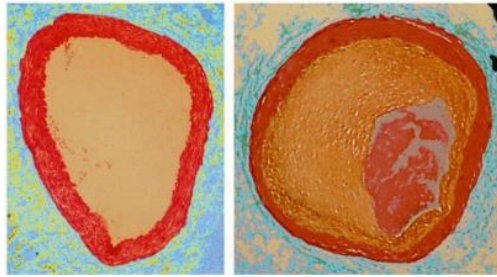
(LDL, eng. *low density lipoproteins*) i lipoproteine visoke gustoće (HDL, eng. *high density lipoproteins*). Kemijski sastav pojedinih lipoproteinskih čestica prikazan je na Slici 12. [2]



Slika 12.: Kemijski sastav hilomikrona, VLDL, LDL i HDL [1]

Kolesterol se iz crijeva iznosi u obliku hilomikrona koji imaju vrlo nisku gustoću. Hilomikronski ostaci su dijelovi hilomikrona bogati kolesterolom. Lipoproteini vrlo niske gustoće iznose višak kolesterola iz jetre. Lipoproteini srednje gustoće bogati su esterima kolesterola. [2]

LDL čestice glavni su prenositelji kolesterola u krvi, a osnovna uloga im je prijenos kolesterola u periferna tkiva gdje reguliraju de novo sintezu kolesterola. Višak LDL-kolesterola naziva se „lošim“ kolesterolom jer pridonosi stvaranju aterosklerotičnih naslaga, tzv. plakova, u arterijama što izaziva ateroskleroza i bolesti srca i krvožilnog sustava (Slika 13.). Ateroskleroza je proces zadebljanja i oštećenja stijenki krvnih žila stvaranjem različitih aterosklerotskih promjena (npr. plakovi). [2]



**Slika 13.:** Prikaz zdrave (lijevo) i začepljene (desno) arterije [2]

Lipoproteini visoke gustoće prikupljaju kolesterol koji u plazmu otpuštaju umiruće stanice i membrane – reverzni transport kolesterola. Lipoproteini visoke gustoće se nazivaju još i „dobrim“ kolesterolom jer djeluju kao prijenosnici, tj. premještaju kolesterol u tijelu tako što ga vežu i esterificiraju te ga prenose u jetru koja ga koristi za sintezu steroidnih hormona. [2]

Visoka razina kolesterola u serumu izaziva bolesti kardiovaskularnog sustava te dovodi do smrti. Omjer HDL/LDL, koji u zdrave osobe iznosi 3,5; koristi se za procjenu pojave srčanih bolesti. Preporučene vrijednosti kolesterola u organizmu su: ukupni kolesterol < 5,0 mmol/L, LDL-kolesterol < 3 mmol/L i HDL-kolesterol > 1,0 mmol/L za muškarce, odnosno > 1,2 mmol/L za žene. [2] [4]

### 2.3. Derivati kolesterola

Važnost kolesterola leži i u tome što je on preteča važnih steroidnih molekula kao što su žučne soli, steroidni hormoni i vitamin D.

Žučne soli su polarni derivati kolesterola i glavni sastojak žuči. One solubiliziraju lipide iz hrane. Kolesterol je preteča pet glavnih steroidnih hormona: progesterona, glukokortikoida, mineralokortikoida, androgena i estrogena. Vitamin D nadzire metabolizam kalcija i fosfora. [2]

### 2.4. Hrana kao izvor kolesterola

Kolesterol se nalazi isključivo u hrani životinjskog podrijetla, dok ga se u biljkama ne može pronaći. Najzastupljeniji je u siru, jajima, svinjetini, govedini, peradi, ribi i škampama. Preporučeni dnevni unos kolesterola za odraslu osobu je oko 300 mg. Pri povišenoj koncentraciji kolesterola, dnevni unos bi se trebao smanjiti na oko 200 mg. Pretjerana konzumacija hrane bogate kolesterolom i prekoračenje preporučenog dnevnog unosa kolesterola dovodi do povećanja koncentracije „lošeg“ kolesterola kojeg se smatra

jednim od glavnih uzročnika kardiovaskularnih bolesti. Prema procjeni WHO (*World Health Organization*) do 2030. god. više od 23 milijuna ljudi će umrijeti zbog kardiovaskularnih bolesti. [3] [4]

### 3. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (LC, eng. *liquid chromatography*) je vrsta kromatografije u kojoj je mobilna faza tekućina i naziva se eluens.

