

Sveučilište J. J. Strossmayera u  
Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Denis Borščak

Peroksidikacija lipida: metode mjerenja

Završni rad

Mentor:

Doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2018.

## **SAŽETAK:**

Lipidi su prirodni spojevi koji su topivi u organskim otapalima i pripadaju u skupinu estera. Grade ih zasićene ili nezasićene prirodne masne kiseline koje se sastoje od dugačkog ugljikovodičnog lanca koji sadrži paran broj ugljikovih atoma od  $C_{14}$  do  $C_{24}$ . Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) i monozasićene masne kiseline imaju cis-konfiguraciju dvostruke veze. Složeni lipidi su fosfolipidi i sfingolipidi koji sadrže šećere, dušične baze, alkohole i dugolančane masne kiseline. Lipidna peroksidacija je spontani proces koji uzrokuje hidroksilni radikal (OH) i sastoji se od tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. Produkti lipidne peroksidacije nisu stabilni i uzrokuju različite biološke efekte. Fe(II) ion je najznačajniji inicijator peroksidacije koja se odvija mehanizmom slobodnih radikala. Procesi oksidacije lipida prate se različitim metodama i mjernim tehnikama. Spektrofotometrijsko mjerenje konjugiranih UV diena jedna je od izravnih metoda određivanja hidroperoksida. Feritiocijanatna metoda je metoda kojom se određuju hidroperoksidi lipida. Specifične funkcionalne skupine i geometrijska izomerizacija masnih kiselina može se odrediti IR spektroskopijom. Lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte: aldehide, ugljikovodike, ketone, epokside i aktivne radikale pod djelovanjem iona bakra ili željeza.

**Ključne riječi:** peroksidacija, lipidi, masne kiseline, oksidacija, izomerizacija

## **ABSTRACT:**

Lipids are natural compounds which are soluble in organic solvents and they are esters. Lipids are made of saturated or unsaturated natural fatty acids which are made of long hydrocarbon chain with even number of carbon atoms ( $C_{14} - C_{24}$ ). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and monosaturated fatty acids have cis-configuration of double bond. Complex lipids are phospholipids and sphingolipids made of sugar, nitrogen base, alcohol and long chains of fatty acids. Lipid peroxidation is spontaneous process caused by  $OH^\cdot$  radical. It consists of three steps: initiation, propagation and termination. Lipid peroxidation products are not stable and cause different biological effects. Fe(II) ion is most important initiator of peroxidation which is made by free radical mechanism. Processes of lipid oxidation are being studied with different methods and measurement techniques. Spectrophotometric measurement of conjugated UV dienes is one of direct methods for hydroperoxides determination. The ferricthiocyanate method is method for estimation of lipid hydroperoxides. Specific functional groups and geometrical isomerization of fatty acids can be determined with IR spectroscopy. Lipid peroxides, under the influence of copper and iron ions, create many products: aldehydes, hydrocarbons, ketones, epoxides and active radicals.

**Key words:** peroxidation, lipids, fatty acids, oxidation, isomerization

## **SADRŽAJ:**

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD   | 1  |
| 2. KEMIJSKA I FIZIKALNA SVOJSTVA LIPIDA                           | 4  |
| 3. MEHANIZMI LIPIDNE PEROKSIDACIJE                                | 6  |
| 3.1. Inicijacija peroksidacije lipida ionizirajućim zračenjem     | 7  |
| 3.2. Peroksidacija lipida radikalskim mehanizmom                  | 8  |
| 3.3. Uloga prijelaznih metala u procesu peroksidacije lipida      | 12 |
| 4. PRODUKTI LIPIDNE PEROKSIDACIJE I NJEZINE POSLJEDICE            | 13 |
| 5. METODE ODREĐIVANJA LIPIDNIH HIDROPEROKSIDA                     | 14 |
| 5.1. Spektrofotometrijske metode                                  | 14 |
| 5.1.1. Metoda određivanja konjugiranih diena                      | 14 |
| 5.1.2. Feritiocijanatna metoda                                    | 15 |
| 5.1.3. Kromatografske i spektroskopske metode                     | 16 |
| 6. ANALITIČKE METODE ODRĐIVANJA TRANS NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA | 17 |
| 6.1. Plinska kromatografija                                       | 17 |
| 6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti              | 18 |
| 6.3. Spektroskopske metode  | 18 |
| 7. ZAKLJUČAK  | 20 |
| 8. LITERATURA   | 21 |



## 1. UVOD

Lipidi su biološki važni spojevi koji se pomoću nepolarnih otapala mogu ekstrahirati iz stanica i tkiva. Naziv lipidi dolaze od grčke riječi *lipos* što u prijevodu znači mast. Oni su netopivi u vodi, ali su dobro topivi u organskim otapalima poput acetona, toplog alkohola ili kloroforma. Bez zajedničkih kemijskih i strukturalnih svojstva imaju neobičnu klasifikaciju. Imaju ulogu skladištenja energije, prijenosa signala između stanica i izgrađuju stanične membrane. U lipide spadaju masti i ulja, fosfolipidi, steroidi i voskovi. Lipidi mogu nastati reakcijom masne kiseline i alkohola ili masne kiseline i amina. Mogu se podijeliti u nekoliko skupina: prema kemijskom sastavu, prema složenosti, prema podrijetlu, na derivate lipida i prema ulozi. Prema kemijskom sastavu dijele se na osapunjive i neosapunjive, prema složenosti na jednostavne i složene, prema podrijetlu na biljne i životinjske, a prema ulozi dijele se na strukturne, regulatorne i rezerve energije. Najrašireniji lipidi u živim stanicama su derivati glicerola. Ako se masti zagrijavaju u prisutnosti lužina (NaOH ili KOH) dolazi do saponifikacije. U procesu saponifikacije masti se razgrađuju na glicerol i masne kiseline. [1]

Masti i ulja su triesteri alkohola glicerola odnosno triacilgliceroli te su najčešći glicerolski lipidi. Masti i ulja nastaju od suviška ugljikohidrata pa su glavna skladišta energije u živim organizmima. Masti su pri sobnoj temperaturi u krutom agregacijskom stanju dok su ulja u tekućem stanju. U mastima prevladavaju zasićene masne kiseline poput palmitinske ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) ili stearinske ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) kiseline dok su u uljima nezasićene više masne kiseline poput oleinske ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) koje su vezane za alkohol glicerol. [1]

Lipidi spadaju u spojeve koji se nazivaju esteri. Lipidi su zapravo esteri masnih kiselina i trovalentnog alkohola glicerola. Alkohol glicerol ima tri hidroksilne skupine, a ako se jedna zamjeni masnom kiselinom nastaju monogliceridi, ako se zamjene dvije hidroksilne skupine nastaju digliceridi, a ako se zamjene sve tri hidroksilne skupine s tri masne kiseline nastaju trigliceridi.

