Određivanje kolesterola u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

Dornjak, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:182:371269

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Luka Dornjak

Određivanje kolesterola u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

Diplomski rad

Osijek, 2020 godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Luka Dornjak

Određivanje kolesterola u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Olivera Galović

Osijek, 2020 godina

Ovaj rad izrađen je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Rad je dio istraživanja koja provodi Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane.

Zavaljujem se mentorici doc. dr. sc. Oliveri Galović na beskonačnom strpljenju, pomoći i konstruktivnim kritikama pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Martini Šrajer-Gajdošik na mnogim konstruktivnim kritikama pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem roditeljima, sestri i šogoru na podršci, ljubavi i vjeri kroz cijelo moje školovanje i studiranje.

Zahvaljujem se prijateljima i „pasuljcima“ bez čije podrške kroz beskonačne sate studiranja i učenja ovaj rad ne bi bio moguć.

EMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ODREĐIVANJE KOLESTEROLA U JAJIMA OBOGAĆENIM FUNKCIONALNIM SASTOJCIMA

Luka Dornjak

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Sažetak:
Određivana je koncentracija kolesterola u jajima nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu obogaćenu funkcionalnim sastojcima te u jajima nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu koja nije obogaćena i jajima proizvedenim na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu. Uz ostale funkcionalne sastojke, u krmnu smjesu za nesilice dodavano je riblje ulje koje ima povoljan utjecaj na povećanje razine omega-3 masnih kiselina. U odnosu na ukupan sadržaj ulja, dodano je 0,3; 0,9; i 1,5% ribljeg ulja. Pripremljeni uzorci žumanjaka jaja analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti s UV detekcijom. Najveća koncentracija kolesterola, u odnosu na literaturne podatke, određena je u domaćim jajima a nešto niža u jajima nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu koja nije obogaćena funkcionalnim sastojcima. U jajima nesilica koje su konzumirale krmu smjesu obogaćenu funkcionalnim sastojcima, najniža koncentracija kolesterola nađena je kod jaja nesilica koje su konzumirale smjesu s 0,3% ribljeg ulja a najviša koncentracija u jajima nesilica koje su konzumirale smjesu s 1,5% ribljeg ulja. Usporedbom dobivenih rezultata može se vidjeti da je u jajima nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu s dodatkom ribljeg ulja koncentracija kolesterola nešto niža u odnosu na jaja nesilica koje su konzumirale smjesu koja nije obogaćena, ali ne značajno. Jaja proizvedena na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu imaju najvišu razinu kolesterola.

Diplomski rad obuhvaća: *stranica: 45, slika: 31, tablica: 10, literaturnih navoda: 27*

Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: kolesterol, funkcionalni sastojci, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti, jaja
Rad prihvaćen:
Stručno povjerenstvo za ocjenu:
1. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc. dr. sc. Ana Amić, članica
3. doc. dr. sc. Olivera Galović, mentorica i članica
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; research study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN EGGS ENRICHED WITH FUNCTIONAL INGREDIENTS

Luka Dornjak

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.

Abstract:
The concentration of cholesterol in laying hens eggs that consumed feed mixture enriched with functional ingredients, laying hens eggs that consumed feed mixture that was not enriched and eggs produced on the family farm was determined. In addition to other functional ingredients, fish oil has been added to the feed mixture for laying hens, which has a beneficial effect on increasing the level of omega-3 fatty acids. In relation to the total oil content 0.3, 0.9 and 1.5% fish oil was added. Prepared egg yolk samples were analyzed by high performance liquid chromatography with UV detection. The highest concentration of cholesterol, in relation to the literature data, was determined in eggs produced on family farm and lower concentration in the eggs of laying hens that consumed feed mixture that was not enriched with functional ingredients. In laying hens that consumed feed mixture enriched with functional ingredients, the lowest concentration of cholesterol was found in laying hens eggs that consumed mixture with 0.3% fish oil and the highest concentration in laying hens that consumed mixture with 1.5% fish oil. Comparing the obtained results, it can be seen that in the eggs of laying hens that consumed feed mixture with the addition of fish oil, the cholesterol concentration is slightly lower compared to the eggs of laying hens that consumed mixture that was not enriched but not significantly. Eggs produced on a family farm have the highest cholesterol levels

Thesis includes: *pages: 45, figures: 31, tables: 10, references: 27*

Original in: Croatian
Keywords: cholesterol, functional ingredients, high pressure liquid chromatography, eggs
Thesis accepted:
Reviewers:
1. Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof., president
2. Ana Amić, , Ph.D., assistant prof., member
3. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof., mentor and member
4. Martina Medvidović-Kosanović, Ph.D., assistant prof., alternate member

Thesis deposited in: Library Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Sadržaj:

1. Uvod....1
2. Literaturni dio....2
2.1. Kolesterol....2
2.2. Kemijska struktura kolesterola....3
2.3. Biosinteza kolesterola....4
2.4. Uloga kolesterola u staničnim membranama....5
2.5. Uloga kolesterola u raznim biološkim procesima....6
2.6. Klinički značaj....7
2.6.1. Lipoproteini niske gustoće....7
2.6.2. Lipoproteini visoke gustoće....7
2.6.3. Ateroskleroza....8
2.6.4. Hiperkolesterolemija i hipokolesterolemija....9
2.7. Metode analize kolesterola....10
2.7.1. Gravimetrijske metode....11
2.7.2. Enzimatski test....12
2.7.3. Kolorimetrija – Modificirna Abell-Kendall metoda....13
2.7.4. Tekućinska kromatografija....15
3. Eksperimentalni dio....17
3.1. Reagensi i pribor....17
3.2. Instrumentacija....18
3.3. Uzorci za analizu....21
3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti....22
3.4.1. Priprema uzorka za analizu tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti....22
3.4.2. Priprema HPLC za analizu i uvjeti analize....27
3.4.3. Kalibracija....27
3.4.4. Provjera valjanosti metode....28
3.5. Izračunavanje sadržaja kolesterola u jajima....29
4. Rezultati i rasprava....30
4.1. Kalibracijski pravac....30
4.2. Provjera valjanosti metode....32
4.3. Određivanje koncentracije kolesterola u realnim uzorcima....33
5. Zaključak....42
6. Literatura....43
7. Životopis....45

1. Uvod

Kolesterol je jedan od najvažnijih biosintetskih prekursora u ljudskim i većini životinjskih organizama. Pripada skupini lipida i podskupini sterola. Građen je od steroidnih prstena i alkoholne skupine. Igra važnu ulogu u izgradnji stanične membrane, odnosno fosfolipidnog dvosloja gdje njegova koncentracija predodređuje fluidnost membrane. Osim stanične membrane, kolesterol također izgrađuje ovojnicu živčanih stanica i sudjeluje u sintezi tijelu važnih hormona, kao što je hormon rasta.

Kolesterol najvećim djelom unosimo kroz prehranu. Nakon unosa, kolesterol se razgrađuje u slobodni kolesterol pomoću gušterače koji se nakon pohrane može koristiti u raznim biosintezama unutar tijela, kao što su sinteza vitamina D i hormona rasta.

Koncentracija kolesterola također ima važnu ulogu u nastanku kardiovaskularnih bolesti. Visoke koncentracije kolesterola mogu izazvati unutrašnje suženje arterija, odnosno ateroskelrozu, dok niske koncentracije kolesterola rezultiraju nepravilnom homeostazom tijela. Kao rezultat potrebno je održavati optimalnu koncentraciju kolesterola u hrani jer time održavamo i koncentraciju kolesterola (osobito LDL kolesterola) u našem organizmu.

Razna istraživanja se provode u svrhu otkrivanja svih mehanizama kolesterola kako bi se otkrio utjecaj na sve biološke funkcije čovjeka.

Cilj ovoga rada je odrediti koncentraciju kolesterola u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima.

2. Literaturni dio

2.1. Kolesterol

Kolesterol je sterol, kombinacija steroida i alkohola i ujedno i lipid koji igra ključnu ulogu u staničnim membranama svih tjelesnih tkiva i prenosi se u krvnu plazmu svih životinja.
Ime potječe od grčke riječi za žuč (grč. *chole*) i riječi za čvrsto (grč. *stereos*) uz kemijski sufiks -ol označavajući alkoholnu funkcijsku skupinu [1].

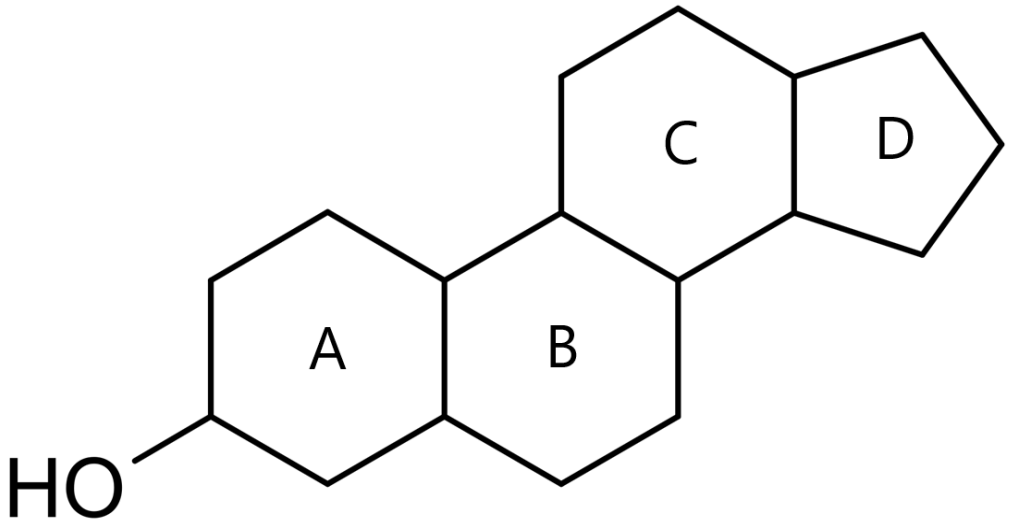
Kolesterol je prirodno voštana supstanca koju sintetiziraju jetre životinja, a unosi se najvećim udjelom kroz prehranu bogatu životinjskim proizvodima. Osim izgradnje staničnih membrana u tijelu se također koristi za izolaciju živčanih stanica i proizvodnju vrlo važnih hormona kao što je hormon rasta [2].

U tijelu, kolesterol može biti u slobodnom obliku ili kao ester s jednom masnom kiselinom kovalentno vezanom za hidroksilnu skupinu na položaju 3 kolesterolnog prstena. Većina kolesterola koji unosimo u organizam kroz životinjske proizvode je u esterskom obliku, odnosno kao ester kolesterola. Sami esteri kolesterola, u usporedbi sa slobodnim kolesterolom u tijelu, imaju nižu topljivost i istovremeno su više hidrofobni. Razgradnju esterskog kolesterola vrši gušterača gdje enzim kolesterol-esteraza pretvara esterski kolesterol u slobodni kolesterol i više masne kiseline.

Slobodni kolesterol ima ključne uloge u staničnoj membrani svih živih bića i biosintezi hormona i tijelu važnih vitamina. Kolesterol je biosintetski prekursor pomoću kojeg tijelo proizvodi žučnu kiselinu, vitamin D i razne steroidne hormone (glukokortikoide, estrogen, progesteron, androgen i aldosteron). Iako sudjeluje u mnogim procesima unutar tijela najveći udio kolesterola pronalazimo u neesterificiranom obliku unutar plazmatske membrane (oko 30-50% ukupnog neesterificiranog kolesterola), gledajući po udjelu kolesterola unutar organa, mozak sadrži gotovo 25% sveukupnog kolesterola i jedina veća molarna koncentracija unutar mozga je koncentracija glukoze [1].

2.2. Kemijska struktura kolesterola

Steroli, poznati i kao steroidni alkoholi, su podskupina steroida i važna su skupina organskih molekula. Oni su vrsta lipida. Prirodno se pojavljuju u biljkama, životinjama i gljivicama, a mogu ih proizvoditi i neke bakterije (međutim vjerojatno s različitim funkcijama). Strukturno su građeni od 4 ciklička prstena s hidroksilnom skupinom na 3C atomu „A“ prstena, vidljivo na Slici 1. Steroli biljaka nazivaju se fitosteroli, a steroli životinja nazivaju se zoosteroli. Najvažniji zoosterol je kolesterol; istaknuti fitosteroli uključuju kampesterol, sitosterol i stigmasterol. Ergosterol je sterol prisutan u staničnoj membrani gljiva, gdje igra ulogu sličnu kolesterolu u životinjskim stanicama [3].



Slika 1. Opća struktura sterola [4].

