

Određivanje slobodnih masnih kiselina u biološkom materijalu

Bošković, Anđelina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:829192>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Anđelina Bošković

7116/BT

**ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA U
BIOLOŠKOM MATERIJALU**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Ivone Jakaša

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

Određivanje slobodnih masnih kiselina u biološkom materijalu

Anđelina Bošković, 0058207159

Sažetak: U radu je opisana biološka uloga slobodnih masnih kiselina i poveznica između njihove povišene koncentracije i poremećaja stanja organizma poput inzulinske rezistencije i srčanih bolesti. Cilj je ovog rada prikazati redoslijed postupaka pri analizi dugolančanih masnih kiselina iz krvi i krvnih derivata. Ti postupci uključuju ekstrakciju masnih kiselina „zlatnim“ standardnim metodama prema Folchu i prema Bligh i Dyeru, analizu primjenom plinske i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti kojima prethodi neophodna derivatizacija ovisno o uporabi korištenog sustava za detekciju.

Ključne riječi: slobodne masne kiseline, ekstrakcija, derivatizacija, plinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Rad sadrži: 31 stranicu, 7 slika, 68 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10
000 Zagreb**

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Ivone Jakaša

Datum obrane: 19. 9. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Science
Scientific field: Biotechnology**

Determination of free fatty acids in biological material

Anđelina Bošković, 0058207159

Abstract: This report describes biological role of free fatty acids and relationship between their elevated concentrations and disorders such as insulin resistance and cardiovascular diseases. The aim of this work is to review methods involved in the analysis of long-chain fatty acids in biological fluids. These methods include fatty acids extraction by „gold” standard methods, Folch and Bligh-Dyer procedures, gas and liquid chromatographic analysis which is preceded by necessary derivatization step depending on detection system.

Keywords: free fatty acids, extraction, derivatization, gas chromatography, high performance liquid chromatography

Thesis contains: 31 pages, 7 figures, 68 references

Original in: Croatian

Thesis is printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph D. Ivone Jakaša

Defence date: 19. 9. 2018.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. Masne kiseline.....	2
2.2. Ekstrakcija masnih kiselina.....	8
2.3. Analiza dugo lančanih masnih kiselina	11
2.3.1. Plinska kromatografija kao metoda za određivanje dugo lančanih masnih kiselina	11
2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kao metoda za određivanje dugo lančanih masnih kiselina.....	20
3. Zaključak.....	25
4. Popis literature.....	26

1. UVOD

Lipidi se općenito definiraju kao molekule slabo topljive u vodi, a dobro topljive u organskim otapalima, raznovrsni su po svojoj kemijskoj strukturi i funkciji koju imaju u živim organizmima. Masne kiseline prisutne u humanim stanicama i krvi pojavljuju se kao slobodne ili kao esterificirane u obliku triglicerida i fosfolipida. Slobodne masne kiseline (eng. free fatty acids, FFA) pretežno se u krvi pojavljuju kao anioni i služe kao supstrati za proizvodnju energije, a samo 0,01 % (Saifer i Goldman, 1961) ih je zapravo slobodno u krvi. Dugolančane masne kiseline su hidrofobne molekule, njihov dugi ugljikovodični lanac ih čini netopljivima u krvi pa se prenose vezane na lipoproteine, a važni su jer visoke razine lipoproteina niske gustoće (eng. low density lipoproteins, LDL) i niske razine lipoproteina visoke gustoće (eng. high density lipoproteins, HDL) predstavljaju vodeće čimbenike rizika aterosklerotske bolesti srca. Osim FFA vezane na lipoproteine, neke su vezane na najzastupljeniji protein krvne plazme albumin čija je glavna uloga da služi kao transportni protein za anione uključujući FFA. Koncentracija masnih kiselina može dosta reći o fiziološkom stanju organizma, jedine su komponente adipoznog tkiva koje predstavljaju poveznicu između pretilosti i rezistencije na inzulin (Boden, 2011).

S obzirom na broj analitičkih metoda za njihovo određivanje dostupan u literaturi cilj ovog rada dati je pregled analitičkih metoda za određivanje slobodnih masnih kiselina u krvi i derivatima krvi koje uključuje metode ekstrakcije počevši od tzv. „zlatnih“ standardnih metoda u koje ubrajamo metode prema Folchu ili Bligh-Dyeru, njihovu derivatizaciju za prevođenje u kemijski oblik pogodan za instrumentalnu analizu primjenom plinske ili tekućinske kromatografije u sprezi s prikladnim detektorima.