Masne kiseline u živim stanicama obično imaju paran broj ugljikovih atoma, obično između 14 i 24. Najuobičajenije su one sa 16 ili 18 ugljikovih atoma. Hidrolizom lipida nastaju zasićene i nezasićene masne kiseline koje su jedne od najzastupljenijih kiselina u prirodi. One sadrže dugački lanac s parnim brojem ugljikovih atoma. Alkalni lanci kod masnih kiselina mogu biti zasićeni ili mogu sadržavati po jednu ili više dvostrukih veza. U većini slučajeva nezasićene masne kiseline imaju cis konfiguraciju. Svojstva masnih

kiselina uvelike ovise o duljini lanca i o stupnju nezasićenosti. Zasićene masne kiseline imaju puno veće talište od nezasićenih masnih kiselina s jednakim brojem ugljikovih atoma. Također i duljina lanca utječe na talište masnih kiselina, što je lanac duži veće je i njezino talište. Kratki lanci i nezasićenost povećavaju fluidnost masnih kiselina. Uvođenjem vodika u nezasićene masne kiseline procesom hidrogenizacije nezasićene masne kiseline prelaze u zasićene s izmijenjenim mirisom i okusom. [2]

Složeni lipidi su po kemijskom sastavu esteri koji sadrže alkohol i dugolančane masne kiseline kao i svi ostali lipidi, ali se razlikuju po tome jer oni još dodatno u svojoj strukturi imaju fosfor, dušične baze ili šećere. U složene lipide spadaju fosfolipidi i sfingolipidi.

Fosfolipidi spadaju u glavnu skupinu membranskih lipida. Molekula fosfolipida sastoji se od platforme na koju se donosi jedna ili više masnih kiselina i fosfata na koji je vezan alkohol. Kolesterol je steroidni lipid čija se struktura razlikuje od fosfolipida. On se sastoji od četiri furanozna ugljikovodična prstena. Na jednom je kraju vezan lanac ugljikovodika dok je na drugome vezana hidroksilna skupina. Kolesterol je prisutan skoro u svim membranama životinja, ali u različitom stupnju dok ga kod bakterija nema. On čini gotovo 25 % svih membranskih stanica i utječe na fluidnost životinjskih staničnih membrana. [2]

Lipidi su baza za različite reaktivne kisikove vrste (ROS), sumporove vrste (RSS) i dušične vrste (RNS). Lipidi u čiji sastav ulaze više nezasićene masne kiseline (PUFA) podložni su oksidaciji u normalnim uvjetima samo ako ima dostupnog molekulskog kisika. Za njih je pokazano da je ta oksidacija štetna, a u nekim slučajevima čak i smrtonosna. Lipidna peroksidacija je proces u kojem se odvijaju reakcije vezanja kisika s PUFA. Kada se počela proučavati peroksidacija lipida u 20. stoljeću dokazano je da autooksidacija lipidnih dijelova u hrani dovodi do propadanja te hrane. Također slobodni radikali su povezani s procesima starenja i počecima stvaranja različitih teških bolesti, pa se iz tog razloga povećao i interes njihovog istraživanja. Istraživanja se vrše u kemiji, biokemiji, medicini, farmakologiji i biologiji. [3]

Kako se razvijala biokemija povećala se i želja za otkrivanjem reaktivnosti slobodnih radikala koji u svojem sastavu imaju višenezasićene masne kiseline i samim time je došlo do povećavanja procesa peroksidacije lipida. Sve do 60-tih godina prošlog stoljeća procesi cis i trans izomerizacije dvostruke veze s PUFA u vodenim medijima nisu

bili proučavani. Kasnija istraživanja dokazala su trajne promjene strukture, a samim time i funkcije u obliku propusnosti i fluidnosti staničnih membrana. [3]

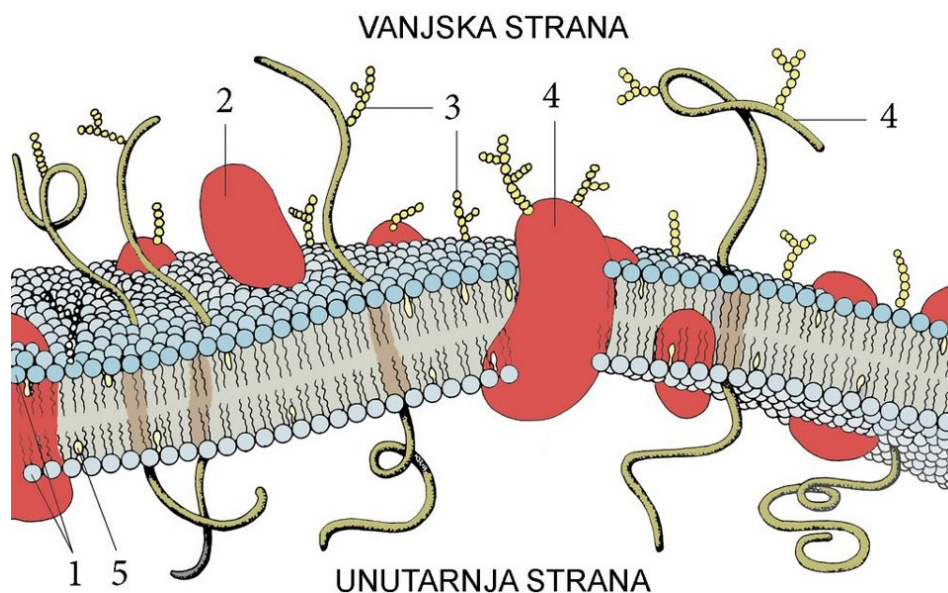
Sve do danas nije se otkrila poveznica između lipidne peroksidacije i izomerizacije koja dovodi do loših i neprihvatljivih posljedica za ljudski organizam. Ti mehanizmi predstavljaju znanstveni izazov u istraživanjima koja se mogu izvesti primjenom načela i principa radijacijske kemije. Ako se dogodi reakcija na vezama masnih kiselina, ona dovodi do stvaranja peroksida koji mogu ulaziti u daljnje reakcije s različitim masnim kiselinama. Najteža posljedica lipidne peroksidacije je stvaranje malondialdehida, MDA i 4-hidroksinonenala s prooksidativnim svojstvima. [3]