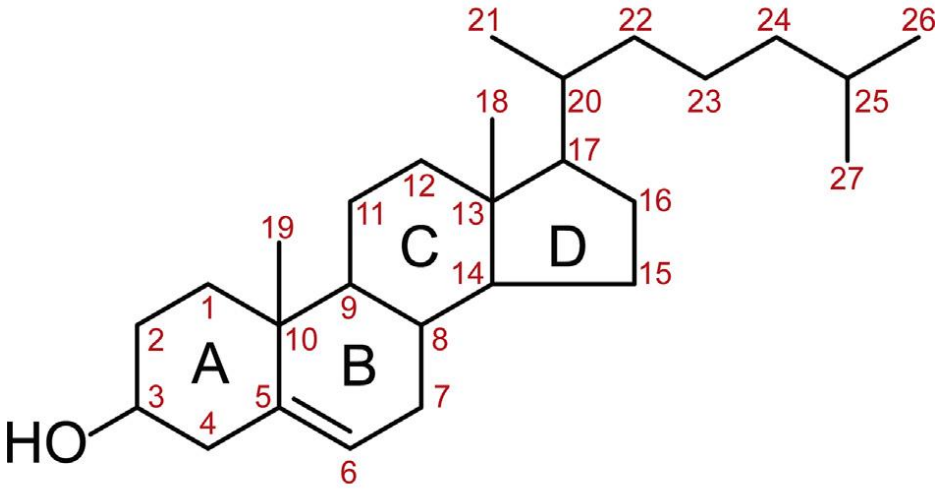
Molekula kolesterola sadrži 3 glavna dijela:

1. tetraciklički ugljikov prsten kao jezgru steroida,

2. polarnu hidroksilnu skupinu na prstenu „A“,

3. kratki nepolarni ugljikovodični lanac pričvršćen na prsten „D“ što je vidljivo na Slici 2.

Sva četiri prstena sterola su u *trans*-konformaciji čineći molekulu planarnom. Dvostruka veza između C5 i C6 atoma pomaže održati krutost molekule.



Slika 2. Strukturni prikaz molekule kolesterola s numeracijom ugljikovim atoma [5].

Iako molekula kolesterola sadrži hidroksilnu skupinu na 3C atomu „A“ prstena, sama molekula je nepolarna, a prostor oko hidroksilne skupine je slabo polaran [5].

2.3. Biosinteza kolesterola

Siteza kolesterola odvija se u 3 faze. Prva faza je sinteza izopentenil-pirofosfata iz acetil-koenzima A (acetil-CoA). Sama sinteza započinje sintezom mevalonata reakcijom acetil-CoA i acetoacetil-CoA uz prisustvo 3-hidroksil-3-metilglutaril-koenzima A (HMG-CoA) gdje nastaje mevalonat, u sljedećem koraku uz utrošak adenozin trofosfata (ATP) dolazi do sinteze izopentil-pirofosfata.

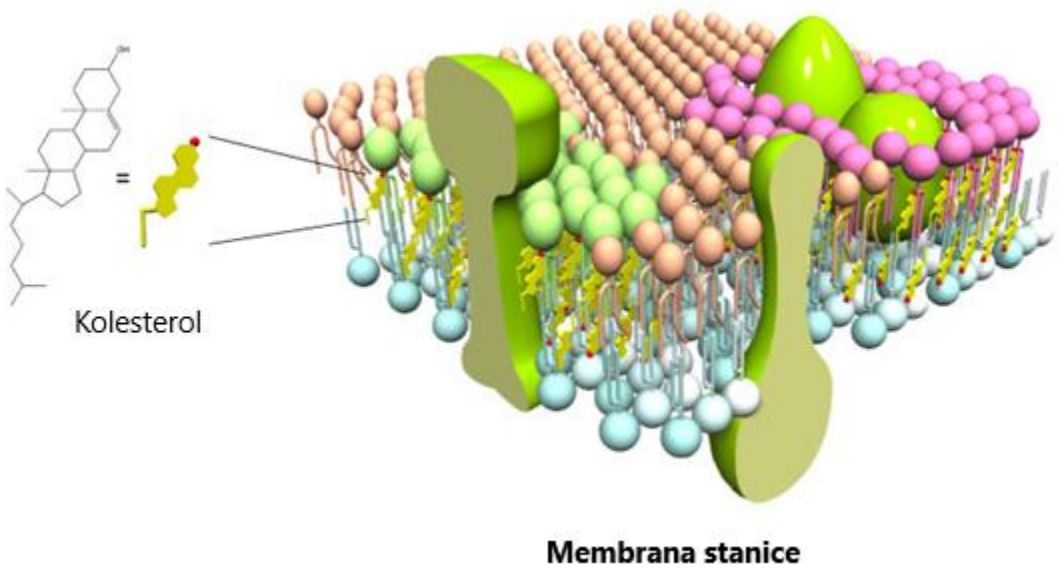
U drugom se koraku 6 molekula izopentenil-pirofosfata povezuje u skvalen pri čemu u međuprocesima dolazi do stvaranja geranil-pirofosfata koji se dalje kondenzira u fernezil-pirofosfat. Dobiveni fernezil-pirofosfat uz utrošak nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH) kondenzira u skvalen.

Treći korak se uglavnom odnosi na ciklizaciju skvalena i utrošak NADPH djelovanjem skvalen monooksidaze i oksidoskvalen ciklaze kako bi se dobio lanosterol. Naknadno kroz 19 koraka kod kojih dolazi do uklanjanja 3 metilne skupine i redukcije dvostruke veze uz NADPH dolazi do sinteze kolesterola [6].

2.4. Uloga kolesterola u staničnim membranama

Kolesterol sudjeluje u održavanju i proliferaciji stanica. Kao što je prije napomenuto, najveća koncentracija kolesterola nalazi se u plazmatskoj membrani gdje staničnoj membrani daje čvrstoću kako ne bi došlo do razaranja same stanice [7].

Hidroksilna skupina kolestrola ulazi u interakciju s vodom koja okružuje membranu, kao i s polarnim glavama fosfolipida i sfingolipida, dok su veći steroidni i ugljikovodični lanci ugrađeni u fosfolipidni dvosloj membrane i u interakciji s nepolarnim lancima masnih kiselina drugih lipida [7], vidljivo na Slici 3.



Slika 3. Struktura fosfolipidnog dvosloja i interkacije s kolesterolom [8].

Kroz interakcije s lancima masnih kiselina fosfolipida u membrani, kolesterol povećava „pakiranje“ odnosno gustoću membrane, time mijenjajući njenu fluidnost i ujedno čvrstoću dajući mogućnost održavanja životinjskih stanica bez stanične stijenke koju pronalazimo kod biljaka. Fluidnost i čvrstoća kod biljaka ne predstavljaju veliku ulogu, no kod životinja ono omogućuje kretanje i mijenjanje samog oblika stanice [7].

Tetraciklički prsten kolesterola pridonosi fluidnosti stanice. Molekula je u *trans* konformaciji što čini sve dijelove molekule planarnim s iznimkom ugljikovodičnog lanca [9]. Uz svoju strukturnu ulogu, kolesterol također smanjuje permeabilnost membrane prema neutralnim otapalima [10].

2.5. Uloga kolesterola u raznim biološkim procesima

Kolesterol sudjeluje u unutarstaničnom transportu, staničnoj signalizaciji i provodnosti živčanih impulsa, važan je za strukturu i funkciju uvučenih kaveola i jama obloženih klatrinom, uključujući i endocitozu ovisnu o kaveolama i klatrinom. [11].

Kolesterol pomaže kod stvaranja lipidnih splavi odnosno kaveola koji pomažu dovesti receptorske proteine u neposrednu blizinu područja visoke koncentracije molekula nekog drugog glasnika [12].

Kolesterol također sudjeluje u prijenosu signalnih implusa kroz živčane stanice kao jedan od najvažnijih komponenata mijelinske ovojnice koja pruža zaštitu samih živaca. Kod pacijenata koji pate od multiple skleroze sumnja se da je demijelinacija jedan od glavnih pokazatelja bolesti [13].

2.6. Klinički značaj

2.6.1. Lipoproteini niske gustoće

U medicinskom polju kolesterol se najčešće dijeli na „dobar“ i „loš“ kolesterol, odnosno na „loš“ LDL (engl. *low-density lipoproteins*) i „dobar“ HDL (engl. *high-density lipoproteins*) kolesterol. LDL su čestice malog promjera koje se sastoje od jezgre koja sadrži polinezasićene masne kiseline, najčešće linoleate i velik broj esterificiranih i neesterificiranih molekula kolesterola, čineći promjer od 22-27,5 nm.

LDL-kolesterol se smatra „lošim“ zbog svojstva taloženja na stijenke arterija, sužavajući njihov promjer, smanjujući protok krvi i utječući negativno na elastičnost stijenke arterija. Uz prijašnje nabrojana svojstva i uzimajući u obzir da su dovoljno mali kako bi ušli u endotel i tamo se taložili, mogu izazivati razne komplikacije kao što je ateroskleroza [14].

2.6.2. Lipoproteini visoke gustoće

HDL su dimenzijski najmanji lipoproteini. Sintezu HDL-a vrši jetra iz apoliproteina i fosfolipida, nakon završetka sinteze HDL-a njihova struktura nije sferična već poput tankog diska promjera 7,3-14,0 nm.

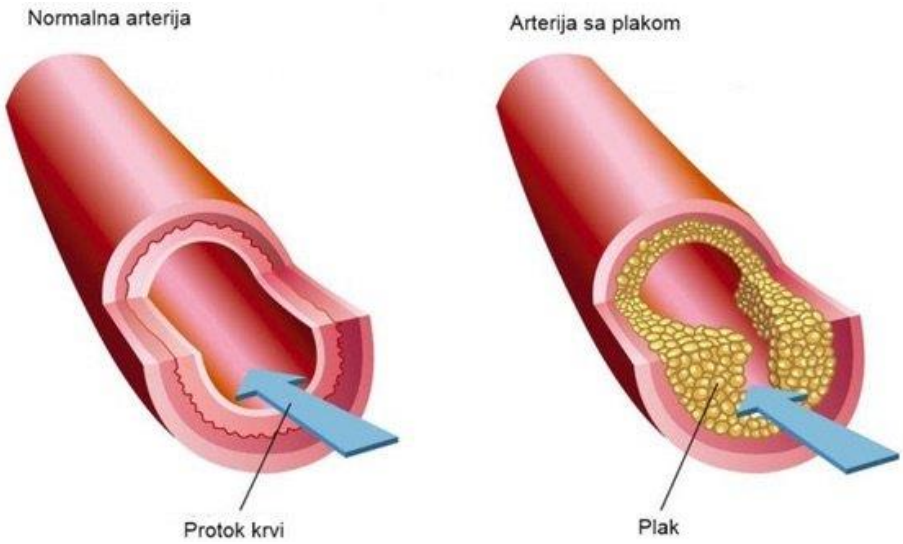
Ove strukture imaju sposobnost da, prolaskom kroz krvotok „lijepe“ kolesterol na svoju površinu i inkorporiraju ga u unutrašnjost uz pomoć lecitin-kolesterol aciltzransferaze. Kruženjem kroz arterije molekula gubi oblik diska te sve više poprima ovalan oblik. Nakon što HDL prikupi dovoljno kolesterola, transportira se u jetru ili druge steroidogene organe kao što su nadbubrežne žlijezde i gonade kako bi došlo do obnavljanja HDL i ponovnog kruženja u krvotoku [15].

2.6.3. Ateroskleroza

Ateroskleroza je bolest kod koje se unutrašnjost arterije sužava kao rezultat nakupljanja plaka, vidljivo na Slici 4. U samom početku, bolest nema nikakvih očitih simptoma, no pred kraj može dovesti do ozbiljnih oboljenja koronarnih arterija, moždanog udara, oštećenja bubrega, ovisno koje arterije su zahvaćene. Sami simptomi se najčešće manifestiraju tek u srednjoj životnoj dobi. [16].

Zbog sumnje se da je jedan od glavnih uzročnika ateroskleroze kolesterol (LDL) koji posjeduje karakteristiku taloženja na stijenkama arterija sužujući promjer i smanjujući elastičnost stijenke, istražuju se utjecaji dijabetesa, pušenja, prekomjerne tjelesne težine i nezdrave prehrane na temeljno povećanje koncentracije „lošeg“ kolesterola u tijelu.

Za prevenciju ateroskleroze preporučuje se zdrava prehrana, tjelovježba, izbjegavanje duhanskih proizvoda te održavanje normalne tjelesne težine. Iako se bolest može manifestirati u vrlo kasnoj životnoj dobi, nakon manifestacije može se zaustaviti koronarnom intervencijom, koronarnim arterijskim zaobilaženjem (engl. *coronary artery bypass surgery*) [17].