#### 3.1. Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti

Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti, HPLC (eng. *high-performance liquid chromatography*) koristi visoke tlakove kako bi otapalo prošlo kroz zatvorenu kolonu ispunjenu finim punjenjem. [5]

Neke od prednosti i razlika HPLC-a u odnosu na ostale kromatografije su: visoki radni tlak u HPLC uređajima, u višekratnim kolonama malog promjera nalaze se čestice punila malih promjera (3-50  $\mu\text{m}$ ), kontrolirani protok eluensa, mali volumeni uzoraka, osjetljivi detektori uspješno detektiraju male koncentracije analita, visoki stupanj separacije, automatizirani standardizirani instrumenti te brza analiza. [6]

Kao i kod svake kromatografije, razlikujemo stacionarnu fazu (SF) i mobilnu fazu (MF) ili eluens. Kod HPLC-a, SF čine fine čestice malog promjera koje jednoliko ispunjavaju kromatografsku kolonu, a MF je otapalo koje nosi uzorak kroz kolonu. Sastojci uzorka se razdvajaju na osnovu fizikalno-kemijskih interakcija sa SF i MF. Spojevi koji imaju mali afinitet za SF, a dobro se otapaju u MF, prvi napuštaju kolonu. Spojevi koji imaju veliki afinitet za SF, tj. čvrsto se vežu za nju i nisu topljivi u MF, kasnije napuštaju kolonu. [6]

Tijekom kromatografskog procesa, prolaskom MF kroz kolonu se konstantno narušava uspostavljena ravnoteža i uspostavlja nova ravnoteža među sastojcima uzorka koji se razdvajaju između faza. Konkretno, kako MF prolazi kroz kolonu tako svježa MF uspostavlja interakciju sa SF koja je već stupila u kontakt s prethodnim volumenom MF te ima već vezani sastojak na sebi. Svakim sljedećim prolaskom svježje MF, uspostavlja se nova ravnoteža. Sastojci unutar uzorka zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava imaju i različite ravnotežne raspodjele između faza zbog čega svaki sastojak ima različito retencijsko vrijeme (vrijeme zadržavanja). To dovodi do stvaranja karakterističnih

kromatografskih vršaka ili pikova (eng. *peak*) koji su vidljivi na kromatogramu, a detektira ih detektor. Pomoću pikova određuju se kvantitativna i kvalitativna svojstva sastojaka. [6]

HPLC je danas jako zastupljen u mnogim industrijama kao što su prehrambena, kozmetička, farmaceutska i mnoge druge.

Razlikujemo pet metoda HPLC-a:

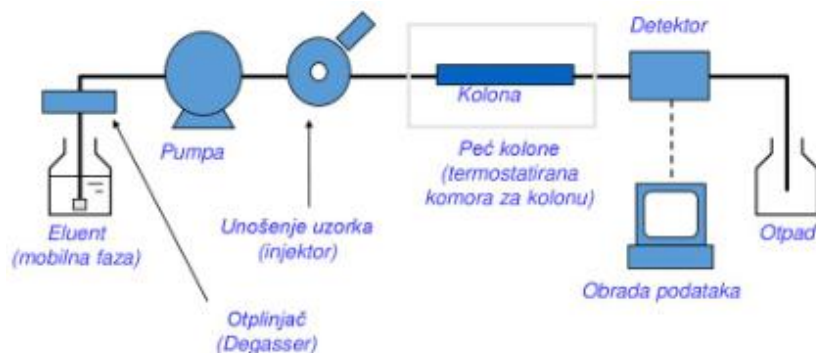
- Gel-filtracijska kromatografija,
- Kromatografija hidrofobnom interakcijom,
- Ionsko-izmjenjivačka kromatografija,
- Afinitetna kromatografija,
- Adsorpcijska kromatografija. [6]

Promjenom MF, mijenja se način razdvajanja čime se postiže željena selektivnost i željeni rezultati.

Razdvajanje HPLC metodom može biti izokratsko ili gradijentno. Kod izokratnog razdvajanja koristi se konstantno jedno otapalo ili ista mješavina otapala u jednakim omjerima, tj. razdvajanje se izvodi pri istom pH. Izokratsko razdvajanje primjenjivo je za razdvajanje i kvantifikaciju poznatog analita. Kod gradijentnog razdvajanje koriste se 2 otapala pri čemu je pH promjenjiv, a ovisi o postupnom dodavanju otapala koje povećava elucijsku snagu. [5]

### 3.1.1. Dijelovi uređaja za HPLC

Uređaj za izvođenje HPLC-a sastoji se od sustava za isporuku mobilne faze, otplinjača (eng. *degasser*), pumpe, injektora, kolone, peći, detektora, sustava za obradu podataka i prikladnog spremnika za otpad (Slika 14.). [5]



**Slika 14.:** Shematski prikaz HPLC uređaja [7]

Spremnik otapala izrađen je od stakla ili plastike i treba sprječavati isparavanje MF.

Otplinjač je porozna cijev koja uklanja mjehuriće zraka u MF koji ometaju analizu.

Razlikujemo dvije pumpe u sustavu, to su pumpa gradijenta niskog tlaka i pumpa visokog tlaka. Pumpa visokog tlaka je glavna pumpa i ona „tjera“ MF kroz kolonu.

Injektor je odgovoran za unošenje uzorka u kolonu.