## 2. KEMIJSKA I FIZIKALNA SVOJSTVA LIPIDA

Višestruko nezasićene masne kiseline su puno reaktivnije od zasićenih masnih kiselina. Kako se povećava broj dvostrukih veza kod nezasićenih masnih kiselina tako se povećava i vjerojatnost njihove oksidacije pomoću kisika. Fizikalna svojstva masnih kiselina razlikuju se i ovise o nekoliko faktora kao što su dužina lanca ili razgranatost lanca te stupnju njihove zasićenosti. Točka tališta nezasićenih masnih kiselina je manja od one za zasićene masne kiseline samo ako im se lanac sastoji od istog broja ugljikovih atoma. Kako se povećava nezasićenost, a smanjuje se duljina ugljikovodičnog lanca povećava se žitkost višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Biološke membrane su granice između stanica. One dijele ono što se nalazi u stanici od onoga izvan nje. Biološke membrane se razlikuju po svojoj strukturi, ali i po svojoj funkciji. Lipidi i proteini glavne su sastavnice membrana. Membranski lipidi su male molekule koje se sastoje od hidrofobnih i hidrofilnih dijelova. U membrani postoje specifični proteini kao što su crpke, kanali, receptori i enzimi koji obavljaju razne funkcije. Membrane su asimetrične strukture gdje se unutrašnja i vanjska strana razlikuju (slika 1). One također ne dopuštaju lipidima i proteinima da prođu na drugu stranu. [2]



Slika 1. Izgled stanične membrane (1-lipidni dvosloj, 2-periferni protein, 3-oligosaharid, 4-transmembranski protein, 5-kolesterol)

Promjena strukture masnih kiselina dovodi do promjene svojstava i funkcije membrane koju te masne kiseline grade. Fosfolipidi su građeni od višestruko nezasićenih masnih kiselina i monozasićenih masnih kiselina, a te masne kiseline utječu na uređenost membrane tako što ju smanjuju. Kod zasićenih masnih kiselina moguća je rotacija oko jednostruke ugljik-ugljik veze, a uređenost strukture povećava se pomoću nerazgranatog lanca ugljikovih atoma. Ako se u strukturi pojavi veza Z konfiguracije, ona utječe na zakrivljenost lanca ugljikovih atoma i smanjuje njegov rigidni oblik. Monozasićene masne kiseline su odgovorne za najbolju fluidnost membrana, a ta fluidnost se postiže na idealnim temperaturama za sve organizme. Kada se uvodi prva dvostruka veza ona drastično utječe na temperaturu pri kojoj membrane prelaze iz čvrstog agregatnog stanja u neuređeno tekuće agregatno stanje. Druga dvostruka veza smanjuje temperaturu prijelaza između ta dva agregatna stanja, a svaka daljnja dvostruka veza ne utječe na temperaturu pa samim time ni na fluidnost membrane. Višestruko nezasićene masne kiseline koje imaju puno dvostrukih veza utječu na neka svojstva membrana kao što je njihova propusnost. Propusnost se može objasniti ne tako gustom pojavom višestruko nezasićenih masnih kiselina u sloju membrana. Višestruko nezasićene masne kiseline imaju u svojem sastavu acilne lance koju imaju veliku konformacijsku fleksibilnost. Ti acilni lanci imaju mogućnost vrlo brzog prelaska iz jednog konformacijskog stanja u drugo stanje, a taj prijelaz je nužan za pravilno funkcioniranje proteina. [3]

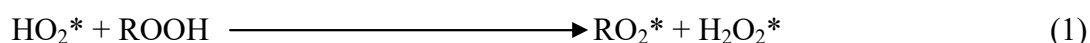
### 3. MEHANIZAM LIPIDNE PEROKSIDACIJE

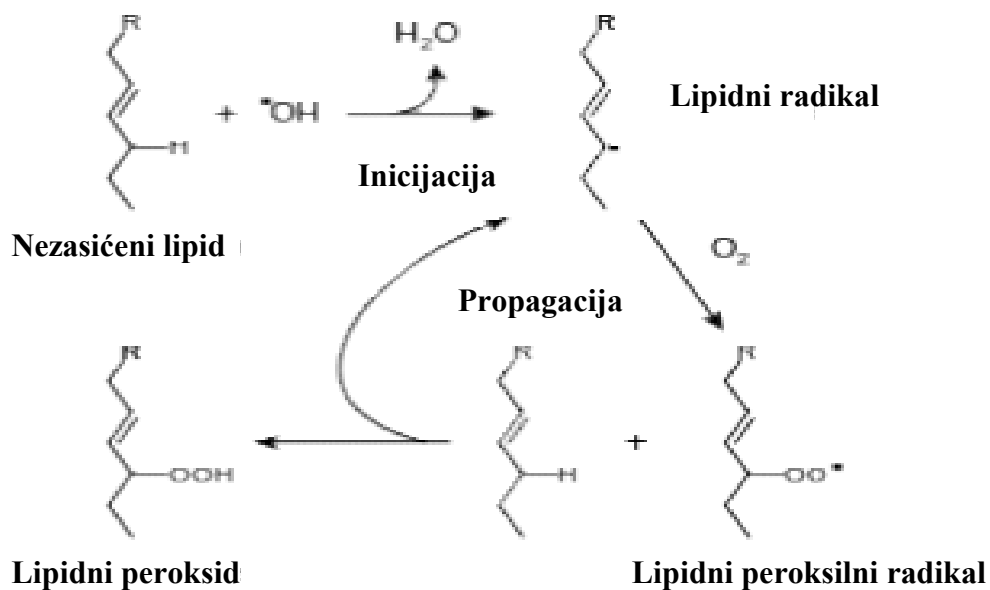
Višestruko nezasićene masne kiseline aktivnije djeluju na zasićene masne kiseline i masne kiseline koje u svojem sastavu imaju samo jednu dvostruku vezu, dok na spomenute masne kiseline blaži utjecaj imaju reaktivne kisikove vrste. To se može vidjeti iz primjera da linolna kiselina ima mnogo manju sposobnost oksidacije od dokozaheksaenske kiseline.