2. TEORIJSKI DIO

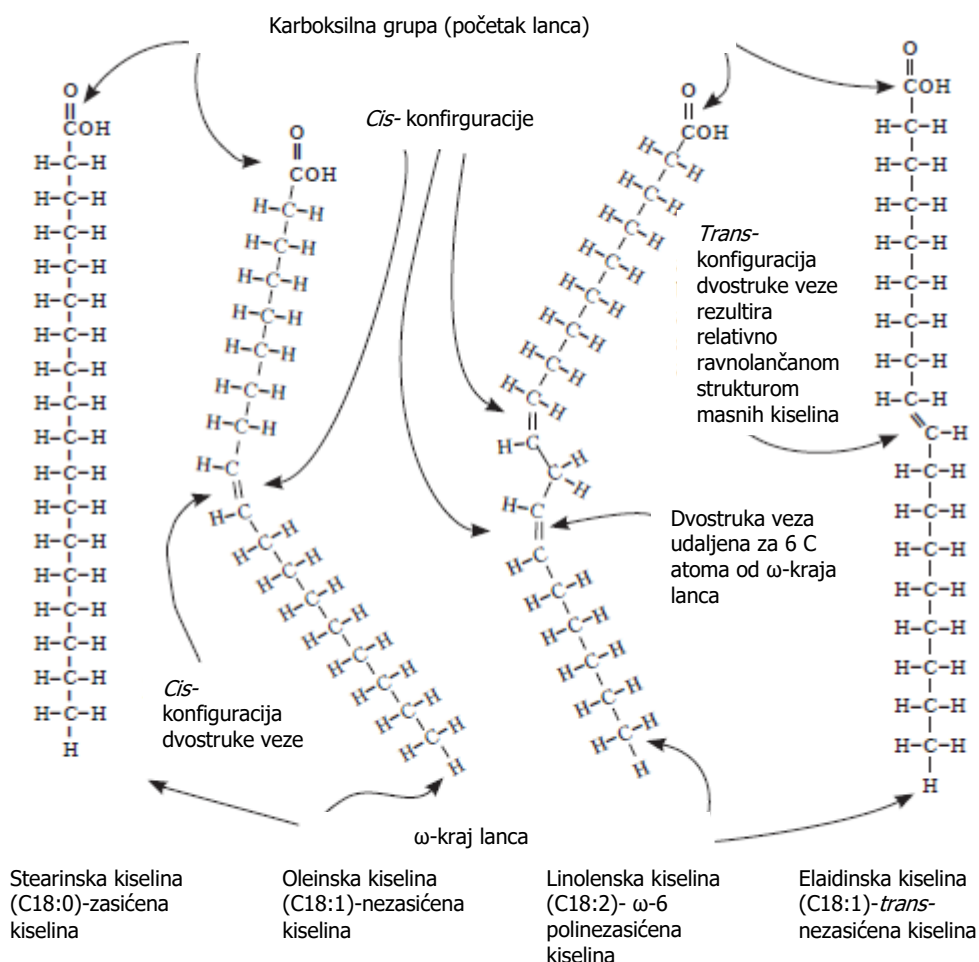
2.1. Masne kiseline

Masne kiseline najjednostavniji su lipidi u prirodi koje karakterizira hidrofilna glava koju predstavlja karboksilna skupina i hidrofobni lanac. Masne kiseline klasificiraju se s obzirom na duljinu lanca, odnosno broju ugljikovih (C) atoma u molekuli ili prema stupnju zasićenosti. Po broju C atoma u molekuli dijele se na kratkolančane (1–6 C atoma), srednjedugolančane (6–12 C atoma), dugolančane (12–20 C atoma) i jako dugolančane masne kiseline (>20 C atoma). Prema stupnju zasićenosti dijeli ih se na zasićene (eng. saturated fatty acids, SFA), mononezasićene (eng. monounsaturated fatty acids, MUFA) i polinezasićene masne kiseline (eng. polyunsaturated fatty acids, PUFA). Obzirom na važnost njihovih uloga rad će se osvrnuti na masne kiseline u ljudskom organizmu čiji hidrofobni lanci su dugački, nerazgranati i nesupstituirani za razliku od masnih kiselina nižih organizama (<http://www.cyberlipid.org>).