Kolona načinjena od nehrđajućeg čelika duljine je od 5 do 30 cm i promjera 1 – 5 mm, a ispunjena je sa SF. Zbog mogućnosti da se kolona lako ošteti, na ulazu kolone nalazi se kratka zaštitna kolona (predkolona) koja je ispunjena istom SF kao i glavna kolona. Kolona se nalazi u peći. Povišenje temperature smanjuje viskoznost otapala što ubrzava protok kroz kolonu odnosno smanjuje retencijsko vrijeme. Retencijsko vrijeme je vrijeme potrebno da analit nakon unošenja uzorka stigne do detektora.

Kolona je ispunjena finim zrcima. S obzirom na polarnost SF i MF, razlikujemo HPLC normalnih faza pri kojoj je SF polarna, a MF nepolarna, i HPLC obrnutih faza pri kojoj je SF nepolarna, MF polarna.

Detektor je uređaj koji detektira kada je analit prošao kroz kolonu. Neki od detektora su: detektor UV-VIS zračenja, fluorescencijski, detektor indeksa loma, detektor električne vodljivosti, itd.

Podaci prikupljeni detektorom obrađuju se na računalu odgovarajućim programom. [5] [8]

### **3.2. Tekućinska kromatografija vrlo visoke razlučivosti**

Tekućinska kromatografija vrlo visoke razlučivosti (UPLC, eng. *ultra performance liquid chromatography*) je vrlo slična HPLC-u, odnosno princip rada i primjena je jednaka. Unatoč sličnosti, postoje bitne razlike između te dvije metode.

Najznačajnija razlika je ta da UPLC postiže tlakove do 1 000 bara, što je znatno veće od tlakova koje postiže HPLC koji iznose do 400 bara. Povećanje tlaka ubrzava protok kroz kolonu što ubrzava cijeli proces analize, smanjuje potrošnju mobilne faze, poboljšava razdvajanje i detektiranje. UPLC analiza traje 3 – 10 min, a HPLC često više od 10 minuta. Također, UPLC kolone punjene su znatno manjim česticama (1,7 – 1,8  $\mu\text{m}$ ) od HPLC kolona (3 – 10  $\mu\text{m}$ ). Unatoč prednostima koje nudi UPLC, danas je i dalje zastupljeniji HPLC. [9]

U ovom radu korišten je UPLC prikazan na Slici 15.



**Slika 15.:** UPLC uređaj korišten u radu (proizvođač Shimadzu)

## 4. Eksperimentalni dio

### 4.1. Reagensi i instrumentacija

- KOH (Gram-mol, Hrvatska)
- Etanol, 96% (Gram-mol, Hrvatska)
- n-heksan, HPLC grade (CARLO ERBA, Francuska)
- izopropanol, HPLC grade (Fisher Chemical, UK)
- standard kolesterola (Shimadzu, Japan)
- mješalica (lab dancer, IKA)
- uparivač (LLG-Laabware)
- UPLC (Shimadzu)
- analitička vaga (Kern)



## 4.2. Postupci pripreme za analizu

### 4.2.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu

Uzorci su pripremljeni prema već opisanom postupku [3].

Na analitičkoj vagi odvagano je 0,5 g svježeg žumanjka. Žumanjak se važe na tariranoj vagi na kojoj se nalazi čaša s epruvetom (Slika 16.).



**Slika 16.:** Čaša s epruvetom u kojoj se važe žumanjak

Prethodno odvaganom žumanjku dodano je 5 mL 0,4 M otopine KOH u etanolu i smjesa je miješana na miješalici 1 minutu. Nastala je žuta suspenzija (Slika 17.). KOH odvaja žumanjak od masnih kiselina.



**Slika 17.:** Žuta suspenzija žumanjka i 0,4 M otopina KOH u etanolu

Sadržaj epruvete zagrijavan je 30 minuta na vodenoj kupelji na 50°C (Slika 18.).



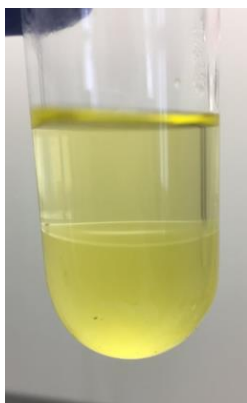
**Slika 18.:** Vodena kupelj s uzorcima

Nakon zagrijavanja, uzorak je ohlađen na sobnu temperaturu i dodano je 5 mL ultračiste H<sub>2</sub>O i promiješano na mješalici. Dolazi do pjenjenja zbog procesa saponifikacije čime se kolesterol oslobađa od ostalih sastojaka (Slika 19.).



**Slika 19.:** Saponifikacija uzorka

U uzorak je potom dodano 10 mL n-heksana, sadržaj epruvete je promiješan na miješalici i pričekano je da se slojevi odijele (Slika 20). Kada su se slojevi odijelili, gornji organski sloj prikupljen je u vijalicu. Ovaj postupak ponovljen je još jednom.