Slika 4. Prikaz normalne arterije u usporedbi s arterijom s plakom [18].

2.6.4. Hiperkolesterolemija i hipokolesterolemija

Kao što je ranije navedeno, visoke razine kolesterola u tijelu nisu poželjne. Mogu izazvati razne negativne učinke na naše tijelo kao što je moždani ili srčani udar ili samo oslabljivanje arterijskih stijenki. Povećana koncentracija kolesterola naziva se hiperkolesterolemija (engl. *hypercholestrolemia*) i jedna je od rastućih problema modernog svijeta [19].

Već u 80-tim godinama 20. stoljeća znanost započinje praćenje razine kolesterola u stanovništvu i izdaju se preporučene odnosno optimalne vrijednosti razine kolesterola prema kojima se treba planirati prehrana i tjelovježba kako bi se tijelo održalo zdravim. U tablici 1. vidljive su preporučene razine [19].

Tablica 1. Preporučene razine kolesterola [19].

Razina		**Interpretacija**
mg/dL	mmol/L	
<200	<5,2	Poželjna razina (nizak rizik)
200-240	5,2-6,2	Granična razina (visok rizik)
>240	>6,2	Visoka razina

Povećana koncentracija kolesterola se općenito smatra kao pokazatelj lošeg zdravlja, no umanjena koncentracije kolesterola odnosno hipokolesterolemija također može imati negativan utjecaj na naš organizam [20].

Demografska istraživanja predlažu da niske razine kolesterola mogu biti vezane za povećanu smrtnost, većinski zbog depresije, raka i krvarenja u mozgu [20].

Niske razine kolesterola imaju najveći utjecaj na stariju populaciju. Sniženje kolesterola, radi održanja zdravlja, dovode pacijente u još opasnije stanje gdje tijelo nema dovoljne količine kolesterola za održavanje homeostaze [20].

Velika većina istraživanja provedena radi mjerenja kolesterola u populaciji zaključuju da je niska razina kolesterola, kao i visoka pokazatelj lošeg zdravlja [20].

2.7. Metode analize kolesterola

Za određivanje kolesterola razvijeno je nekoliko metoda kroz razna istraživanja. Većina tih metoda može se kategorizirati u 3 skupine:

1. klasične kemijske metode koje se temelje na Abell-Kendall protokolu (gravimetrijske metode),
2. fluorometrijske i kolorimetrijske enzimske analize koje se najčešće koriste kod automatiziranih procesa analize,
3. analize temeljene na plinskim i tekućinskim kromatografijama ili masenim spektrometrima [5].

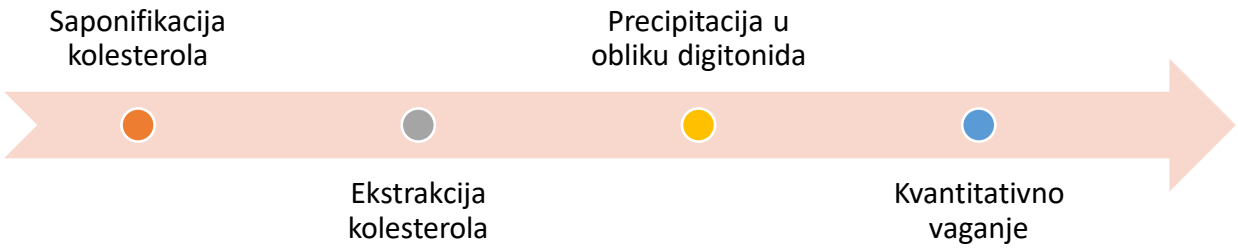
Svaka od navedenih metoda ima svoje prednosti i mane. Kod klasičnih kemijskih metoda sam proces je vrlo jednostavan i jeftin za izvođenje, ali sadrži velik broj koraka koji metodu čine dugotrajnom i zamornom. Uspješno odrađena analiza ovisi i o iskustvu osobe koja provodi analizu. Enzimski testovi, iako imaju niske granice detekcije, zahtijevaju korištenje skupih enzima. Kromatografske metode i metode masene spektrometrije su najpreciznije i najosjetljivije, ali zahtijevaju skupu opremu, poznavanje rada na kompleksnim sustavima i obradu velikog broja podataka [5].

Proučene su mnoge metode analize, dok su neke metode preciznije ili jednostavnije za izvođenje, kao što je ranije navedeno, analitičke metode predstavljaju najpreciznije i najosjetljivije analize za određivanje kolesterola.
U ovom istraživanju, za analizu uzoraka koristit će se tekućinska kromatografija visoke razlučivosti [5].

2.7.1. Gravimetrijske metode

Gravimetrijski određivanje kolesterola pomoću digitonida rijetko se koristi jer je sama tehnika prekomplicirana, digitonin je skup, dok je kvantitativno odvajanje taloga težak proces. Kontrole koje se vrše pri određivanju kolesterola gravimetrijskim metodama mogu rezultirati u greškama od -18% do +76% što metodu čini nepouzdanom.

Metoda započinje ekstrakcijom serumskog kolesterola pomoću saponifikacije, otapanje u alkoholnim otopinama kao što je kalijev hidroksid te uklanjanje bilo kakvih primjesa kako ne bi došlo do odstupanja u rezultatima. Nakon pročišćavanja uzorka, kolesterolu se dodaje mala količina digitonida kako bi se izazvala precipitacija. Uzorak se tada uparava da bi se uklonilo otapalo. Kada se otapalo u potpunosti ukloni talog se otapa u vrućem eteru te se filtrira pomoću prokuhane vode, ponovno suši i kvantitativno važe, Slika 5. Korištenje ovih metoda omogućuje korištenje mikrogravimetrije što umanjuje količine potrebnog digitonida, ukupno smanjujući cijenu analize [21].

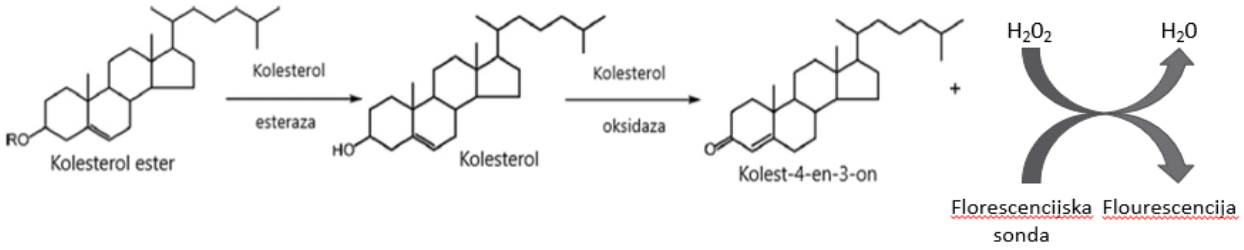


Slika 5. Shema gravimetrijskog određivanja kolesterola taloženjem u obliku digitonida.

2.7.2. Enzimatski test

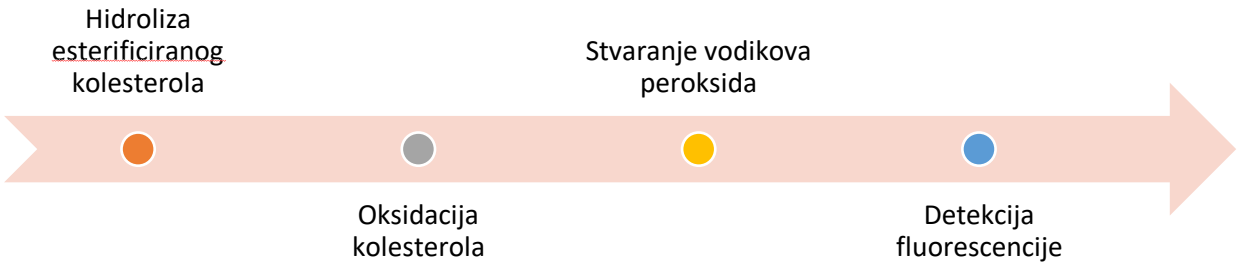
Enzimatski test bazira se na reakcijama koje su povezane s enzimom kako bi se odredile ukupne količine kolesterola. Prvi enzimski test stvoren je s ciljem mjerenja kolesterola unutar seruma pacijenata [5].

Proces analize započinje esterifikacijom kolesterola koji se naknadno hidrolizira pomoću kolesterol esteraze kako bi se oslobodio. Slobodan kolesterol se oksidira pomoću kolesterol oksidaze u kolest-4-en-3-on. Kao sekundarni produkt ove reakcije stvara se vodikov peroksid kojeg se može detektirati korištenjem kolorimterijskih i fluorometrijskih sondi i određivanjem koncentracije vodikova peroksida možemo odrediti koncentraciju samog kolesterola unutar seruma, Slike 6. i 7. [22].



Slika 6. Strukturni prikaz enzimatskog testa pri analizi kolesterola [22].

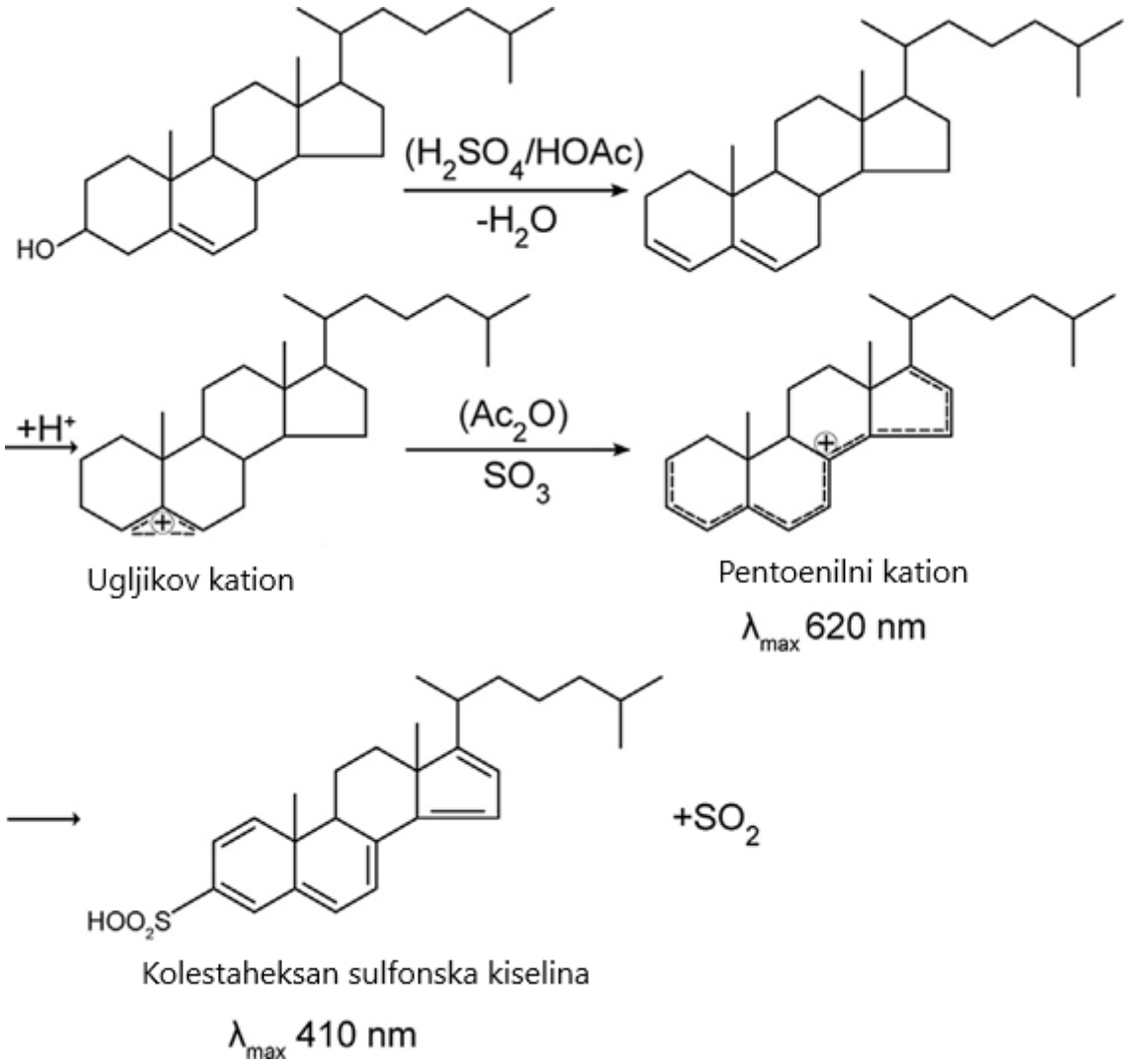
Metoda je vrlo razvijena i najčešće se pronalazi u prijenosnim opremama za analizu ili automatiziranim medicinskim uređajima koji vrše veliki broj analiza te je potrebna jednostavnost i preciznost metode [5].