Peroksidacija lipida (slika 2) najčešće je posljedica djelovanja hidroksilnog radikala, ali i većina drugih radikala također može uzrokovati peroksidaciju. Peroksidacija lipida odvija se u 3 koraka: prvo se odvija inicijacija, zatim propagacija i na kraju terminacija. Lipidna peroksidacija se može odvijati samo slobodno radikalskim mehanizmom kojim se zaobilazi spinska zabranjenost. Spinska zabranjenost javlja se zbog nemogućnosti reakcije između kisika i višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Peroksidacija započinje tako da reaktivne kisikove vrste napadaju lipide, a reaktivne kisikove vrste iz CH<sub>2</sub> skupine izdvajaju vodik. Na taj način se iz višestruko nezasićenih masnih kiselina dobivaju slobodni radikali. Višestruko nezasićene masne kiseline mogu oksidirati OH\*, HO<sub>2</sub>\*, RO\*, RO<sub>2</sub>\*, dok O\* nije dosta reaktivan da bi eliminirao vodik. Vodik će se lakše prenositi ako ima dvostrukih veza u masnim kiselinama koje čine slabijim ugljik-vodik veze na ugljikovom atomu u blizini dvostruke veze. Radikali ugljika se reorganiziraju tako da tvore diene i samim time povećaju svoju stabilnost. Dobiveni radikali mogu izbaciti vodikov radikal iz višestruko nezasićenih masnih kiselina što dovodi do nastajanja lipidnih hidroperoksida i radikala ugljika koji su izrazito reaktivni. U procesu propagacije nastaje LO\* i LOO\* disocijacijom LOOH uz pomoć željeza (L-alkilni radikal). Važni katalizatori za reakcije lipidne peroksidacije su hemska i nehemska željezo. Kada LOOH-a disocira nastaju aldehidi i ugljikovodici koji su konačni spojevi koji nastaju u peroksidaciji lipida.

Zbog svojeg negativnog naboja superoksidni radikal ne može ulaziti u unutrašnjost membrana i ne može reagirati u reakcijama peroksidacije lipida. Nasuprot tome hidroperoksilni radikal OH<sub>2</sub>\* sudjeluje u stvaranju peroksilnih radikala u procesima peroksidacije zbog svoje izuzetne reaktivnosti. [4]





Slika 2: Proces peroksidacije lipida

### 3.1. Inicijacija peroksidacije lipida ionizirajućim zračenjem

Djelovanjem različitih oblika zračenja koja imaju određene kemijske učinke dobivaju se određeni spojevi u određenoj koncentraciji, a sve se to događa zato što se spojevi razlikuju u svojoj prostornoj raspodjeli kada su ozračeni. U plinovima je nešto drugačije jer različiti oblici zračenja daju skoro identične spojeve. Kod tekućina su nastali spojevi zatočeni u nekoj vrsti rešetke otapala, a samim time se povećava mogućnost sudara njihovih molekula.

U radijacijskoj kemiji djeluje se velikim količinama zračenja čije energije premašuju energije ionizacije molekula. Samim time konačni rezultat je ionizacija sredine u kojoj se one nalaze. Kada se elektroni ioniziraju oni bivaju izbačeni. Elektroni se nakon prve ionizacije mogu i dalje ionizirati duž traga svoje putanje, a produkti koji nastaju se nehomogeno raspoređuju duž traga te putanje. Radijacijska kemija ima mnogo specifičnosti, a gotovo sve te specifičnosti dolaze od ionskog karaktera produkata, njihove velike energije i koncentracije na početku reakcija.

Kao važna metoda generiranja reaktivnih vrsta je djelovanje ionizirajućeg zračenja na vodene otopine. Ionizacija molekula vode je rezultat djelovanja ionizirajućeg zračenja

na razrijeđene vodene otopine. Iz tih ioniziranih molekula vode dobivaju se radikali i druge molekulske vrste, a to je posljedica nekoliko vrsta reakcija kao što su: disocijacijske reakcije i ion-molekulske reakcije. Kada se energija ionizirajućeg zračenja apsorbira i predaje s neke tvari, veličina kemijskih promjena proporcionalna je energiji zračenja.

$$G(X) = n(X)/E \quad (2)$$

$G(X)$  predstavlja radiacijsko-kemijski prinos,  $n(X)$  množinu tvari, a  $E$  energiju od 1 Joula. Radijacijsko kemijski prinos ima mjernu jedinicu mol  $J^{-1}$ . Radioliza vode se odvija veoma brzo. Primarne vrste koje nastaju su reducirajuće, a to su  $H^*$  i  $e^-$ , a  $OH^*$  je oksidirajuća vrsta. Primarni radikali koji nastaju radiolizom vode mogu se prevesti u nove radikale samo ako se koriste aditivi ili otopljeni plinovi. Oksidacijske promjene koje su potaknute ionizirajućim zračenjem ovise o brzini i njegovoj dozi, ali i drugim čimbenicima. To su oksidacijski čimbenici poput sastava lipida, koncentracije  $O_2$ , svijetla ili temperature. Postoje dva oblika zračenja, direktno i indirektno zračenje. Djelovanjem oba oblika zračenja na lipide dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji u reakciji s kisikom daju hidroperokside. [3]

### 3.2. Peroksidacija lipida radikalskim mehanizmom

Atmosfera zemlje sastoji se od 21% kisika, a život u takvim uvjetima ima svoje prednosti i mane. Prednost je ta što se kod aerobnih organizama oslobađa veća količina energije koja je potrebna za neki rad. Jedna od mana je oksidacija organskih spojeva pa samim time i lipida. Promotorsko djelovanje kisika na reakcije radikala je uzrok njegova toksičnog djelovanja. Reakcija lipida i kisika ne događa se zbog visoke energije aktivacije ( $150-270\text{kJmol}^{-1}$ ) već zbog elektronske konfiguracije molekule kisika. [5]