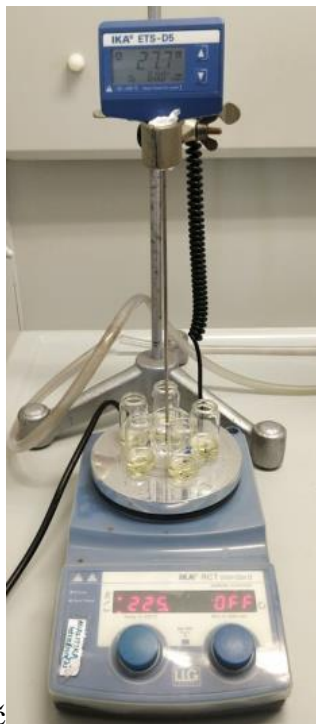
**Slika 20.:** Ekstrakcija uzorka

Prikupljeni organski dio profiltriran je preko filter papira koji je smješten u nastavku za filtriranje (Slika 21).



**Slika 21.:** Filtriranje uzorka

Alikvot od 3 mL prethodno pripremljenog uzorka prebačen je u vijalicu te je upareno otapalo (Slika 22.).



č

**Slika 22.:** Uparavanje otapala

Prethodno pripremljenim uzorcima dodano je 3 mL mobilne faze i promiješano. Tako pripremljeni uzorci spremni su za analizu.

#### **4.2.2. Priprema UPLC za analizu**

Prije analize, UPLC uređaj i kolonu je potrebno isprati mobilnom fazom. Kao mobilna faza korištena je otopina acetonitrila i izopropanola u omjeru 1:1. Kolona je ispirana mobilnom fazom do stalnog tlaka i stabilne bazne linije.

Uvjeti analize:

- vrijeme trajanja analize: 10 min.,
- brzina protoka mobilne faze: 1,2 mL/min.,
- temperatura pećnice: 37°C,
- valna duljina detektiranja UV/VIS detektora: 210 nm,
- volumen injektiranja 10  $\mu$ L,
- kolona: shim-pack GIST 4,6 x 250 nm; 5  $\mu$ m, C18 (Shimadzu).

### 4.2.3. Kalibracija i provjera valjanosti metode

Instrumentale metode određivanja koncentracije analita mogu biti apsolutne (nije potrebna kalibracija) i relativne (potrebno je prvo provesti kalibraciju). Kalibracija ili baždarenje je proces korekcije mjernog uređaja tako da se njime mjere veličine poznatih vrijednosti. Na taj način smanjuje se sistematska pogreška zbog čega je kalibracija vrlo važan korak u kemijskoj analizi. [10] [11]

Kalibracija se izvodi na način da se mjeri odziv instrumenta na niz koncentracija standardnih otopina (uzorci standarda poznate koncentracije). Uvrštavanjem dobivenih vrijednosti u dijagram koji prikazuje ovisnost odziva instrumenta i koncentracije standardnih otopina, dobije se kalibracijski pravac. Iz kalibracijskog pravca se izračunava nepoznata koncentracija analita u uzorku. [10] [12]

Osnovna otopina pripravljena je odvagom 12,5 mg standarda kolesterola na analitičkoj vagi koji je potom prenesen u tikvicu od 10 mL i otopljen mobilnom fazom. Serija otopina koje su se koristile za kalibraciju (70 mg/L, 140 mg/L, 200 mg/L, 270 mg/L, 330 mg/L) pripravljene su razrjeđivanjem osnovne otopine.

Provjera valjanosti metode podrazumijeva dodavanje analita poznate koncentracije u realni uzorak. Metoda se sastoji od: mjerenja signala analita iz uzorka, dodavanje poznate koncentracije analita i ponovno mjerenje signala analita. Koncentracija smjese realnog uzorka i odabranog standardna treba odgovarati zbroju pojedinih koncentracija. Uzorci za provjeru valjanosti metode pripravljeni su na sljedeći način:

**Uzorak 1:** 0,5 mL otopine standarda 200 mg/L pomiješalo se s 0,5 mL otopine mobilne faze,

**Uzorak 2:** 0,5 mL otopine realnog uzorka pomiješalo se s 0,5 mL mobilne faze,

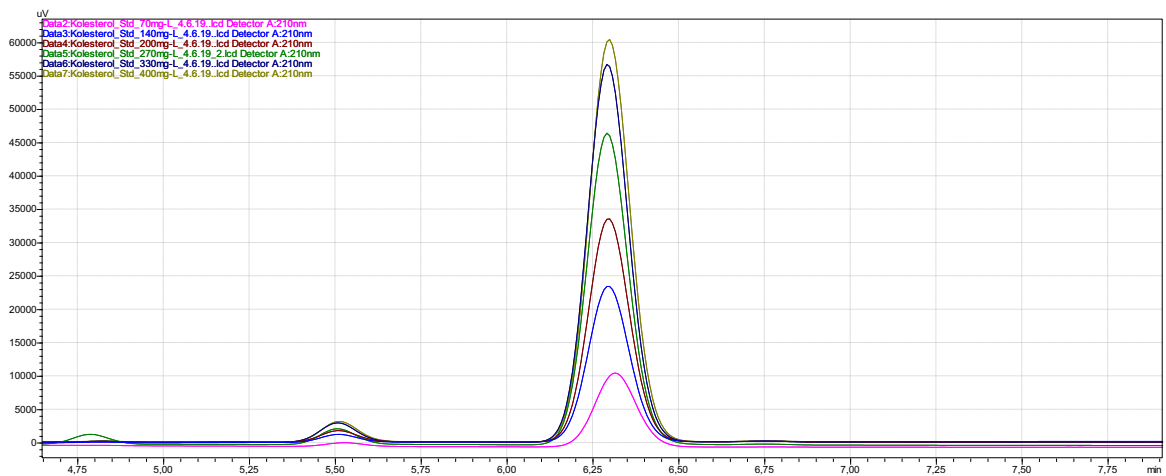
**Uzorak 3:** 0,5 mL otopine standardna 200 mg/L pomiješalo se s 0,5 mL otopine realnog uzorka.

## 5. Rezultati i rasprava

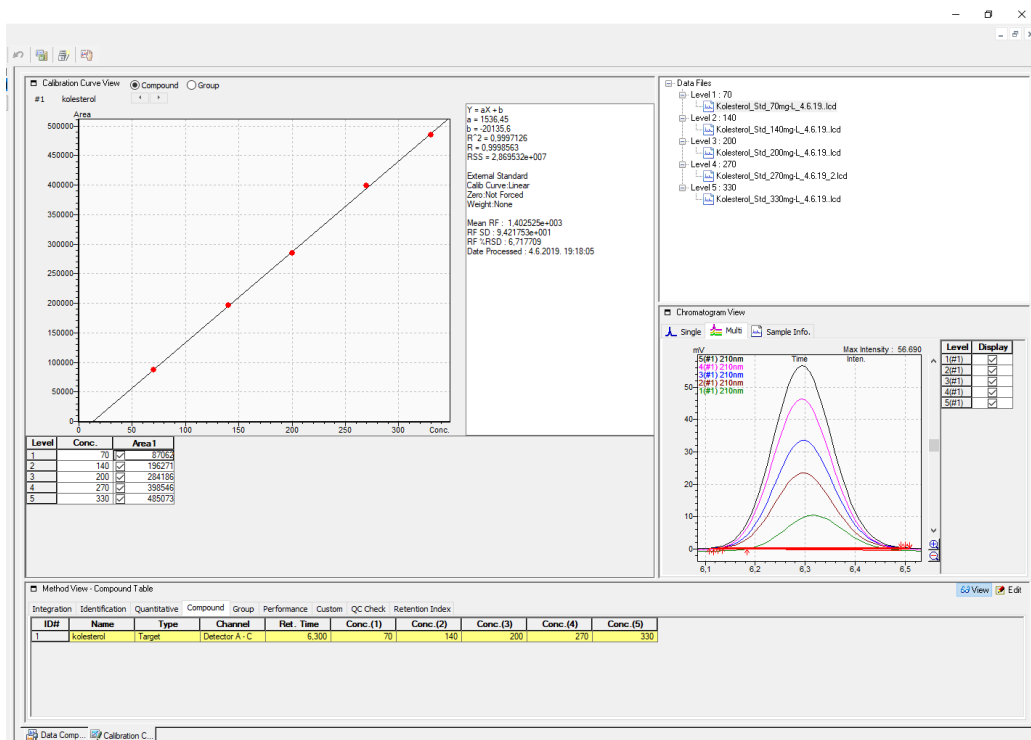
### 5.1. Izrada kalibracijskog pravca

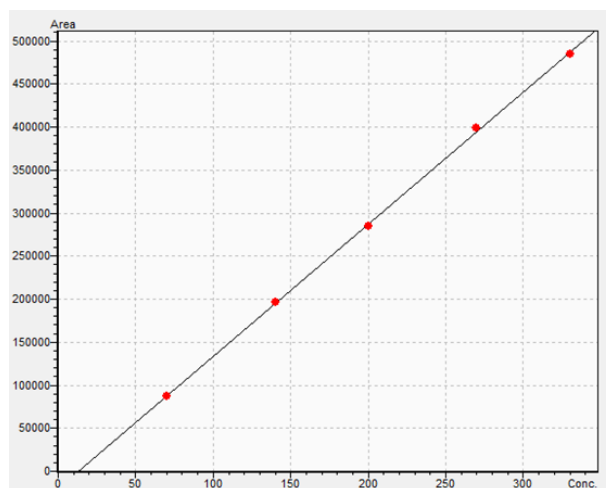
Izrada kalibracijskog pravca započinje snimanjem spektra za 5 standardnih otopina kolesterola koncentracija 70 – 330 mg/L (Sika 23.). Nakon snimanja spektra, korištenjem programa Lab Solution izrađen je kalibracijski pravac i izračunat je koeficijent determinacije  $R^2$  koji je iznosio 0,99971 što je pokazalo dobro slaganje vrijednosti

dobivenih mjerenjem sa regresijskim pravcem, odnosno da je metoda linearna te se može uspješno koristiti za određivanje sadržaja kolesterola (Slika 24.).