Slika 7. Shematski prikaz enzimatskog testa pri analizi kolesterola.

2.7.3. Kolorimetrija – Modificirna Abell-Kendall metoda

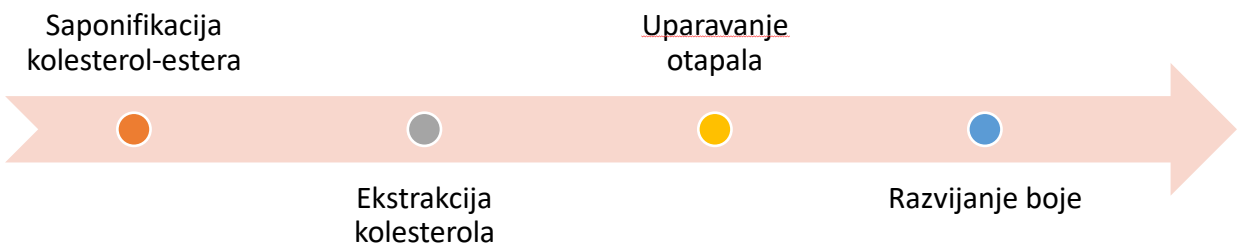
Metode analize kolesterola koje se baziraju na kolorimetrijskim mjerenjima odnosno razvijanju boje kako bi se odredila koncentracija kolesterola najčešće se zasnivaju na Abell-Kendall metodi. To je klasična kemijska metoda koja uključuje Libermann-Burchard (L-B) reakciju razvijenu specifično za analizu kolesterola gdje boja reagensa započinje s ljubičastom bojom koju prati svijetlo, a zatim tamno zelena boja, vidljivo na Slici 8. Razvitak boje proizlazi iz reakcija hidroksilnih iona s reagensom povećavajući konjugaciju u nezasićenom susjednom prstenu [22].



Slika 8. Shema kolorimterijske L-B reakcije [5].

Proces uključuje saponifikaciju estera kolesterola pomoću alkoholne otopine kao što je kalijev hidroksid, kako bi ga se oslobodilo, ekstrakciju hidroliziranog kolesterola hlapljivim organskim otapalima, najčešće n-heksan zbog svoje niske polarnosti, nakon čega slijedi uparavanje otapala, te na kraju razvoj boje s anhidridom octene kiseline i koncentriranom sumpornom kiselinom. Shema procesa analize prikazana je na Slici 9.

Ultraljubičasta (UV) spektrofotometrija (λ = 410 nm) najčešće se koristi u svrhu mjerenja koncentracije kolesterola. Iako se modificirana Abell-Kendall metoda smatra referentnom metodom za kolorimetrijska mjerenja koncentracije kolesterola, njezina primjena danas se izbjegava jer se za L-B reakciju koriste visoko korozivni reagensi [5].



Slika 9. Shematski prikaz kolorimterijske analize kolesterola.

2.7.4. Tekućinska kromatografija

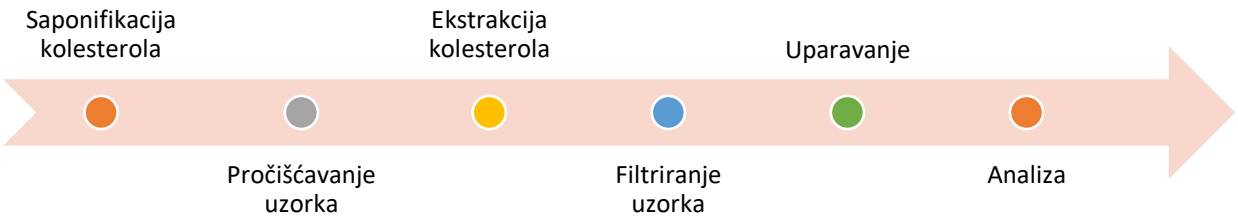
Kromatografske metode kao što su plinska kromatografija (engl. *gas chromatography, GC*) gdje je plin mobilna faza i tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography, LC*) gdje je tekućina mobilna faza, se obično koriste za određivanje kolesterola. Ove metode su opće prihvaćene kao preciznije, osjetljivije i pouzdanije od ostalih navedenih metoda. Kromatografske metode, u usporedbi s ostalima, pružaju bolju selektivnost tako što omogućuju odvajanje kolesterola od drugih ometajućih vrsta (poput sterola) na kromatograskim kolonama. Također, uz povećanu selekciju, kromatografske metode smanjuju potrebne volumene analita do granica gdje je potrebno samo nekoliko mililitara kako bi se obavila cijela analiza [5].

Iako se kromatografija čini kao najbolja metoda, svi pozitivni aspekti koji su ranije navedeni ovise o samoj pripremi uzorka, poput saponifikacije i ekstrakcije analita, ako ti koraci nisu dobro odrađeni, analiza bi mogla dati netočne rezultate [5].

Analiza kolesterola najčešće se provodila pomoću plinske kromatografije koja je spregnuta zajedno s ionizacijskim detektorom plamenog vodika kako bi se izvršila analiza kolesterola u serumu. Tek od 1979. godine započinje korištenje tekućinske kromatografije reverzne faze s UV detekcijom (λ = 210 nm) za analizu slobodnog esterificiranog i ukupnog kolesterola u serumu [5].

Sam proces analize kolesterola pomoću tekućinske kromatografije započinje saponifikacijom kolesterola kako bi oslobodili kolesterol. U ovu svrhu najčešće se koristi alkohol, u ovome slučaju kalijev hidroksid (KOH) kako bi odvojili kolesterol od masnih kiselina i triglicerida. Dodatkom ultračiste vode uklanjamo primjese, a za samu ekstrakciju kolesterola koristi se n-heksan (zbog niske polarnosti). Uzorak se dodatno filtrira kako bi se očuvala kolona koja se koristi za analizu. Uzorak se uparava kako bi se otklonilo otapalo, a po potrebi se dodaje mobilna faza kada je uzorak spreman za analizu, vidljivo na Slici 10 [23].

Uz samu tekućinsku kromatografiju može se koristi i visokotlačna kromatografija koja zbog naprednije kolone i višeg tlaka pri analizi može uštediti na vremenu i volumenu potrebnog uzorka i mobilne faze, smanjujući sveukupnu cijenu analize [23].



Slika 10. Shematski prikaz kromatografske analize kolesterola.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Reagensi i pribor

U ovome radu korišteni su slijedeći reagensi i pribor:

Reagensi:

- Kalij hidroksid (Gram-mol, Hrvatska)
- Etanol, 96% (Gram-mol, Hrvatska)
- Ultračista voda
- n-heksan, HPLC čistoće (Carlo Erba, Francuska)
- Acetonitril, HPLC čistoće (Carlo Erba, Francuska)
- Izopropanol, HPLC čistoće (Fisher Chemical, UK)
- Standard kolesterola (Shimadzu, Japan)

Pribor:

- Staklena čaša, 250 mL
- Staklena epruveta, 50 mL
- Vialice, 1,5 mL
- Kapalica
- Pipeta, 5 mL i 10 mL
- Mikropipeta
- Staklene bočice s čepom

3.2. Instrumentacija

U ovom radu korištena je slijedeća instrumentacija:



Slika 11. Analitička vaga.



Slika 12. Laboratorijska tresilica.



Slika 13. Magnetska miješalica.


Slika 14. Tekućinski kromatograf visoke razlučivosti.



Slika 15. Uređaj za ultračistu vodu.

3.3. Uzorci za analizu

Koncentracija kolesterola određivana je u 6 skupina jaja:

- kontrolna skupina (skupina jaja koja su dobivena od nesilica koje su hranjene krmnom smjesom bez dodatka ulja ili drugih nutricina),

- četiri skupine jaja su dobivene od nesilica koje su hranjenje krmnim smjesama različitog sastava uz dodatak različite koncentracija ribljeg, lanenog i repičinog ulja te drugih nutricina:

Skupina 1: dodatak 0,3 % ribljeg ulja

Skupina 2: dodatak 0,9 % ribljeg ulja

Skupina 3: dodatak 1,5 % ribljeg ulja

Skupina 4: dodatak 1,5 % ribljeg ulja uz dodatak drugih nutricina

- domaća jaja (skupina u kojoj su analizirana jaja dobivena od nesilica koje su konzumirale raznovrsnu hranu na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu).

Nakon što su prikupljena, jaja su do analize čuvana u hladnjaku na temperaturi 4 °C.

3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti

3.4.1. Priprema uzorka za analizu tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti

Jaje koje je namijenjeno za analizu prvo je potrebno razdvojiti na bjelanjak i žumanjak. Razdvajanje se radi ručno i oprezno kako ne bi došlo do miješanja dva dijela. Žumanjak se lagano posuši na papirnatom ručniku kako bi se uklonili ostatci bjelanjka na površini žumanjka. Žumanjak se tada prenosi u staklene čaše i oprezno važe, Slika 16.



Slika 16. Pripremljeni uzorak žumanjka za vaganje.

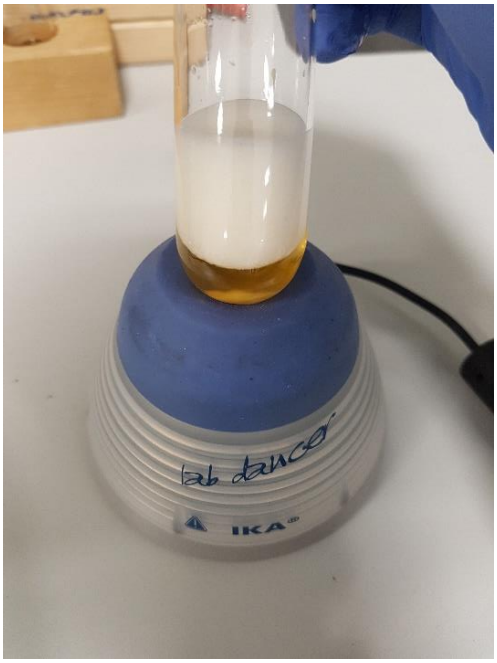
U staklenu epruvetu se oprezno odvaže 0,5000 g uzorka žumanjka na analitičkoj vagi s 4 decimale.

U staklenu epruvetu s uzrokom dodaje se 5 mL 0,4 M otopine kalijeva hidroksida otopljenog u etanolu, sadržaj epruvete se dobro promiješa pomoću laboratorijske tresilice i stavlja u vodenu kupelj na 30 minuta pri temperaturi 50 °C, Slika 17.



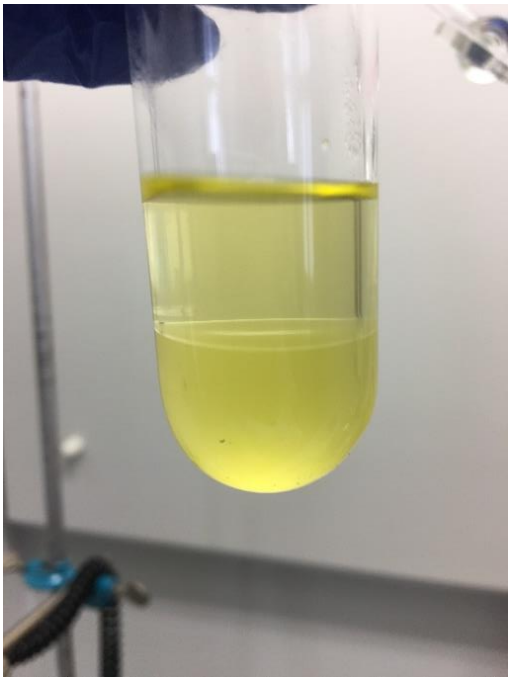
Slika 17. Uzorak žumanjka s kalijevim hidroksidom u vodenoj kupelji.

Nakon 30 minuta, uzorak se izvadi iz vodene kupelji i ostavi se da se ohladi na sobnu temperaturu. Potom se dodaje 5 mL ultračiste vode i ponovo se promiješa na laboratorijskoj tresilici, Slika 18.