Zasićene masne kiseline karakterizira alifatski lanac i jednostruke veze među ugljikovim atomima. Prema IUPAC-ovoj (eng. International Union of Pure and Applied Chemistry) nomenklaturi ime se dodjeljuje prema broju C atoma tako da se odgovarajućem nazivu alkana doda nastavak –ska kiselina. Na primjer, masna kiselina koja u svojoj strukturi ima 16 C atoma naziva se heksadekanska **kiselina**, međutim u upotrebi su i trivijalna imena pa se spomenuta kiselina naziva i palmitinska kiselina, a ime je dobila po palminom ulju u kojem je pronađena. Najvažnije fizikalno svojstvo masnih kiselina je temperatura tališta jer je specifična za svaku masnu kiselinu, a ovisi o duljini i strukturi lanca, stupnju zasićenosti te položaju nezasićene veze u lancu. Kod zasićenih alifatskih masnih kiselina temperatura tališta raste s porastom duljine lanca (Anneken i sur., 2012; Kunau, 1976). Topljivost masnih kiselina u vodi proporcionalna je porastu temperature, a obrnuto proporcionalna porastu duljine hidrofobnog lanca (Anneken i sur., 2012). Tako će masne kiseline s kratkim hidrofobnim lancem biti topljive u vodi (<http://lipidbank.jp>).

Mononezasićene masne kiseline u svojoj strukturi sadrže jednu nezasićenu vezu. Ime se dodjeljuje, analogno slučaju zasićenih masnih kiselina, prema broju C atoma odgovarajućeg alkena kojem se dodaje nastavak –ska kiselina, kod čega je potrebno navesti položaj dvostruke veze. Položaj dvostruke veze može se odrediti na dva načina, ovisno u odnosu na koji kraj molekule se promatra. Jedan način jest da se položaj odredi

prema karboksilnoj skupini koja se uzima kao početak molekule i čiji se C atom numerira kao prvi. U slučaju palmitoleinske odnosno Δ^9 -heksadecenske **kiseline** zna se da je dvostruka veza smještena na 9. C atomu u odnosu na karboksilnu skupinu. Osim ovakvog pristupa položaj dvostruke veze može se odrediti polazeći od zadnjeg C atoma u hidrofobnom lancu u molekuli koji se prema grčkoj abecedi naziva omega (ω)-C atomom tako je palmitoleinska ω -7 masna kiselina jer se dvostruka veza nalazi na 7. C atomu u odnosu na krajnji C atom molekule (Hamilton, 2008). Prirodne nezasićene masne kiseline imaju *cis*- ili Z (njem. zusammen) konfiguraciju koja omogućuje savijanje molekule (slika 1) čega je posljedica niža temperatura tališta u odnosu na zasićene masne kiseline, nezasićene masne kiseline koje imaju *trans*- ili E (njem. entgegen) konfiguraciju strukturno su sličnije zasićenim masnim kiselinama, stoga imaju više temperature tališta od nezasićenih masnih kiselina (Anneken i sur., 2012; Hamilton, 2008; Kunau, 1976).



Slika 1. Nomenklatura masnih kiselina (prema Lawrence, 2010)

Polinezasićene masne kiseline u svojoj strukturi sadrže dvije i više nezasićenih dvostrukih veza. Razlikuju se dvije skupine polinezasićenih masnih kiselina, omega 3 (ω -3)