**Slika 23.:** Kromatogrami standarda kolesterola 70-400 mg/L

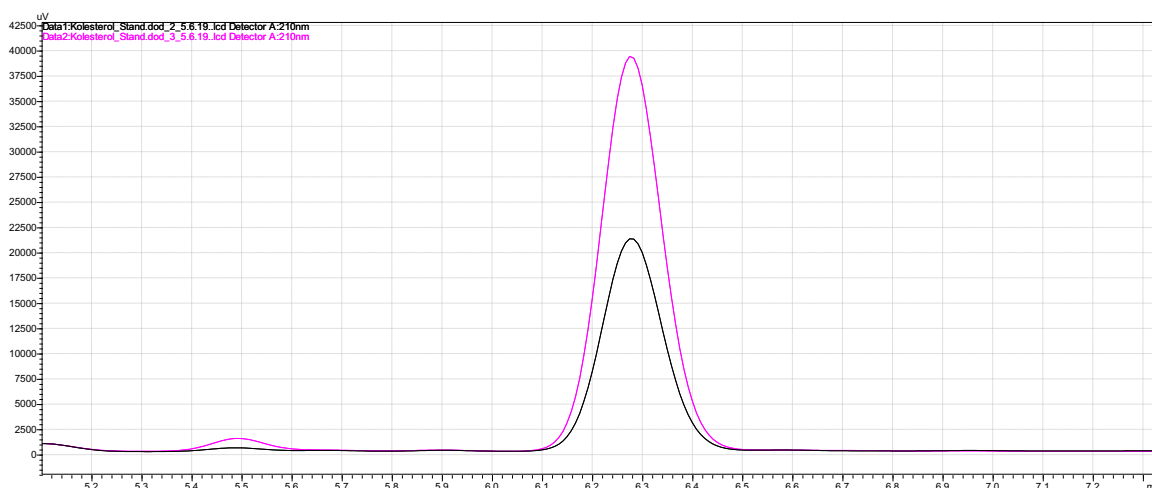




**Slika 24.:** Kalibracijski pravac

## 5.2. Provjera valjanosti metode

Nakon izrade kalibracijskog pravca provjerena je valjanost metode na prethodno opisani način. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 25. i u Tablici 1.



**Slika 25.:** Kromatogram provjere valjanosti metode

**Tablica 1.:** Rezultati dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola za provjeru valjanosti metode

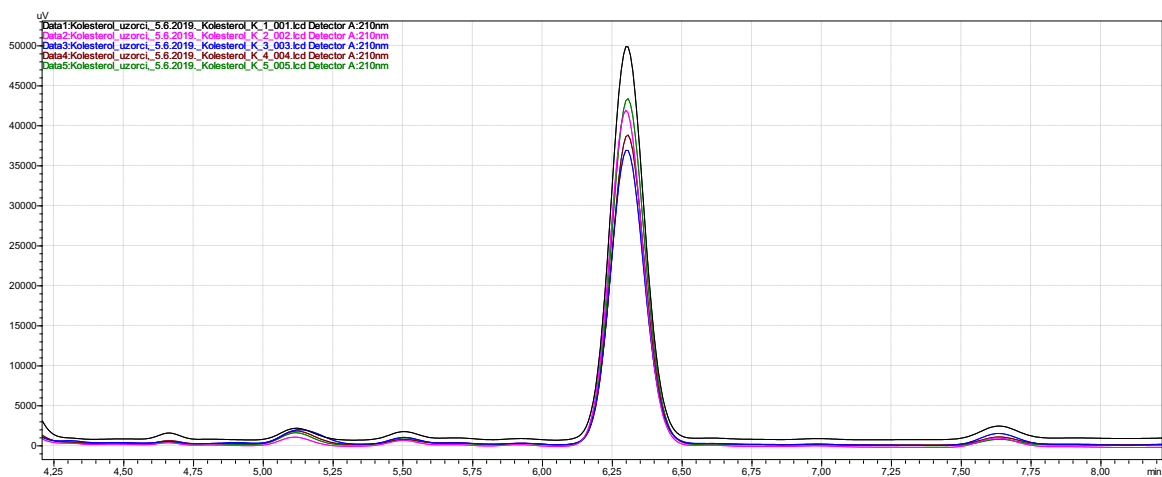
Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	150877	17920	111,30400	445,216
2	174772	20646	126,85600	507,424
3	333607	38840	230,23400	920,936
Teoretski	325649	38566	238,16	952,64
iskorištenje (%)	102,44	100,71	96,67	<b>96,67</b>

Dobivene vrijednosti pokazale su dobro slaganje s očekivanim vrijednostima što je potvrdilo prikladnost metode za određivanje sadržaja kolesterola u realnim uzorcima.