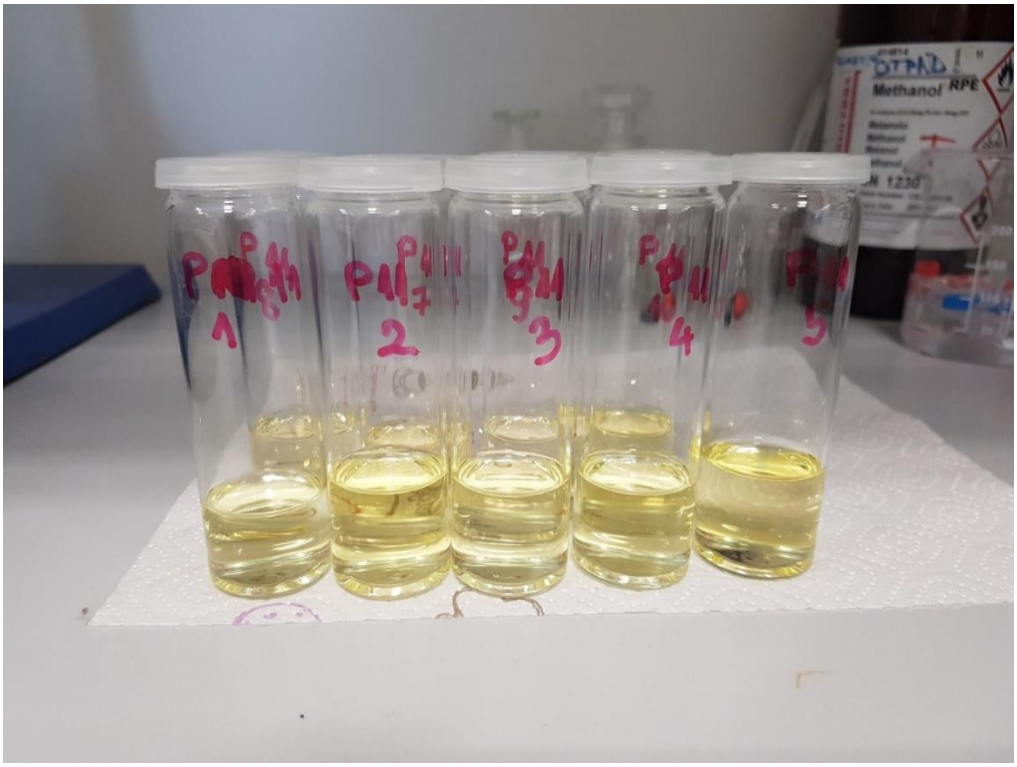
Slika 18. Saponifikacija.

U uzorak se potom dodaje 10 mL n-heksana i ponovi se miješanje. Epruvete sa uzorcima se ostavljaju kako bi se fazni slojevi odvojili, Slika 19.



Slika 19. Ekstrakcija.

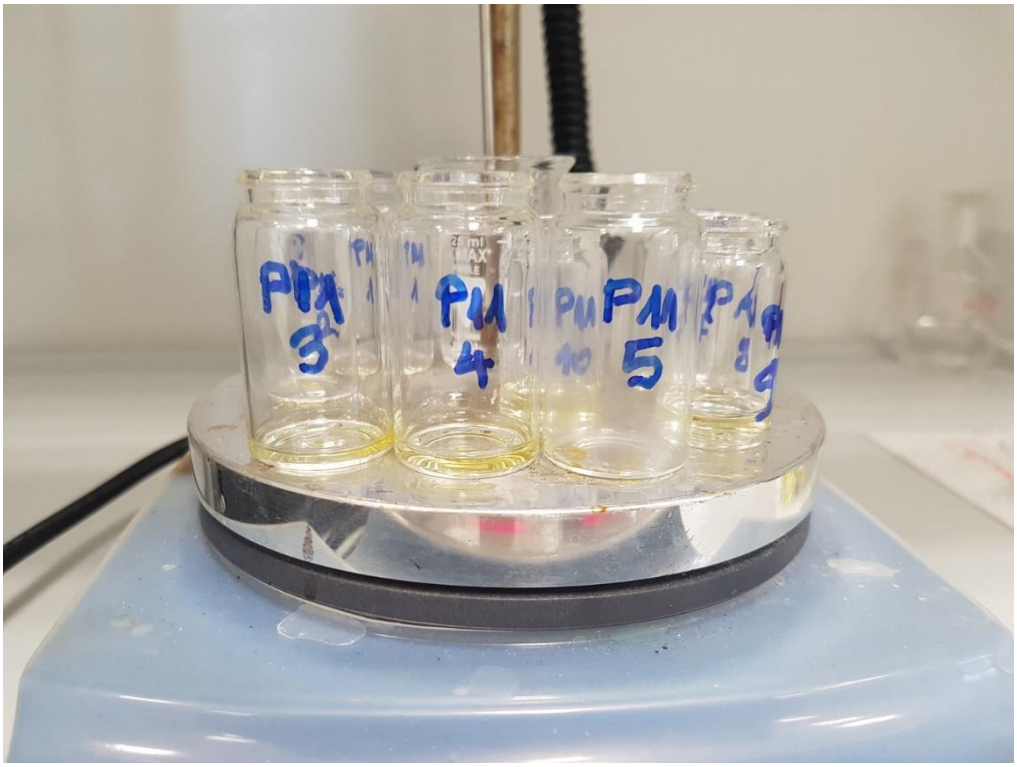
Gornji sloj, odnosno sloj koji sadrži kolesterol otopljen u n-heksanu, oprezno se odvoji kapalicom i prenese se u vialicu s čepom i odmah zatvori. Ekstrakcija se vrši 2 puta kako bi se ekstrahirala maksimalna količina kolesterola, Slika 20.



Slika 20. Prikupljeni organski sloj n-heksana koji sadrži kolesterol.

Prikupljeni organski sloj se tada filtrira kroz filter 0,45µm pomoću plastične štrcaljke kako bi se osigurala čistoća uzorka.

Iz profiltriranog organskog dijela uzima se alikvot od 3 mL, stavlja u HPLC vialicu i polako uparava sve dok otapalo ne ispari, Slika 21.



Slika 21. Uparavanje alikvota organskog sloja n-heksana koji sadrži kolesterol.

U vialicu koja sadrži upareni kolesterol dodaje se 3 mL mobilne faze, sadržaj se dobro promiješa i uzorak je spreman za kromatografsku analizu [23].

3.4.2. Priprema HPLC za analizu i uvjeti analize

Prije početka analize potrebno je isprati cijeli HPLC sustav. Ispiranje se vrši prvo s metanolom, a zatim mobilnom fazom koja će se koristiti u analizi. Kada su tlak i bazna linija stabilni, može se početi s analizama.

Uvjeti analize:

- Protok: 1,2 mL/min
- Temperatura pećnice: 37 °C
- Vrijeme analize: 10 min
- Valna duljina: 210 nm
- Injektirani volumen: 10 µL

Pri mjerenju je korištena kolona Shim_pack GIST, 4,6x250 nm, 5µm, C18 (Shimadzu).

Vrijeme zadržavanja kolesterola je 5,8 minuta.

3.4.3. Kalibracija

Kalibracija ili umjeravanje je postupak kojim se vrši korekcija mjernog instrumenta kako bi se smanjila sistemska pogreška. Korekcija se provodi mjerenjem veličina čije vrijednosti poznajemo.

Kalibracijski pravac konstruira se na način da se mjere apsorbancije serije pripremljenih standardnih otopina čije su koncentracije poznate. Nakon što je izmjerena apsorbancija, izrađuje se kalibracijski pravac uvrštavanjem u dijagram koji prikazuje ovisnost izmjerene apsorbancije i koncentracije mjerenih standardnih otopina.

Serija standardnih otopina kolesterola čije su koncentracije 70, 140, 200, 270, 330 i 400 mg/L pripremljene su razrjeđivanjem osnovne otopine koncentracije 1250 mg/L. Sve otopine se pripremaju korištenjem mobilne faze.

3.4.4. Provjera valjanosti metode

Provjera valjanosti metode provodi se dodavanjem analita čija nam je koncentracija poznata, u realni uzorak. Mjere se tri uzorka: signal analita iz realnog uzorka, signal analita čija koncentracija nam je poznata te signal smjese realnog uzorka i analita poznate koncentracije. Izmjereni signal smjese analita iz realnog uzorka i analita poznate koncentracije treba biti jednak zbroju pojedinačnih signala.

Priprema uzoraka za provjeru valjanosti metode:

Uzorak 1: 500 μL otopine standarda 200 mg/L + 500 μL mobilne faze,

Uzorak 2: 500 μL otopine realnog uzorka + 500 μL mobilne faze,

Uzorak 3: 500 μL otopine standarda 200 mg/L + 500 μL otopine realnog uzorka.

3.5. Izračunavanje sadržaja kolesterola u jajima

Koncentracija kolesterola u jajima u programu Lab Solutions izražava se kao mg/L. U većini provedenih istraživanja, koncentracija se izražava kao miligrami kolesterola u 100 g žumanjka pa je dobivenu vrijednost potrebno preračunati.

Vrijednosti potrebne za izračun:

m (žumanjka) = 0,500 g
V (n-heksana koji se koristi za ekstrakciju) = 20 mL
V (injektiranog uzorka) = 10 µL
m (kolesterola, rezultat HPLC analize)

$$m(\check{z}umanjka\ u\ 1\ mL\ n-heksana) = \frac{m\ (\check{z}umanjka)[g]}{V(n-heksana\ koji\ se\ koristi\ za\ ekstrakciju)[mL]}$$

$$m(\check{z}umanjka\ u\ 10\ \mu L) = \frac{m(\check{z}umanjka\ u\ 1\ mL\ n-heksana)[g] \cdot V(injektiranog\ uzorka)}{1000\ \mu L}$$

$$m(kolesterola\ u\ 10\ \mu L) = \frac{m(rezultat\ HPLC\ analize)[\mu g] \cdot 10\ \mu L}{1000\ \mu L}$$

$$OMJER = \frac{m(kolesterola\ u\ 10\ \mu L)}{m(\check{z}umanjka\ u\ 10\ \mu L)} = m(kolesterola)[\mu g/g]$$