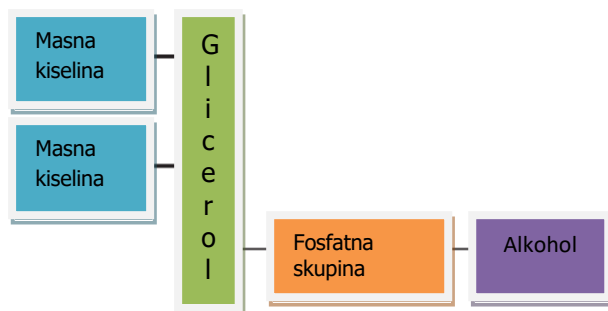
i omega 6 (ω -6) kiseline od kojih su α -linolenska (18:3, ω -3) i linolna (18:2, ω -6) esencijalne masne kiseline. Esencijalne masne kiseline su one koje organizam sisavaca ne može sam sintetizirati jer im nedostaju enzimi Δ^{12} i Δ^{15} desaturaze (Ferreri i Chatgililoglu, 2015) i oksidaze s miješanom funkcijom koje kataliziraju reakciju oksidacije masne kiseline i time nastanak dvostruke veze iza 9. C atoma u odnosu na karboksilnu skupinu, stoga ih je potrebno unositi hranom (Lawrence, 2010). Druge važne polinezasićene masne kiseline su eikozapentaenska (EPA, 20:5, ω -3), dokozaheksaenska (DHA, 22:6, ω -3), γ -linolenska (18:3, ω -6) i arahidonska (20:4, ω -6) koje nastaju od svojih prekursora α -linolenske i linolne pa se nazivaju uvjetno esencijalnim masnim kiselinama (Ferreri i Chatgililoglu, 2015; Enig, 2000). Porastom broja dvostrukih veza kod polinezasićenih kiselina snižava se temperatura tališta (Anneken i sur., 2012). Polinezasićene masne kiseline podložne su reakcijama oksidacije, a podložnost oksidaciji raste s povišenjem temperature i povećanjem broja dvostrukih veza u strukturi (Anneken i sur., 2012; Hamilton, 2008). Prema tome zasićene masne kiseline su manje podložne oksidaciji od mononezasićenih dok su mononezasićene manje podložne od polinezasićenih masnih kiselina. Kao posljedica oksidacije polinezasićenih masnih kiselina javljaju se neugodan okus i miris namirnica koje ih sadrže, stoga se biljna ulja u prehrambenoj industriji podvrgavaju kemijskom procesu hidrogeniranja (Anneken i sur., 2012). Katalitičkim hidrogeniranjem moguće je reducirati neke dvostruke veze čime nastaju zasićene ili mononezasićene masne kiseline *trans*- konfiguracije. Prednost hidrogeniranja je produženi rok trajanja i stabilnost nastalih masnih kiselina pri višim temperaturama, međutim veliki nedostatak navedenog procesa pretvorbe je nastanak *trans*-mononezasićenih masnih kiselina koje doprinose povećanju razine ukupnog i LDL kolesterola, a mogu sniziti koncentraciju HDL kolesterola (Lawrence, 2010).

Masne kiseline također čine važan građevni materijal složenih klasa lipida kao što su trigliceridi, fosfolipidi, sfingolipidi, saharolipidi i esteri kolesterola (<http://www.lipidmaps.org>), koji imaju važnu ulogu u organizmu poput sudjelovanja u metaboličkom procesu β -oksidacije i gradnji staničnih membrana, a imaju i aktivne regulatorske uloge. Masne kiseline i njihovi derivati djeluju kao ligandi peroksisom proliferatorno aktiviranih receptora (eng. peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs). To su ligandom aktivirani transkripcijski faktori prisutna u tri podtipa: PPAR α , PPAR γ i PPAR β/δ . Navedeni transkripcijski faktori sudjeluju u metabolizmu lipida i masnih kiselina, a u tom pogledu je najzanimljiviji PPAR γ faktor čiji je izomer γ 2 najviše eksprimiran u adipoznom tkivu (Tyagi i sur., 2010; Kersten i sur., 2000). Receptori

slobodnih masnih kiselina (eng. free fatty acid receptors, FFAR), koji pripadaju obitelji G-spregnutih receptora, imaju ulogu poticanja signala unutar stanice kad se ligandi (kratko i dugolančane masne kiseline) vežu na njihove izvanstanične domene (Nakamura i sur., 2013), a imaju sposobnost kontroliranja razine slobodnih masnih kiselina u probavnom traktu, gušterači, makrofagima i adipoznim tkivu (Binienda i sur., 2013).

Kako ljudsko tijelo ima ograničen kapacitet pohranjivanja glukoze u glikogen višak se pohranjuje u obliku triglicerida koji su esteri alkohola glicerola i triju istih ili različitih masnih kiselina. Procesom glikolize iz glukoze nastaju 2 molekule piruvata koje se potom oksidacijski dekarboksiliraju do acetil-koenzima A (Ac-CoA). Ako se Ac-CoA nalazi u suvišku, započet će sinteza masnih kiselina čijom esterifikacijom s glicerolom nastaju trigliceridi. Proces u kojem iz ugljikohidrata nastaju trigliceridi, naziva se *de novo lipogenesis*. Trigliceridi su pogodni kao molekule za skladište energije jer je C atom u masnim kiselinama više reduciran od onogu ugljikohidratima i proteinima što znači da se njegovom oksidacijom oslobađa najviše energije, uz to su nepolarne pa se pohranjuju u gotovo bezvodnom obliku (Berg i sur., 2012).