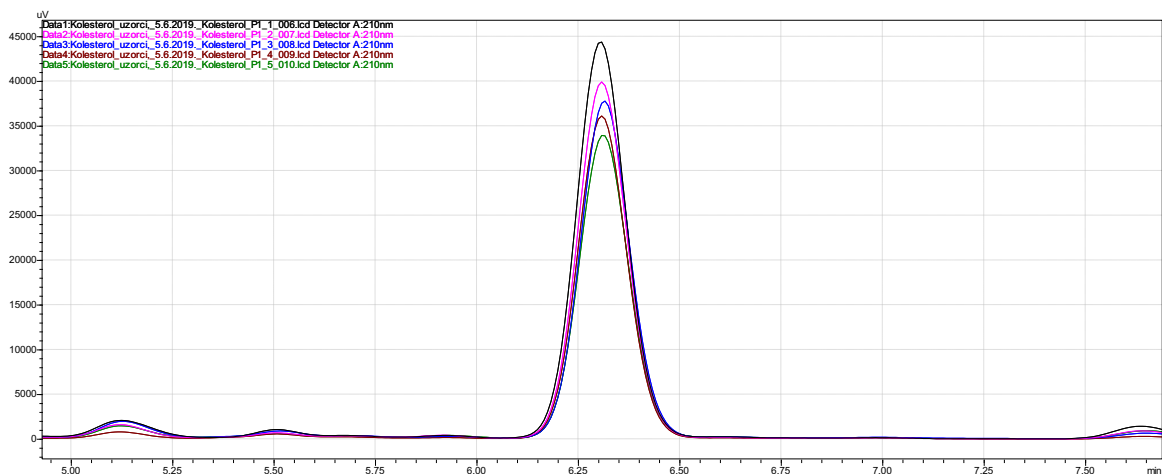
### 5.3. Određivanje sadržaja kolesterola u žumanjcima jaja

Sadržaj kolesterola u žumanjcima jaja određivan je u jajima dva različita proizvođača dostupnih na tržištu. Uzorci su za analizu pripremljeni prema ranije opisanom postupku.

Na slikama 26. i 27. prikazani su dobiveni kromatogrami.



**Slika 26.:** Kromatogram za skupinu 1



**Slika 27.:** Kromatogram za skupinu 2

U Tablici 2. prikazani su sadržaji kolesterola u 2 skupine uzoraka. Sadržaji izraženi u mg/L očitani su s kalibracijskog pravca pomoću računalnog programa Lab Solutions. Uobičajena mjerna jedinica za izražavanje sadržaja kolesterola su miligrami na 100 g žumanjaka, stoga je potrebno očitanoj koncentraciji kolesterola s kalibracijskog pravca izraziti kao miligrame



kolesterola na 100 g žumanjaka. Prema dostupnoj literaturi, prosječni sadržaj kolesterola iznosi oko 1255 mg/100 g žumanjka. [13]

**Tablica 2.:** Sadržaj kolesterola u dvije skupine ispitivanih uzoraka

Uzorak	skupina 1				skupina 2			
	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	421777	48822	287,619	1150,476	380439	44007	260,714	1042,856
2	358818	41744	246,642	986,568	340461	39563	234,695	938,78
3	314660	36449	217,902	871,608	321378	37403	222,274	889,096
4	330172	38412	227,998	911,992	307862	35848	213,477	853,908
5	371447	43090	257,861	1031,444	288579	33533	200,923	803,692
<b>srednja vrij.</b>	359374,80	41703,4	247,604	<b>990,418</b>	327743,80	38070,8	226,417	<b>905,666</b>
<b>SD</b>	41509,94	4770,77	27,267	<b>109,068</b>	35029,28	3982,57	22,800	<b>91,200</b>
<b>RSD (%)</b>	11,55	11,44	11,012	<b>11,012</b>	10,69	10,46	10,070	<b>10,070</b>
<b>CI (±)</b>	36384,40	4181,68	23,900	<b>95,600</b>	30703,95	3490,82	19,985	<b>79,939</b>

Standardna pogreška (standardna devijacija, SD) otkriva preciznosti mjerenja. Što je SD manja, preciznost je veća. Dobivena vrijednost za obje analizirane skupine ukazuje na relativnu sličnost između izmjerenih koncentracija unutar skupine. Relativna standardna pogreška (relativna standardna devijacija, RSD), opisuje preciznost metode unutar skupine, poželjna je što manja vrijednost (obično do 5%) no zbog prirode uzorka dobivene vrijednosti za obje skupine se smatraju prihvatljivima. Interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*, CI), interval vrijednosti unutar kojeg se nalaze vrijednosti u skupini.