$$m(kolesterola)[mg/g] = \frac{m(kolesterola)[\mu g/g]}{1000}$$

$$m(kolesterola)[mg/100\ g] = (kolesterola)[mg/g] \cdot 100$$

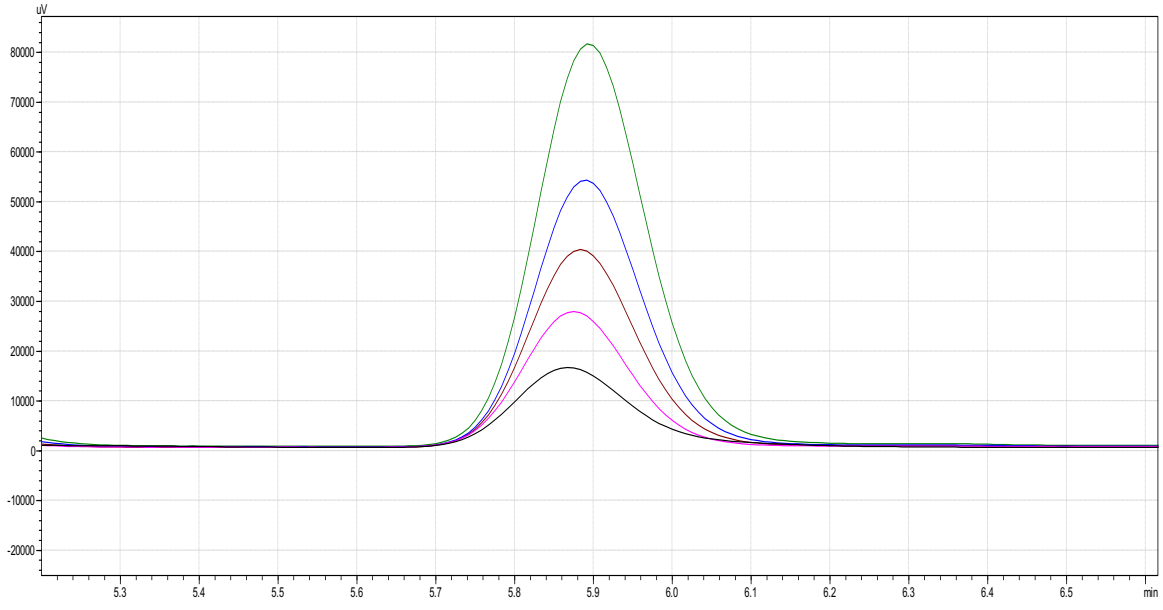
4. Rezultati i rasprava

4.1. Kalibracijski pravac

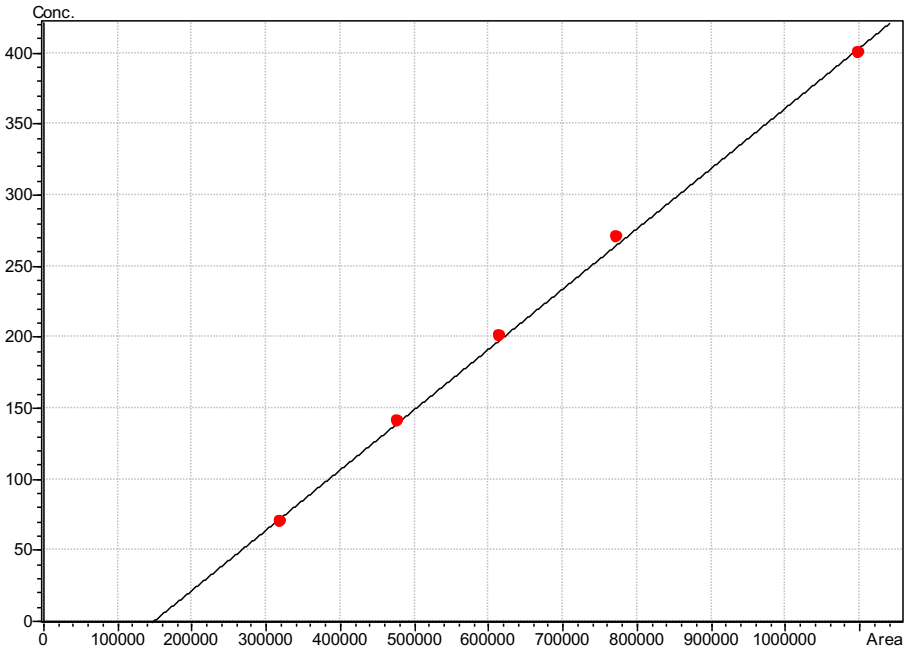
Kalibracijski pravac izrađen je mjerenjem apsorbancije pripremljenih standardnih otopina čije su koncentracije 70, 140, 200, 270, 330 i 400 mg/L (Tablica 2., Slika 22.). Nakon što je izmjerena apsorbancija, izrađen je kalibracijski pravac pomoću programa Lab Solutions, upravljačkog programa korištenog HPLC uređaja (Slike 23. i 24.). Izračunati koeficijent determinacije R^2 iznosi 0,99926 što pokazuje dobro slaganje između regresijskog pravca i izmjerenih vrijednosti što znači da je metoda pogodna za mjerenje koncentracije kolesterola.

Tablica 2. Rezultati dobiveni mjerenjem apsorbancije serije standardnih otopina.

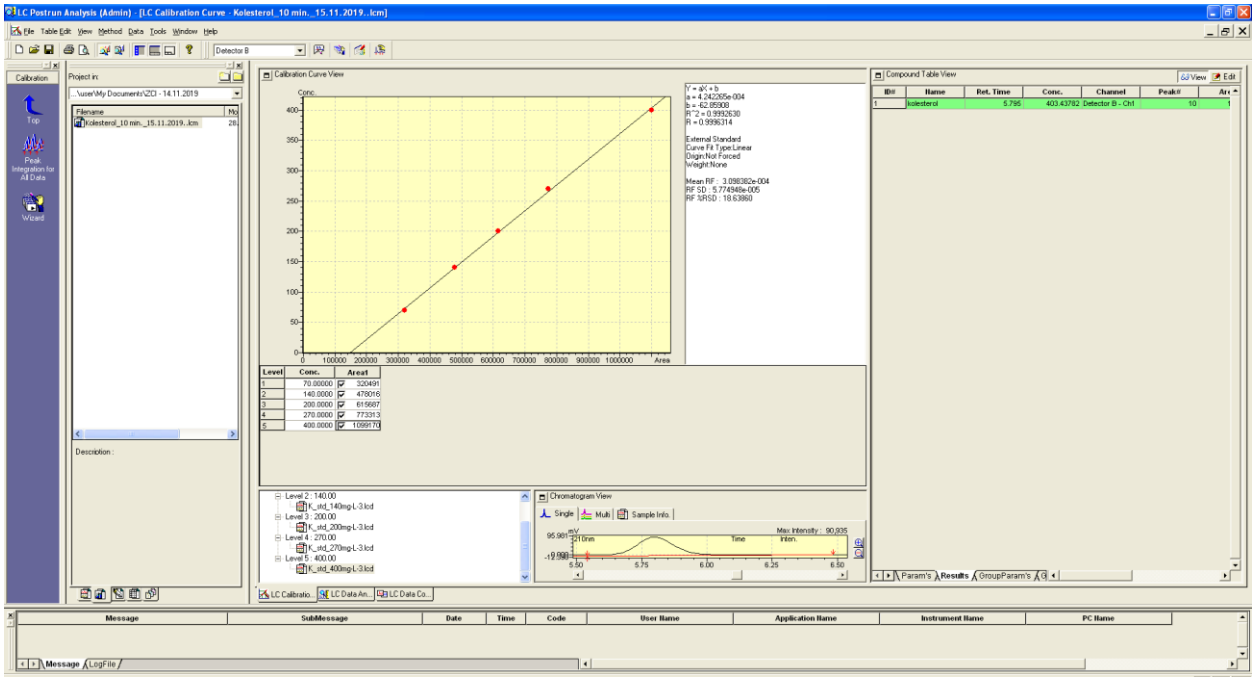
koncentracija standarda (mg/L)	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)
70	320491	19246	73,102
140	478016	35192	139,928
200	615687	48529	198,332
270	773313	64255	265,201
400	1099170	95997	403,438



Slika 22. Kromatogram serije standardnih otopina
(— 70 mg/L, — 140 mg/L, — 200 mg/L, — 270 mg/L, — 400 mg/L).



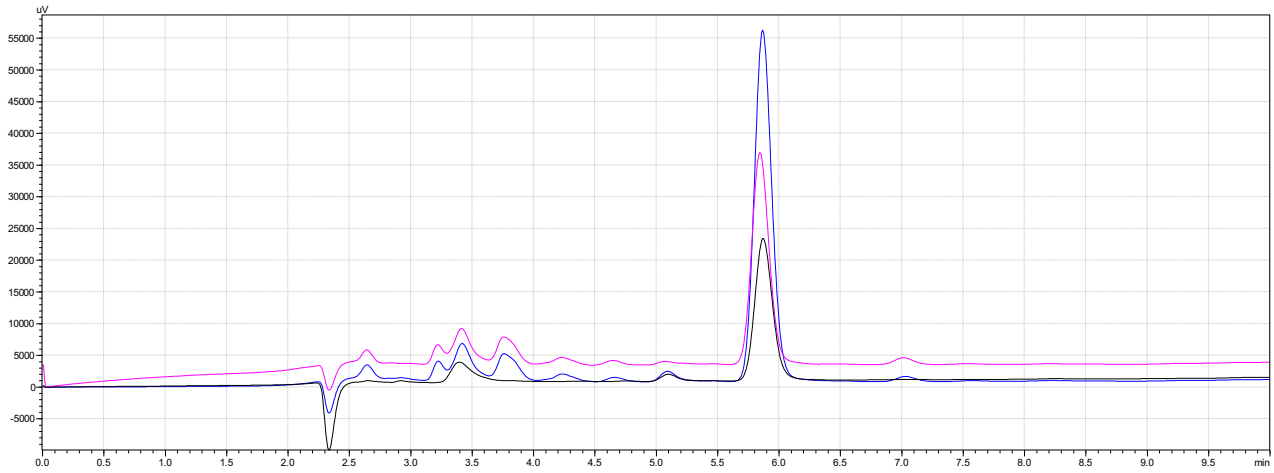
Slika 23. Kalibracijski pravac.



Slika 24. Prikaz kalibracijske krivulje u programu Lab Solutions.

4.2. Provjera valjanosti metode

Provjera valjanosti metode provedena je na ranije opisani način a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 25. i u Tablici 3.



Slika 25. Kromatogrami uzoraka korištenih za provjeru valjanosti metode (Uzorak 1 —, Uzorak 2 —, Uzorak 3 —).

Tablica 3. Vrijednosti dobivene mjerenjem apsorbancije uzoraka za provjeru valjanosti metode.

uzorak	**površina pika (mV/s)**	**visina pika (mV)**	**mg/L (ppm)**
1	288115	23980	62,91
2	395923	34848	105,10
3	741218	57449	180,59
teoretski	**684038**	**58828**	**168,01**
% iskorištenja	**108,36**	**97,66**	**107,49**

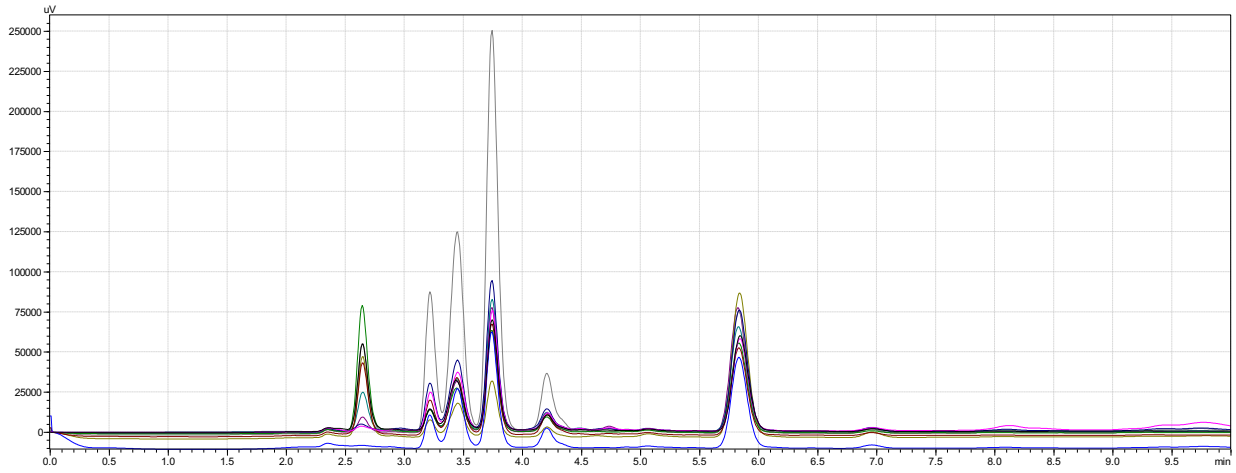
Dobro slaganje očekivanih i dobivenih vrijednosti potvrdilo je prihvatljivost metode za određivanje sadržaja kolesterola.

4.3. Određivanje koncentracije kolesterola u realnim uzorcima

Kolesterol je određivan u šest skupina jaja. Svaka skupina je sadržavala deset jaja koja su za analizu pripremljena na prethodno opisan način. Prema literaturnim podacima, prosječan sadržaj kolesterola u svježem žumanjku iznosi 1255 mg/100 g žumanjka odnosno 350 mg/100 g cijelog jaja [24].

Rezultati dobivenih vrijednosti koncentracije kolesterola unutar svake skupine opisani su standardnom pogreškom (standardnom devijacijom, SD), relativnom standardnom pogreškom (relativna standardna devijacija, RSD), intervalom pouzdanosti.

Rezultati analize za kontrolnu skupinu prikazani su na Slici 25. i u Tablici 4.



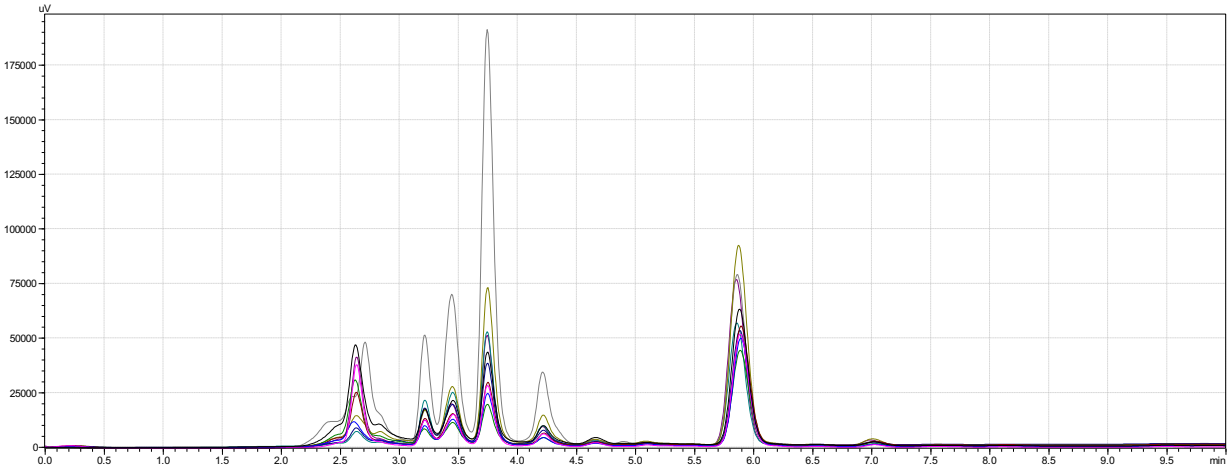
Slika 25. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola u uzorcima kontrolne skupine.