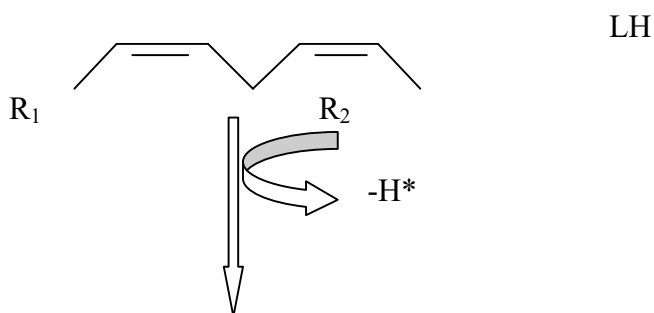
Vrste koje imaju nespareni elektron u posljednjoj orbitali nazivaju se slobodnim radikalima. Kisik u svojem osnovnom stanju ima 16 elektrona u molekularnim orbitalama pri čemu se u protuveznoj orbitali mogu naći dva nesparena elektrona koja imaju paralelne spinove. Prema tome kisik je samim time radikal. Paralelni spinovi sprječavaju izravnu reakciju između kisika i molekula ili atoma koji sadrže elektrone sparenih spinova jer bi tom reakcijom došlo do narušavanja načela o očuvanju spinova. Da bi se to spriječilo

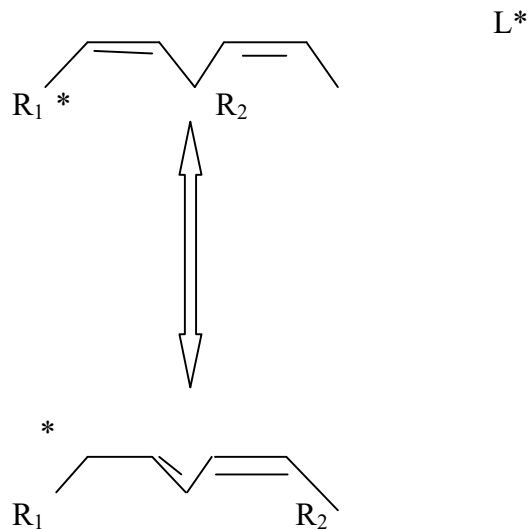
potrebno je promijeniti jedan spin čime se izbjegava smještanje dvaju paralelnih spinova u istu orbitalu. To je veoma dug proces u odnosu na vrijeme života prijelaznog stanja pa se samim time smanjuje reaktivnost kisika. Reaktivni singleti kisika nastaju pri određenom iznosu apsorbirane energije koja je potrebna za inverziju spina u orbitalama.

Kisik raspolaže nesparenim elektronom radikala pa je izrazito reaktivan s radikalskim česticama. Spinsko ograničenje se može savladati i u reakcijama kisika s prelaznim metalima jer oni imaju sposobnost davanja ili primanja elektrona. Reakcija između lipida i kisika je termodinamički nevjerovatna zbog narušavanja spinskih zakona i načela o održavanju energije.

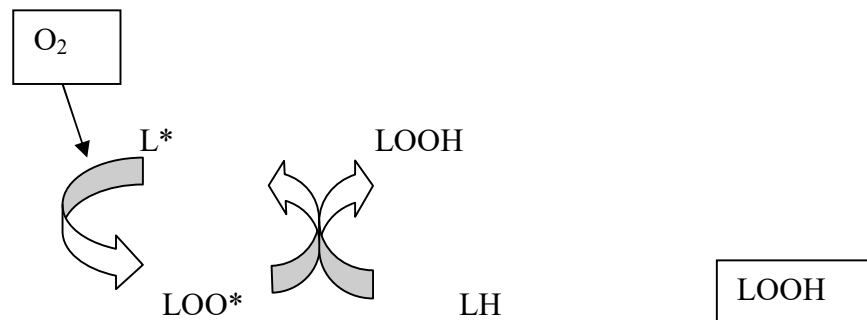
Peroksidacija lipida mehanizmom lančanih reakcija radikala odvija se u tri koraka i spontana je. Tri faze tog procesa su: inicijacija, propagacija i terminacija (shema 1). Nekoliko čimbenika kao što su svjetlost, toplina i ionizirajuće zračenje mogu djelovati na početak reakcije. Bis alilni radikal  $L^*$  nastaje u reakciji vodika s nekim od reaktivnih inicijatora i ta je reakcija početak faze inicijacije. Lakše uklanjanje vodikova atoma događa se u nezasićenim masnim kiselinama zato što dvostruka veza na susjednim ugljikovim atomima prema metilenskoj skupini slabi C-H vezu. Nezasićene masne kiseline specifične su zbog homolitičkog cijepanja C-H veze, a to se događa zbog toga što se  $-CH_2-$  skupina nalazi između dvije dvostruke veze alifatskog lanca. Molekula kisika lako reagira s konjugiranim dienom  $L^*$  koji nastaje iz alil-radikala. Peroksilni radikal  $LOO^*$  nastaje u fazi propagacije kada se molekula kisika adira na radikal  $L^*$ . Apstrakcijom vodikova atoma na peroksilni radikal  $LOO^*$  dobije se lipidni hidroperoksid  $LOOH$  i novi alkilni radikal  $L^*$  koji tada može nastaviti lančane reakcije. Brzina reakcije  $L^*$  s  $O_2$  difuzijski je kontrolirana.

Inicijacija I:

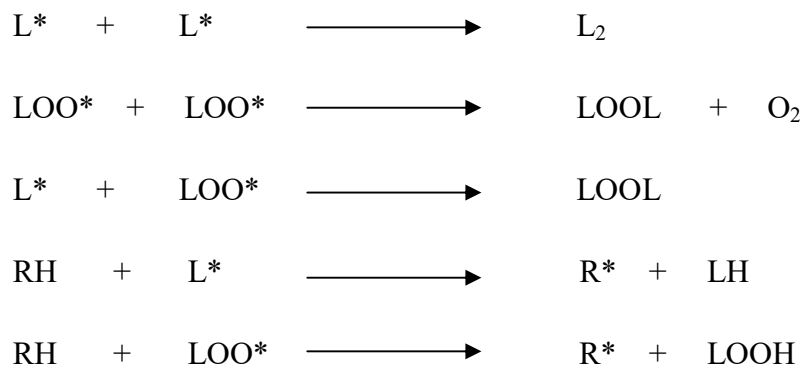




Propagacija:



Terminacija:



Shema 1. Peroksidacija lipida mehanizmom slobodnih radikala

Dovoljna količina lipidnih hidroperoksida dobiva se iz male količine slobodnih radikala u inicijacijskoj fazi samo ako ima dovoljno kisika i raspoloživih neoksidiranih lipida. Donori vodikovih atoma utječu na koncentraciju nastalih lipidnih hidroperoksida.