Fosfolipidi uz glikolipide i kolesterol čine tri klase lipida koji izgrađuju stanične membrane. Građeni su od glicerola ili sfingozina na koji je vezana jedna ili dvije masne kiseline te fosfatne skupine na koju mogu biti vezani alkoholi (Berg i sur., 2012). Zbog svoje veličine ne tvore micle već lipidni dvostruki sloj kroz kojeg mogu proći samo male lipofilne tvari (kao npr. neki lijekovi) uslijed koncentracijskog gradijenta, iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije, što se naziva lipidnom difuzijom. Iako je membrana izrazito slabo propusna za spojeve topljive u vodi, ione i polarne molekule, njihova se izmjena odvija u najvećem dijelu pomoću proteina vezanih na membranu stanice. Proteini imaju ulogu „nosača“ ili stvaraju tzv. uske kanale koji omogućuju njihov prolazak kroz staničnu membranu procesom aktivne ili pasivne difuzije. Propusnost membrane kontrolirana je sastavom masnih kiselina od kojih su izgrađeni fosfolipidi, tako zasićene masne kiseline čiji se ravni lanci povezuju velikim brojem van der Waalsovih sila i čvršće pakiraju u kristalne strukture, smanjuju propusnost membrane s porastom duljine lanca, dok nezasićene masne kiseline povećavaju propusnost jer su lanci izvijeni pa je membrana više fluidna. Fluidnost, odnosno, krutost stanične membrane ovisi o udjelu kolesterola, a razina kolesterola pak ovisi o tome jesu li građevne jedinice fosfolipida zasićene ili nezasićene masne kiseline (Berg i sur., 2012; Enig, 2000).



Slika 2. Shematski prikaz fosfoglicerida (prema Berg i sur., 2012)

Iako standardne laboratorijske analize masnoća u krvi uključuju određivanje koncentracije ukupnog kolesterola, lipoproteina visoke i niske gustoće kolesterola i triglicerida, saznanja o koncentraciji masnih kiselina može ukazivati na određeno stanje organizma pa je tako poznato da je njihova dugoročno povišena koncentracija zajedno s pretilošću glavni uzrok inzulinske rezistencije (Boden, 2002; Boden 2011; Wilding 2007) - „Inzulinska rezistencija je stanje u kojem inzulin ne može izazvati fiziološke učinke ili barem ne u koncentracijama koje su djelotvorne u zdravih osoba“ (Žmire, 2004). Inzulinska rezistencija s drugim poremećajima poput šećerne bolesti tipa 2, hipertenzije i dislipidemije (povišene koncentracije ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida u krvi) predstavlja glavne faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Boden, 2011). Kod zdravih osoba s inzulinskom osjetljivošću inzulin inhibira lipolizu i time smanjuje koncentraciju slobodnih masnih kiselina u organizmu (Boden, 2011; Metelko i Crkvenčić, 2004) dok kod osoba s inzulinskom rezistencijom dolazi do pojačane lipolize, a time do porasta koncentracije slobodnih masnih kiselina (Metelko i Crkvenčić, 2004; Žmire, 2004). Saznanja o koncentraciji masnih kiselina u krvnoj plazmi može upućivati na (ab)normalno stanje u organizmu i time omogućiti prevenciju razvoja kardiovaskularnih bolesti. Istraživanja utjecaja slobodnih masnih kiselina na razinu kolesterola u krvi opisana su u velikom broju znanstvenih radova te je pokazano da zasićene masne kiseline povisuju LDL i HDL razine kolesterola u krvi. Jedina iznimka je stearinska kiselina koja nema učinak na razinu kolesterola. Nasuprot tome, oleinska i linolna povisuju koncentraciju HDL kolesterola, ali istovremeno, u manjoj mjeri, snižavaju koncentraciju LDL kolesterola. *Trans*- mononezasićene masne kiseline snižavaju koncentraciju HDL, a povisuju koncentraciju LDL kolesterola u krvi (Katan i sur., 1994). Na temelju ovih saznanja, Europska agencija za sigurnost hrane (eng. European Food Safety Agency, EFSA) preporuča što niži dnevni unos zasićenih i *trans*- masnih kiselina, dok nema ograničenja za unos *cis*- mononezasićenih masnih kiselina (Ferrerri i Chatgililoglu, 2015).