Tablica 4: Koncentracija kolesterola u kontrolnoj skupini uzoraka.

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	680853	69001	232,19	928,75
2	819919	83094	279,61	1118,45
3	686130	69535	233,99	935,95
4	786000	79657	268,05	1072,18
5	816566	82754	278,47	1113,87
6	750545	75912	255,54	1022,17
7	819796	90311	315,46	1261,86
8	755494	76565	257,64	1030,57
9	799540	81029	272,66	1090,65
10	790414	77573	272,46	1089,82
srednja vrijednost	765051,27	77235,53	261,18	**1044,71**
SD	51907,86	5177,50	17,92	71,68
RSD (%)	6,78	6,70	6,86	6,86
interval pouzdanosti (±)	33912,51	3382,57	11,71	46,83

Koncentracija kolesterola u uzorcima kontrolne skupine je 17% manja u odnosu na literaturne podatke. Relativna standardna pogreška je prihvatljive vrijednosti (veća od 5%) s obzirom da su analizirani biološki uzorci. Priroda uzorka utječe i na vrijednost standardne pogreške koja je nešto veća. Iz obrade podataka izuzete su vrijednosti uzorka broj 7 jer je dobivena koncentracija znatno veća od prosjeka.

Rezultati analize za prvu skupinu prikazani su na Slici 26. i u Tablici 5.



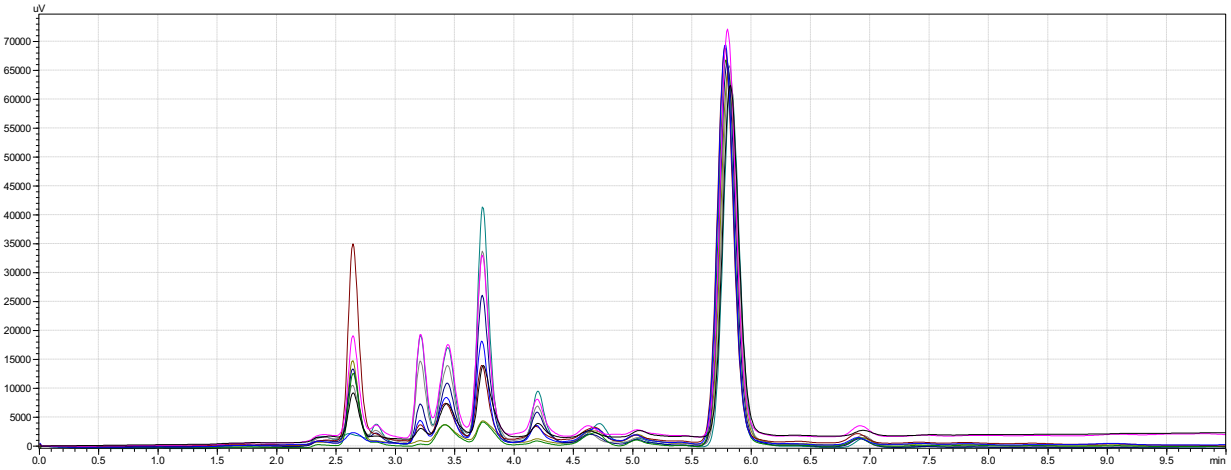
Slika 26. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola u uzorcima prve skupine.

Tablica 5. Koncentracija kolesterola u prvoj skupini uzoraka.

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	661748	62911	217,87	871,49
2	544139	52076	167,98	671,92
3	516887	49826	155,57	622,28
4	569010	54990	178,53	714,12
5	455205	43879	130,25	521,00
6	543632	52722	167,76	671,06
7	956613	91901	346,78	1387,12
8	810474	78738	280,97	1123,86
9	577302	56423	182,05	728,19
10	786575	76675	270,83	1083,31
Srednja vrijednost	626220,88	60545,13	202,69	**810,78**
SD	114706,60	11291,14	48,78	195,11
RSD (%)	18,32	18,65	24,06	24,06
interval pouzdanosti (±)	79486,16	7824,22	33,80	135,20

Koncentracija kolesterola u uzorcima prve skupine je 35% manja u odnosu na literaturne podatke. Kod ove skupine vrijednost relativne standardne pogreške je znatno veća od 5% zbog prirode uzoraka. Standardna pogreška je veća u odnosu na kontrolnu skupinu. Iz obrade podataka izuzete su vrijednosti uzoraka pod brojem 5 i 7 jer dobivene koncentracije znatno odstupaju od prosjeka.

Rezultati analize za drugu skupinu prikazani su na Slici 27. i u Tablici 6.



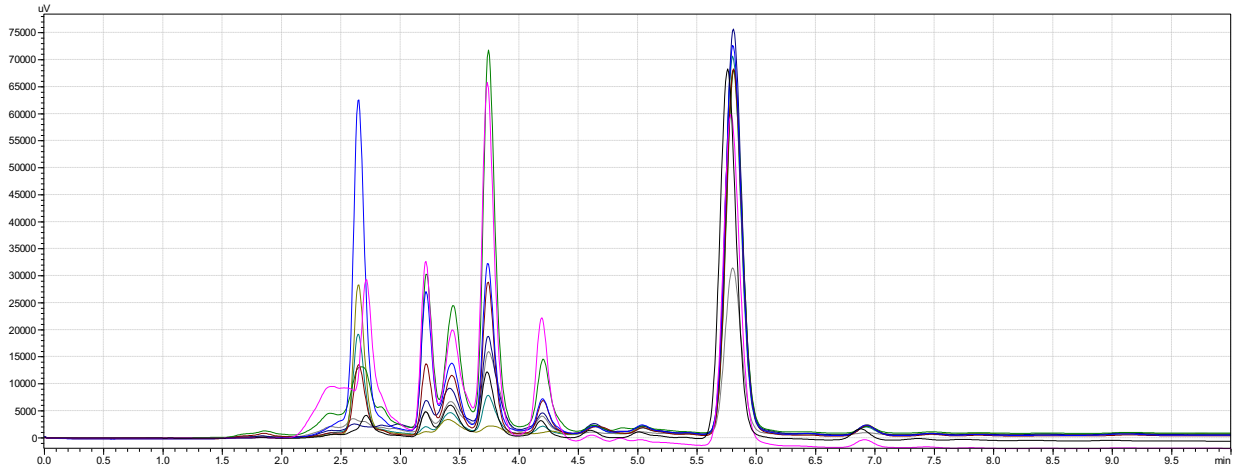
Slika 27. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola u uzorcima druge skupine.

Tablica 6. Koncentracija kolesterola u drugoj skupini uzoraka

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	627573	61099	203,37	813,50
2	747413	71015	254,21	1016,85
3	706475	69413	236,85	947,39
4	697289	98886	232,95	931,80
5	664994	66978	219,25	877,00
6	665069	66490	219,28	877,12
7	641100	64628	209,11	836,45
8	677963	65895	244,75	979,00
9	637896	62707	207,75	831,01
10	654166	63261	214,66	858,62
Srednja vrijednost	663613,89	68817,44	220,89	**883,54**
SD	26780,36	11549,63	14,28	57,12
RSD (%)	4,04	16,78	6,47	6,47
interval pouzdanosti (±)	17496,18	7545,62	9,33	37,32

Koncentracija kolesterola u uzorcima druge skupine je 30% manja u odnosu na literaturne podatke. I kod ove skupine vrijednost relativne standardne pogreška je veća od 5% no slične vrijednosti kao i kod kontrolne skupine. Vrijednost standardne pogreške je manja u odnosu na kontrolnu skupinu. Iz obrade podataka izuzete su vrijednosti uzorka broj 2 jer je dobivena koncentracija znatno veća od prosjeka.

Rezultati analize za treću skupinu prikazani su na Slici 28. i u Tablici 7.



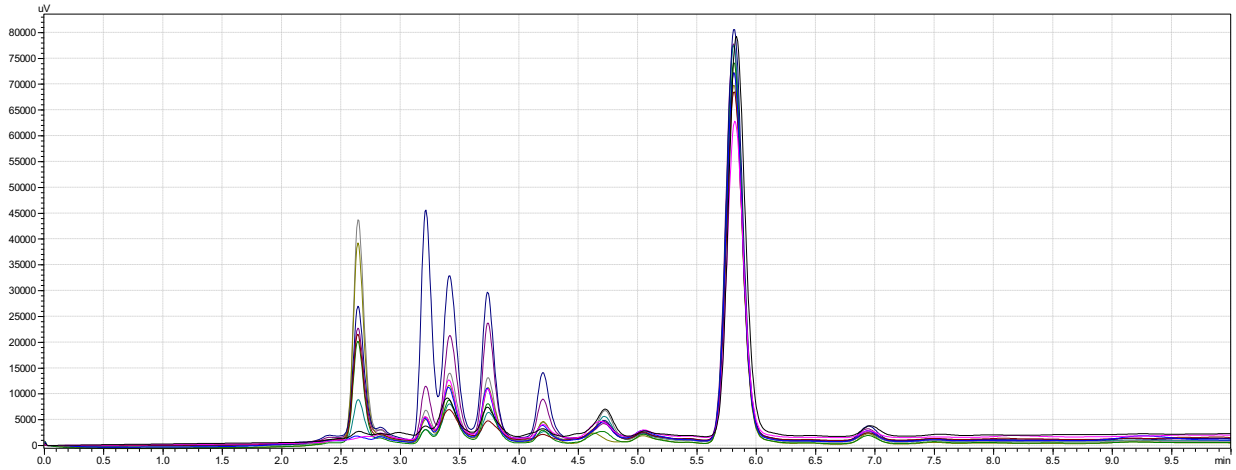
Slika 28. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola u uzorcima treće skupine.

Tablica 7. Koncentracija kolesterola u trećoj skupini uzoraka.

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	676410	68498	224,09	896,37
2	707086	71605	234,26	937,02
3	734622	72502	248,79	995,15
4	694926	68183	231,95	927,79
5	684837	67555	227,67	910,67
6	695179	68575	231,11	924,42
7	787385	75408	271,17	1084,68
8	683582	67733	227,13	908,54
9	358039	38493	100,48	401,94
10	719480	70368	242,36	969,45
Srednja vrijednost	709278,58	70047,41	237,61	**950,45**
SD	34631,32	2666,95	14,79	59,17
RSD (%)	4,88	3,81	6,23	6,23
interval pouzdanosti (±)	22625,38	1742,38	9,66	38,66

Koncentracija kolesterola u uzorcima treće skupine je 24% manja u odnosu na literaturne podatke. Vrijednost relativne standardne pogreška je veća od 5%, no ne značajno. Standardna pogreška je slične vrijednosti standardne pogreške druge skupine. Iz obrade podataka izuzete su vrijednosti uzorka broj 9 jer je dobivena koncentracija znatno manja od prosjeka.

Rezultati analize za četvrtu skupinu prikazani su na Slici 29. i u Tablici 8.



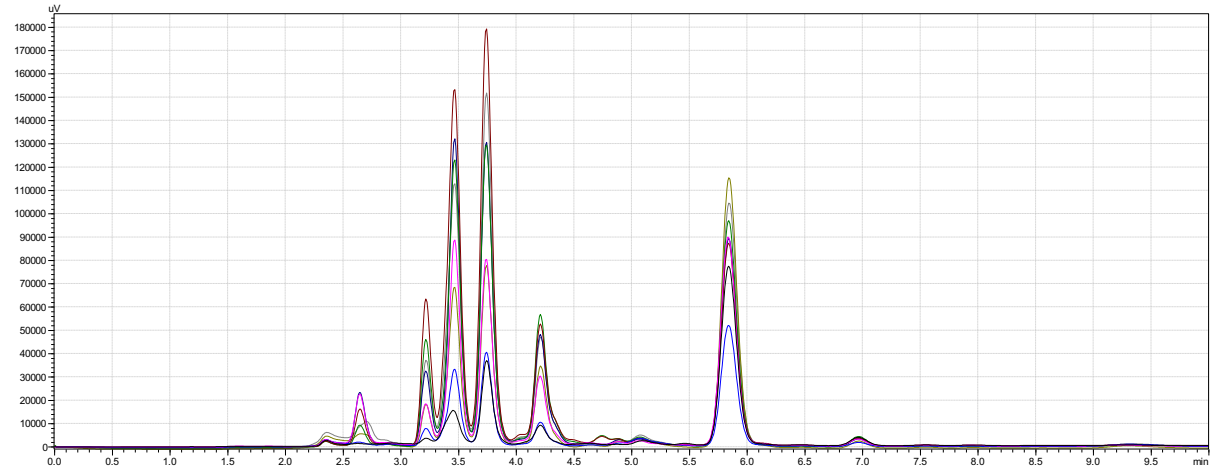
Slika 29. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola u uzorcima četvrte skupine

Tablica 8. Koncentracija kolesterola u četvrtoj skupini uzoraka.