Prosječne vrijednosti kolesterola koje su izražene u mg/100 g žumanjaka su u obje skupine uzoraka oko 300 mg manje od literaturnih podataka. U skupini 1, uzorak 3 ima najmanji postotak udjela kolesterola, a uzorak 1 najveći. Iako uzorak 1 ima najveći udio kolesterola od svih uzoraka u skupini, on i dalje ima manji udio kolesterola od literaturnih podataka za oko 100 mg. Prosječna vrijednost udjela kolesterola u skupini 2 je nešto manja nego u skupini 1. Uzorak broj 5 ima najnižu vrijednost kolesterola, tek nešto više od 800 mg/100 g žumanjka. Uzorak 1 s najvećom vrijednosti kolesterola također kao i u prethodnoj skupini ima i dalje manji udio od literaturnih podataka.

Iz dobivenih rezultata zaključujemo da ispitivana jaja imaju manji udio kolesterola od prosječnog literaturnog. Također, unutar svake skupine razlika u udjelu kolesterola iznosi 200 – 300 mg što je posljedica prirode uzorka, odnosno metabolizma svake nesilice.

## 6. Zaključak

Kolesterol je jedan od esencijalnih lipida neophodan za život jer mijenja fluidnost životinjskim staničnim membrana te je preteča mnogim steroidnim hormonima. Postoje „dobar“ i „loš“ kolesterol. Višak „lošeg“ kolesterola taloži se u arterijama što je jedan od uzročnika sve češćih kardiovaskularnih bolesti. „Dobar“ kolesterol prenosi višak lošeg kolesterola u jetru gdje se sintetiziraju steroidni hormoni.

Uz to što se u organizam unosi hranom, kolesterol se i stvara u organizmu (biosinteza kolesterola). Stoga se hranu bogatu kolesterolom treba unositi u ograničenim količinama kako ne bi došlo do prevelike koncentracije kolesterola u organizmu.

U ovom radu se određivao sadržaj kolesterola u uzorcima žumanjka jajeta tekućinskom kromatografijom vrlo visoke razlučivosti (UPLC). UPLC je brza, precizna metoda kromatografije koja koristi visoke radne tlakove.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da ispitivani uzorci imaju slične prosječne vrijednosti sadržaja kolesterola koji je nešto manji od literaturnih podataka. Iako uzorci u svakoj skupini potječu od skupine nesilica koje su tretirane na isti način, dolazi do odstupanja zbog nemogućnost 100%-tno iste ishrane i metabolizma svake nesilice.

## 7. Literatura

1. Dubravka Čvorišćec, Ivana Čepelak, *Štrausova medicinska biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2006.
2. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
3. Albuquerque, T.G., Oliveira, M.P.P., Sanches-Silva, A., Costa, H.S., *Cholesterol determination in foods: comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography*, Food Chemistry (2014.)
4. <https://javno-zdravlje.hr/poviseni-kolesterol/> (29.7.2019.)
5. Daniel C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 2007.
6. Boris Neseck, *Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2004.
7. [https://www.google.com/search?rlz=1C1CHBH\\_hrHR713HR713&biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=PKk9XYmWBeStgwfZ4LKIBw&q=teku%C4%87inska+kromatografija+visoke+djelotvornosti&oq=teku%C4%87inska&gs\\_l=img.3.1.0i24i4.3733.6330..8040...0.0..0.132.1003.8j2.....0....1..gws-wiz-img.....35i39j0i67.jZavA6mJB40#imgrc=bXaDX2bK\\_Bw0M](https://www.google.com/search?rlz=1C1CHBH_hrHR713HR713&biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=PKk9XYmWBeStgwfZ4LKIBw&q=teku%C4%87inska+kromatografija+visoke+djelotvornosti&oq=teku%C4%87inska&gs_l=img.3.1.0i24i4.3733.6330..8040...0.0..0.132.1003.8j2.....0....1..gws-wiz-img.....35i39j0i67.jZavA6mJB40#imgrc=bXaDX2bK_Bw0M): (29.7.2019.)
8. Hayder Obayes Hashim, *Chromatography and HPLC principles*, 2018.
9. <https://www.pharmaguideline.com/2018/04/differences-between-hplc-and-uplc.html> (29.7.2019.)
10. A. J. M. Horvat, K. Margeta, *Instrumentalna analiza*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2009.
11. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kalibracija> (31.7.2019.)
12. <http://struna.ihjj.hr/naziv/metoda-dodatka-standarda/34363/> (31.7.2019.)
13. Mark Roe, Hannah Pinchen, Susan Church, Paul Finglas, *Nutrient analysis of eggs*, Department of Health, 2013.