U razrijeđenim otopinama, kod niskih temperatura i bez prisutnosti katalizatora lipidni hidroperoksidi su stabilni spojevi. Kada se u reakciji nađe katalizator dolazi do homolitičke razgradnje lipidnog hidroperoksida na dva radikala:

### Inicijacija II:



### Propagacija:



Kada u koraku terminacije nastaju neradikalni produkti dolazi do prestanka lančane reakcije u kojoj se stvaraju slobodni radikali.

Struktura lipida, oksidansi ili antioksidansi mogu utjecati na sve tri faze peroksidacije lipida (inicijacija, propagacija, terminacija).

Produkti koji nastaju u reakcijama peroksidacije lipida su nestabilni i mogu reagirati u sekundarnim reakcijama s proteinima ili s bazama koje čine molekule DNA. Aldehidi su toksični produkti peroksidacije lipida i služe kao signalizirajuće molekule za oksidacijski stres. Razni biološki efekti su rezultat produkata lipidne peroksidacije. Do upala u stanicama i gubitka funkcije s modifikacijom lipoproteina dolazi zbog promjena u kemijskom sastavu i strukturi staničnih membrana. Otpornost stanice na oksidacijski stres uzrokovana je malim koncentracijama produkata lipidne peroksidacije koji aktiviraju zaštitne signalne puteve unutar stanice. Produkti koji nastaju peroksidacijom lipida imaju dvojaku ulogu na koju utječe njihova koncentracija koja određuje utjecaj na organizme. [3]



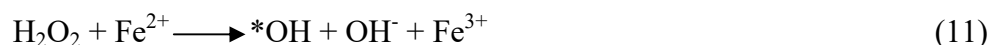
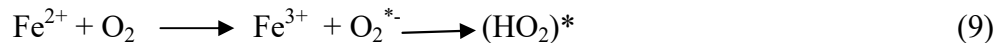
### 3.3. Uloga prijelaznih metala u procesu peroksidacije lipida

3-d orbitale prijelaznih metala su nepopunjene ili djelomično popunjene negativno nabijenim česticama tj. elektronima. Ti metali mogu davati ili primati elektrone zbog specifične elektronske konfiguracije, ali svi ti prijelazi moraju zadovoljavati Hundovo pravilo.

Fe (II) ion najčešće je korišten za istraživanje oksidacije nezasićenih lipida. On je također i biološki inicijator peroksidacije slobodno radikalskim mehanizmom. Brzina induciranja i kataliziranja peroksidacije lipida ovisi o željezu i o uvjetima sredine gdje se reakcija odvija. Uloga željeza u inicijaciji peroksidacije je dvojaka. Jedna uloga je da je željezo inicijator peroksidacije,



a druga je uloga katalizatora, u reakcijama gdje nastaju reaktivni hidroksilni radikali koji mogu započeti peroksidaciju.



Te dvije uloge željeza se odvijaju kada nema hidroperoksida ili ih nema dovoljno da bi bili konkurencija reakcijama s vodikovim peroksidom.

Hidroksilni radikali, koji su nastali ovom reakcijom koja se još naziva i Fentova, mogu reagirati s molekulama i tim reakcijama stvaraju različito reaktivne sekundarne radikale. [3]

#### 4. PRODUKTI LIPIDNE PEROKSIDACIJE I NJEZINE POSLJEDICE

Kada ioni bakra ili željeza djeluju na lipidne perokside, oni stvaraju različite razgradne produkte kao što su aldehidi, ketoni, epoksidi i mnogi drugi. Malondialdehid se dobiva u jako malom postotku u procesu peroksidacije koje je zapravo i sam pokazatelj. Također malondialdehid može postojati u više različitih oblika, a u fiziološkim uvjetima ima oblik enolatnog iona koji se spaja s proteinima. Malondialdehid napada DNA, točnije gvanin koji se nalazi u sastavu DNA, a taj napad dovodi do mutacija.

Hidroksialkenal 4-hidroksinonenal nastaje u reakciji peroksidacije  $\omega$ -6 višestruko nezasićenih masnih kiselina poput linolenske kiseline. Predstavlja dobiveni produkt koji je veoma štetan u velikim količinama, može usporavati rast stanica i sudjeluje u modifikaciji lipoproteina. Budući da hidroksialkenali imaju tri funkcijske skupine pokazuju veliku reaktivnost, pokazuju veliki afinitet prema DNA točnije prema njezinim bazama i prema proteinima. Hidroksialkenali su selektivni i prema SH skupinama vezanim na albumin.

Izoprostani su također produkti lipidne peroksidacije i vrlo su toksični te nastaju oksidacijom fosfolipida. Oni su izomeri prostaglandina s kojima dijele sličnosti, ali za razliku od prostaglandina ne nastaju u membrani. Također mogu služiti kao markeri u peroksidaciji lipida.

Neke od posljedica peroksidacije lipida u membranama su smanjenje fluidnosti, padanje membranskog potencijala te moguća puknuća stanica čija je posljedica otpuštanje svega njezinog materijala. Lipidna se peroksidacija odvija mnogo brže u tkivima koja ne funkcioniraju normalno. [4]

## 5. METODE ODREĐIVANJA LIPIDNIH HIDROPEROKSIDA

Postoji nekoliko metoda i mjernih tehnika preko kojih se prati lipidna oksidacija. Neke tehnike temelje se na procesima mjerenja nestajanja jednog od reaktanata, druge se temelje na mjerenju količine intermedijera koji nastaje ili pak primarnih produkata koji su stabilni, a neke mjere koliko u konačnici razgradnih produkata nastaje. Rani stupanj oksidacije određuje se pomoću analize hidroperoksida jer su oni prvi stabilni produkti lipidne peroksidacije. Zbog složenosti mehanizama i kinetike procesa oksidacije najbolje je koristiti nekoliko analitičkih metoda istovremeno jer se time osiguravaju bolji i točniji rezultati. [3]

### 5.1. Spektrofotometrijske metode

#### 5.1.1. Metoda određivanja konjugiranih diena

Jedna od direktnih metoda određivanja hidroperoksida je metoda spektrofotometrijskog mjerenja konjugiranih UV diena. Ova metoda mjeri konjugirane diene koji nastaju u propagacijskoj fazi poslije stabilizacije alil-radikala nezasićenih masnih kiselina.