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	624330	61062	209,84	839,34
2	655680	61733	215,30	861,19
3	736641	71761	249,64	998,57
4	662617	67605	218,24	872,96
5	763158	74014	260,89	1043,57
6	631765	61789	212,33	849,34
7	713251	69759	239,72	958,88
8	729888	71848	246,78	987,11
9	779922	76987	268,00	1072,02
10	767537	77055	262,75	1051,00
srednja vrijednost	706478,95	69361,35	238,35	**953,40**
SD	58379,06	6133,50	22,63	90,52
RSD (%)	8,26	8,84	9,49	9,49
interval pouzdanosti (±)	36183,05	3801,51	14,03	56,10

Koncentracija kolesterola u uzorcima četvrte skupine je 24% manja u odnosu na literaturne podatke. Vrijednost relativne standardne pogreška je veća od 5%, no prihvatljive vrijednosti kao i vrijednost standardne pogreške.

Rezultati analize za skupinu domaćih jaja prikazani su na Slici 30. i u Tablici 9.



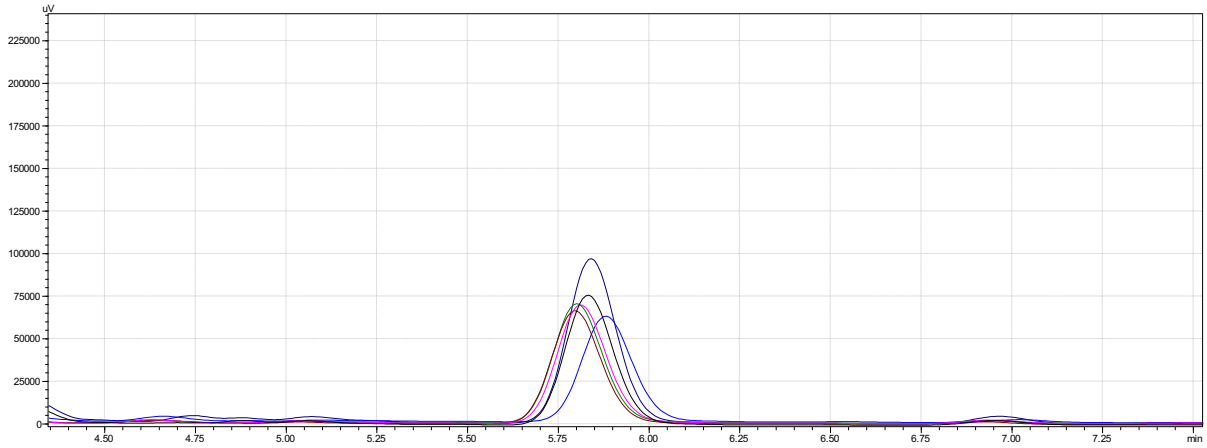
Slika 30. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije kolesterola u uzorcima domaćih jaja.

Tablica 9. Koncentracija kolesterola u skupini uzoraka domaćih jaja.

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100g žumanjka
1	762856	77097	260,76	1043,06
2	908885	89857	322,71	1290,86
3	518294	52100	157,02	628,06
4	864003	86992	303,67	1214,70
5	973650	97125	350,19	1400,76
6	881077	89220	310,92	1243,67
7	1170597	116235	433,74	1734,96
8	1043570	104783	379,85	1519,40
9	784213	78741	285,45	1141,79
10	808716	81202	294,37	1177,46
Srednja vrijednost	910840,71	91250,23	326,85	**1307,41**
SD	132515,34	12863,91	53,30	213,19
RSD (%)	14,55	14,10	16,31	16,31
interval pouzdanosti (±)	86575,10	8404,26	34,82	139,28

Koncentracija kolesterola u uzorcima domaćih jaja je 4% veća u odnosu na literaturne podatke. Vrijednost relativne standardne pogreška je veća od 5%, vrijednost standardne pogreške je najveća u odnosu na sve skupine analiziranih uzoraka što je posljedica prirode uzoraka. Iz obrade podataka izuzete su vrijednosti uzorka broj 3 jer je dobivena koncentracija znatno manja od prosjeka.

Usporedba koncentracija kolesterola po skupinama prikazana je na Slici 31. i u Tablici 10.



Slika 31. Usporedba kromatograma dobivenih određivanjem koncentracije kolesterola u svim skupinama (kontrolna skupina —, prva skupina —, druga skupina —, treća skupina —, četvrta skupina —, domaća jaja —).

Tablica 10. Usporedba koncentracija kolesterola po skupinama.

skupina	mg/100g žumanjka	mg/L (ppm)	dodatak krmnoj smjesi
kontrola	1044,71	261,18	—
1	810,78	202,69	riblje ulje 0,3%
2	883,54	220,89	riblje ulje 0,9%
3	950,45	237,61	riblje ulje 1,5%
4	953,40	238,35	riblje ulje: 1,5 % + nutricini
domaće	1307,41	326,85	—

Uspoređujući masu kolesterola u 100 g žumanjka po skupinama i dodatak krmnoj smjesi koju su konzumirale nesilice, možemo vidjeti da su najveće koncentracije kolesterola u kontrolnoj skupini jaja koja je dobivena od nesilica koje su hranjene krmnom smjesom bez dodataka i u skupini domaćih jaja koja je dobivena od nesilica koje su konzumirale raznoliku hranu na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu. Dodatak 0,3% ribljeg ulja krmnoj smjesi smanjuje koncentraciju kolesterola od 22,4% a dodatkom 1,5% ribljeg ulja uz dodatak drugih nutricina koncentracija kolesterola manja je za 8,7% u odnosu na kontrolnu skupinu.

S obzirom da se radi o preliminarnom istraživanju i s obzirom na literaturne podatke u kojima je zabilježena koncentracija kolesterola 200-250 ppm u jajima dobivenima od nesilica koje su se hranile krmnom smjesom u kojoj je bilo 1,5 i 3% ribljeg ulja [25] odnosno smanjenje

koncentracije kolesterola od 3% pri dodatku 1,5% ribljeg ulja [26], smanjenje koncentracije od 22,4% pri dodatku 0,3% ribljeg ulja u ovom istraživanju treba dodatno ispitati.

Za razliku od navedenih istraživanja, dodatak 1,5% odnosno 3% ribljeg ulja u istraživanju koje su proveli Ceylan i sur. (2011), nije utjecalo na smanjenje koncentracije kolesterola [27].

5. Zaključak

U ovome radu istraživan je utjecaj dodataka funkcionalnih sastojaka krmnoj smjesi za nesilice na koncentraciju kolesterola u žumanjku jaja. Određivanje koncentracije kolesterola u hrani koju čovjek konzumira je važno jer kolesterol (LDL) utječe na pojavu kardiovaskularnih bolesti.

Kolesterol je određivan u 6 skupina: kontrolna skupina su jaja nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu u izvornome obliku (bez dodataka), 4 skupine uzoraka su jaja nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu koje uz dodatke drugih nutricina sadrže i riblje ulje u udjelima od 0,3%; 0,9%; 1,5% u odnosu na ukupni sadržaj ulja. Zadnja skupina su jaja proizvedena na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.

Uzorci žumanjaka analizirani su pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti s UV detekcijom.

Najviša koncentracija kolesterola (1307,41 mg/100g žumanjka) određena je u domaćim jajima, Nešto niža koncentracija (1044,71 mg/100g žumanjka) određena je u kontrolnoj skupini. Najniže koncentracije kolesterola određene su u skupinama jaja nesilica koje su konzumirale krmnu smjesu s dodatkom ribljeg ulja. Najmanju koncentraciju nalazimo kod skupine s dodatkom 0,3% ribljeg ulja (810,78 mg/100 g žumanjka) a najveću koncentraciju kolesterola kod skupine s dodatkom 1.5% ribljeg ulja (950,45 mg/100g).

Usporedbom svih dobivenih podataka može se zaključiti da obogaćivanjem krmne smjese za nesilice ribljim uljem, u analiziranim uzorcima jaja dobivamo nešto manju koncentraciju kolesterola u odnosu na jaja nesilica koja su konzumirala krmnu smjesu koja nije obogaćena funkcionalnim sastojcima ili pak jaja iz domaćeg uzgoja. Dodatak ribljeg ulja krmnoj smjesi ne utječe na povećanje koncentracije kolesterola u jajima a smanjenje koncentracije kolesterola od 22,4% pri dodatku 0,3% ribljeg ulja, u odnosu na kontrolnu skupinu, treba dodatno ispitati.

6. Literatura

[1] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997 (5. travnja 2020.)

[2] H. Ma, The Journal of American Science 2.1 (2006), 46-50.

[3] J. H. Whei, Y. Xinchi, P. V. Welander, Frontiers in microbiology 7 (2016), 990.

[4] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a5/Sterol.svg/300px Sterol.svg.png (4. travnja 2020.)

[5] L-H Li, Journal of food and drug analysis 27.2 (2019), 375-386.

[6] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[7] D. Sadava, Life: The Science of Biology 9th Edition, The Courier Companies Inc., Philadelphia, (2011).

[8] https://www.icems.kyotou.ac.jp/_wp/wpcontent/uploads/2017/01/cholesterol_img.jpg (7.travnja 2020.)

[9] H. Ohvo-Rekilä, Progress in lipid research 41.1 (2002), 66-97.

[10] P. L. Yeagle, Biochimie 73.10 (1991), 1303-1310.

[11] A. Mcdonald, C. Bowman, Essentials of Biochemistry, Ed-Tech press, Philadelphia 2018.

[12] J. P Incardona, S. Eaton, Current opinion in cell biology 12.2 (2000), 193-203.

[13] M. H Ross, P. Wojciech , Histology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006.

[14] J. P Segrest, Journal of lipid research 42.9 (2001), 1346-1367.

[15] S. Bibow, Nature structural & molecular biology 24.2 (2017), 187.

[16] https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis (7. travnja.2020)

[17] E. J Topol, R. M. Califf, Textbook of cardiovascular medicine, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.

[18] https://www.krenizdravo.rtl.hr/wp-content/uploads/2014/11/ateroskleroza-1.jpg (7. travnja 2020.)

[19] D. S. Goodman, Archives of Internal Medicine 148.1 (1988), 36-69.

[20] D. Jacobs, Circulation 86.3 (1992), 1046-1060.

[21] E. B.Man, J. P. Peters, Journal of Biological Chemistry 101 (1933), 685-695.

[22] R. W. Burke, Clinical chemistry 20.7 (1974), 794-801.

[23] T. G Albuquerque, Food Chemistry 193 (2016), 18-25.

[24] https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/167973/Nutrient_analysis_of_eggs_Analytical_Report.pdf (8. srpnja 2020.)

[25] M. R. Mazalli, D. E. Faria, D. Salvador, D. T. Ito, J. Appl. Poult. Res. 13 (2004), 280-290.

[26] H. Basmacıoğlu, M. Çabuk , K. Ünal, K. Özkan, S. Akkan, H. Yalçın, South African Journal of Animal Science 33 (2003), 266-273.

[27] N. Ceylan, I. Ciftçi , C. Mızrak , Z. Kahraman, H. Efil, Journal of Animal and Feed Sciences 20 (2011), 71–83.

7. Životopis

Luka Dornjak
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer
Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

Osobni podatci:

Adresa: Marina Držića 8, 31431 Čepin
luka.dornjak@gmail.com
095/526-2401
Datum i mjesto rođenja: 18.06.1996, Osijek

Obrazovanje:

2018. – 2020. Sveučilišni diplomski studij na Odjelu za kemiju; istraživački smjer, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
2015. – 2018. Sveučilišni preddiplomski studij na Odjelu za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
2011. – 2015. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića Osijek, smjer: ekološki tehničar
2003. – 2011. Osnovna škola Miroslav Krleža, Čepin

Ostale aktivnosti:

2020./2019./2018. sudjelovanje na Smotri Sveučilišta J.J Strossmayera
2020. – Sudjelovanje na radionici „Vježbajte (kemiju) s nama“ Odjela za kemiju
2019./2018. sudjelovanje na Danima otvorenih vrata Sveučilišta J.J Strossmayera
2019./2020. član Studentskog zbora Odjela za kemiju
2019. – Sudjelovanje na konferenciji „Dani mladih istraživača“
2019. – Demonstrator na kolegiju Praktikum analitičke kemije 2