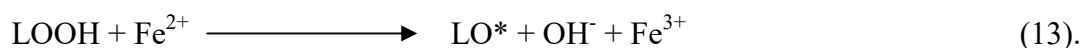
Jedno od karakterističnih svojstava autooksidiranog 1,4-nekonjugiranog diena je apsorpcija diena u ultra ljubičastom dijelu spektra zračenja s mjerljivom razlikom u apsorpciji para pozicijskih cis, trans i para pozicijskih trans, trans-konjugiranih LOOH.

Geometrijski izomeri konjugiranih LOOH imaju apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 234 nm. Ova spektrofotometrijska metoda koja je veoma osjetljiva koristi se u *in vivo* i *in vitro* sustavima. Izmjereni konjugirani dieni i hidroperoksidi nisu striktno proporcionalni u odnosu 1:1. Ta proporcionalnost najčešće vrijedi u oksidaciji neradikalnim putem. U ranim fazama oksidacije postoji proporcionalnost između diena i koncentracije LOOH. Ova metoda određivanja konjugiranih diena koristi se kako bi se usporedili rezultati s drugim izravnim ili neizravnim metodama. Mana metode određivanja konjugiranih diena je nemogućnost analiziranja ukupnih lipida, nego samo onih koji sadrže PUFA koje imaju dvije ili više dvostrukih veza. [3]

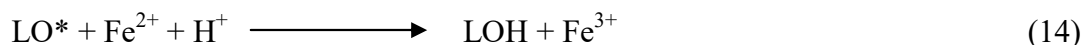
### 5.1.2. Feritiocijanatna metoda

Spektofotometrijsko mjerenje feritiocijanatnog kompleksa i oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  u  $\text{Fe}^{3+}$  ion u hidroperoksidnim otopinama glavna su obilježja ove neizravne metode. Prednosti metode su njezina specifičnost i reproducibilnost u usporedbi s nekim drugim metodama.

Hidroperoksidi lipida se određuju ovom specifičnom metodom. Hidroperoksidi koji su relativno stabilni u vodenim medijima katalitički se razrađuju uz pomoć  $\text{Fe}^{2+}$  iona u kiseloj sredini:



Alkoksilni radikal koji je nastao ovom reakcijom može ući u niz drugih reakcija. Uz pretpostavku da reakcija



uspješno konkurira i drugim reakcijama koje su moguće u otopini, proizlazi stehiometrija da se svaka molekula LOOH oksidira s dva  $\text{Fe}^{2+}$  iona.

Feritiocijanatni kompleks mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od oko 500 nm, a taj kompleks nastaje u reakciji kada se oksidirani  $\text{Fe}^{3+}$  spaja s tiocijanatom.



Ravnoteža se pomiče u smjeru nastajanja kompleksa ako se poveća koncentracija tiocijanata pa se treba koristiti reagens u suvišku pri kolorimetrijskom određivanju željeza. Lambert-Beerov zakon u postojećim uvjetima vrijedi u širim područjima koncentracije željeza, a boja otopine koja se mjeri je postojanija nego kod malih koncentracija tiocijanata.

Kada se analiziraju hidroperoksidi feritiocijanatnom metodom nije potrebna velika količina uzorka, najmanja koncentracija hidroperoksida koja se tom metodom može odrediti je 170 pmol/mL, a ona odgovara 50  $\mu\text{mol}$  LOOH/kg lipida u uzorku.

Ova metoda brzo, jednostavno i vrlo osjetljivo određuje hidroperoksidi u različitim uzorcima. [3]

### 5.1.3. Kromatografske i spektroskopske metode

Kromatografske i spektroskopske metode služe za tumačenje reakcijskih mehanizama oksidacije i te su metode direktne. Specifične funkcijske skupine i geometrija izomerizacije masnih kiselina može se odrediti pomoću infracrvene spektroskopije. Apsorpcijska vrpca u blizini  $3413\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na vibracijsko istezanje –O-H skupine, a to indicira da postoje hidroperoksidi. U području otiska prsta na  $900\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  dolazi do identifikacije trans i cis izomera masnih kiselina. Infracrvena spektroskopija je odlična metoda za određivanje produkata u ranim fazama oksidacije zato što se hidroperoksidi razrađuju na različite karbonilne, alkilne i hidroksilne spojeve.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti također može služiti kao metoda određivanja hidroperoksida lipida. Ova metoda ima veliku prednost u obliku visoke reproduktivnosti i osjetljivosti za razliku od drugih metoda. Vrlo male koncentracije LOOH mogu se određivati pomoću različitih detektora. Ti detektori mogu biti elektrokemijski, kemoluminiscentni ili UV detektori. U novim istraživanjima produkti peroskidacije lipida određuju se plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom i tekućinskom kromatografijom radi točnijih rezultata jer su u kombinaciji te metode jako osjetljive i specifične. Plinska kromatografija u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom je jednostavna metoda jer joj nije potrebna derivatizacija na početku izvođenja. [3]

## **6. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA TRANS-NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA**

Metode za određivanje geometrijskih izomera razvijene su u zadnjih nekoliko godina. Koncentracija masnih kiselina, ali i same masne kiseline određuju se u nekoliko koraka. Prvo se lipidi moraju ekstrahirati iz uzoraka. Zatim se trebaju izolirati slobodne masne kiseline tankoslojnom kromatografijom ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Tada se slobodne masne kiseline derivatiziraju u estere. Na kraju se esteri masnih kiselina ekstrahiraju u svrhu kromatografskog određivanja. Jednostavne lipide lako je odvojiti iz masnog tkiva. Složeni lipidi se veoma teško ekstrahiraju zato što su oni vezani na proteine ili polisaharide, a također su i sastavni dio membrana. Za što bolju ekstrakciju potrebno je naći što pogodnije otapalo jer će to otapalo odvojiti lipide od spojeva na koji su oni vezani. Ima mnogo ekstrakcijskih tehnika među kojima su najpoznatiji postupak po Folchu ili metode po Blighu i Dyeru. Za ekstrakciju lipida iz bioloških uzoraka ovo su najbolji postupci. Zbog brze autooksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina, a ta autooksidacija utječe na rezultate, s lipidima se treba raditi uz prisutnost dušika. Autooksidacijom lipida gube se hlapljivi derivati masnih kiselina, također kao i njihovi esteri. [3]

### **6.1. Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija je kromatografska tehnika široke uporabe u analizi masnih kiselina. Napolarni derivati masnih kiselina, kao što su metilni esteri dobivaju se iz višestruko nezasićenih masnih kiselina. Ti se dobiveni metilni esteri dobro i djelotvorno razdvajaju po stacionarnoj fazi u kapilarnim kolonama zato što su oni veoma hlapivi. Saponifikacija pa zatim acidifikacija i derivatizacija uz pomoć diazometana u eteru jedne su od prvih ekstrakcijskih metoda za određivanje masnih kiselina. Koja će se od tih metoda primijeniti ovisi o tome kakav je uzorak. Plinska kromatografija ima sposobnost velikog razlučivanja komponenata lipida, a to omogućuje određivanje sastava i količine u složenijim uzorcima. Kao detektor služi plameno-ionizacijski detektor, a duge kapilarne kolone sadrže selektivne polarne stacionarne faze pa su stoga vrlo učinkovite. Odvajanje pozicijskih i geometrijskih izomera masnih kiselina moguće je zbog korištenja polarnih kapilarnih kolona. Za mjerenja treba namjestiti odgovarajuću temperaturu, plinski protok i

tlak kao i izabrati odgovarajuću kolonu. Kada se koristi kolona s polarnom stacionarnom fazom može se odvojiti trans izomer od cis izomera masnih kiselina. Trans izomer će se eluirati puno brže od cis izomera. Za određivanje kompleksnih bioloških spojeva kao detektor služi spektrometar masa zato što je on veoma osjetljiv i selektivan. Na taj način mogu se sigurnije identificirati odvojene komponente na temelju spektra masa. [3]

## **6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Za odvajanje i analizu masnih kiselina koriste se i različiti tipovi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Za razliku od normalne kromatografije ovaj oblik te tehnike puno je osjetljiviji i selektivniji te se koristi niža temperatura da ne dođe do izomerizacije dvostruke veze. Postoje dva oblika HPLC-a, a to su HPLC obrnutih i normalnih faza. Analiza organskih kiselina kao i višezasićenih masnih kiselina odvija se uz pomoć HPLC-a obrnutih faza. U analizi derivata masnih kiselina kromatografija obrnutih faza u kombinaciji s UV/Vis detektorom uspoređuje se s plinskom kromatografijom. U kromatografiji normalnih faza razdvajanje se odvija prema stupnju zasićenosti masnih kiselina. Zasićene i nezasićene masne kiseline analiziraju se uz predkolonsku derivatizaciju, a samim time se povećava osjetljivost i selektivnost te metode. Višestruko nezasićene i monozasićene masne kiseline odvajaju se ovom metodom uz prethodnu derivatizaciju.  $\text{Ag}^+$ -HPLC mora imati kolonu srebrnih iona koji su vezani na silicijev dioksid. Ta metoda koristi se za separaciju i kvantifikaciju cis i trans masnih kiselina. Prijenos naboja između  $\text{Ag}^+$  i dvostruke veze kiseline dovodi do stvaranja kompleksa na kojem se temelji odvajanje u ovoj tehnici. [3]

## **6.3. Spektroskopske metode**

Utvrđivanje strukture lipida i određivanje udjela trans izomera u lipidima odvija se pomoću infracrvene spektroskopije. Uz pomoć otiska prsta infracrvena spektroskopija određuje molekulsku strukturu. U prirodnim mastima i uljima postoje strukturno vrlo slične molekule pa otisak prsta u infracrvenoj spektroskopiji nije jasan. Zato je razvijena infracrvena spektroskopija s Fourier-ovim transformacijama. Ovom metodom mogu se određivati izolirane trans-dvostruke veze jako velikom točnošću jer za tu metodu nije

potrebna prethodna derivatizacija. Mana ove metode je ta što se njome mjere samo ukupni trans izomeri.

UV spektroskopija je dobra tehnika za određivanje masnih kiselina s konjugiranom dvostukom vezom. Kada se pojavi konjugirana dvostruka veza pojavljuju se karakteristične široke vrpce pri većim valnim duljinama, a njihov intenzitet raste kako raste i broj dvostrukih veza pa samim time i ova tehnika postaje korisna. Kako raste broj trans dvostrukih veza valne duljine apsorpcijskog maksimuma su manje, a koeficijent ekstinkcije raste. Zbog male razlike u apsorpcijskim maksimumima geometrijskih izomera oni se ne bi mogli razlikovati u smjesi masnih kiselina. Otežano tumačenje rezultata događa se zbog međudjelovanja dvostruke veze i stranih komponenata u ovom apsorpcijskom području. [3]



## 7. ZAKLJUČAK

Peroksidacija lipida je jedan od glavnih procesa koji se odvija u membranama stanica. Reakcije između slobodnih radikala i nezasićenih masnih kiselina imaju sposobnost izmijeniti strukturu lipida, pa tako i njihova fizička i kemijska svojstva. Lipidna peroksidacija dovodi do razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina. Ona se može mjeriti s nekoliko različitih metoda. Te metode pokazuju i prednosti i mane. Jako je važno odabrati pravu metodu za određivanje lipidne peroksidacije. Neke od metoda temelje se na mjerenju jednog od reaktanata ili količine intermedijera koji nastaju. Hidroperoksidi koji su stabilni prvi nastaju u procesu peroksidacije pa se pomoću njih određuje prvi stupanj oksidacije. Postoje i analitičke metode za određivanje trans-nezasićenih masnih kiselina kao što su plinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i neke spektroskopske metode. Plinska kromatografija služi za određivanje sastava i količine složenijih uzoraka. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je puno osjetljivija i selektivnija metoda od plinske kromatografije. Infracrvena spektroskopija služi za određivanje strukture lipida. Za što točnije rezultate trebalo bi koristiti kombinaciju dviju metoda.

## 8. LITERATURA

1. S. H. Pine, Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
2. J. M. Berg, S. L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, 6. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
3. Bujak, I. T. (2015) Radikalima potaknute peroksidacije i izomerizacije nezasićenih masnih kiselina. Doktorski rad. Zagreb: Prirodoslovno matematički fakultet.
4. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidic, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović, Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, Medicina 43 (2007) 84-93.
5. R. A. Floyd, Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia, FASEB J. 4 (1990) 2587-2597.
6. F. Shahidi, Y. Zhong, Baileys Industrial Oil and Fat Products, John Wiley and Sons, 2005.