Razina masnih kiselina određuje se u krvi, krvnoj plazmi i krvnom serumu. Krv je tekuće vezivno tkivo u kojem su krvne stanice i platele suspendirane u krvnoj plazmi. Plazma je tekući dio krvi, više od 90 % ju čini voda, a od proteina su prisutni albumin, globulini i fibrinogen–faktor zgrušavanja što znači da se krvna plazma izolira prije koagulacije, a kako bi se spriječio taj proces dodaju se antikoagulansi (heparin ili kelatni reagensi poput EDTA i kalijeva oksalata koji vežu kalcijeve ione i time onemogućuju aktivaciju proteina koagulacije). Nadalje krvni serum je krvna plazma bez fibrinogena, –izolacija slijedi nakon koagulacije, a da se ubrza taj proces dodaju se aktivatori koagulacije (trombin ili diatomejska zemlja). Prednost analize krvi jest jednostavnost prikupljanja i rukovanja s uzorcima budući nisu potrebne separacije pojedinih komponenata krvi. Međutim tu se upravo uviđa i nedostatak krvi kao polazne matrice jer predstavlja jako opsežan uzorak čiji sastav masnih kiselina može biti promijenjen zbog drugih faktora poput hematokrita koji predstavlja udio crvenih krvnih stanica u krvi, ovisan o spolu i dobi te može biti promijenjen u stanju trudnoće, plućnih i kardiovaskularnih bolesti (Glaser i sur., 2010) ili promjenama u broju bijelih krvnih stanica uslijed kakvih infekcija (Brenna i sur., 2018). Nedostatak određivanja masnih kiselina u «cijeloj» krvi kao i kod izolacije plazme leži u činjenici da se dodaju antikoagulansi koji mogu utjecati na promjenu koncentracije masnih kiselina (jer izvlače vodu iz stanica). Za razliku od seruma, za izolaciju krvne plazme potrebno je kraće vrijeme obrade (kraće vrijeme centrifugiranja zbog primjene jače centrifugalne sile) (Brenna i sur., 2018), a ujedno se smatra da krvna plazma u većoj mjeri reflektira sastav krvi u odnosu na serum.

Koncentracija masnih kiselina u krvnoj plazmi određuje se kod pretilih osoba kod kojih je velika vjerojatnost pojave inzulinske rezistencije kod koje je utvrđeno da dugoročno povišene koncentracije slobodnih masnih kiselina u plazmi mogu dovesti do stanja inzulinske rezistencije (Boden, 2001; Metelko i Crkvenčić, 2004; Žmire, 2004). Koncentracija masnih kiselina u krvi određuje se nakon noćnog posta kada mišići i jetra koriste slobodne masne kiseline, nastale lipolizom triglicerida, kao izvor energije u nastojanju da se mozgu osiguraju dovoljne količine glukoze (Berg i sur., 2012). Koncentracija slobodnih masnih kiselina nakon noćnog posta u krvnoj plazmi zdravog pojedinca u prosjeku iznosi svega 214 nmol/mL (Quehenberger i sur., 2010). Quehenberger i sur. su pokazali da je najzastupljenija mononezasićena oleinska kiselina (18:1, ω -9) potom zasićena palmitinska (16:0) i zasićena stearinska (18:0). Zajedno, ove tri masne kiseline čine 78 % od ukupnih slobodnih masnih kiselina. Najzastupljenije polinezasićene kiseline su linolna (18:2) i arahidonska (20:4) i zajedno čine oko 8 % od

ukupnih slobodnih masnih kiselina, a esencijalna α -linolenska (18:3, ω -3), eikozapentaenska (20:5, EPA) i dokozaheksaenska (22:6, DHA) čine svega 1 % od ukupnih slobodnih. Glaser i sur. (2010) su u svom radu potvrdili sličan sastav masnih kiselina.

Masne kiseline u krvnom serumu uglavnom su vezane na albumin kao tzv. neesterificirane masne kiseline, a kao slobodne masne kiseline pojavljuju se u malim koncentracijama (Apple i sur., 2005; Richieri i Kleinfeld, 1995). Masne kiseline mogu poslužiti kao biološki indikatori koronarnih bolesti srca jer se sveukupno nalaze u povišenim koncentracijama kod pacijenata koji su doživjeli akutni infarkt miokarda (Bhagavan i sur., 2009; Apple i sur., 2005). Istraživanje je pokazalo da su molarni udjeli (mol/100 mol ukupnih masnih kiselina) dugolančanih omega-3 masnih kiselina i stearinske kiseline bili sniženi kod pacijenata koji su doživjeli prvi infarkt miokarda dok su udjeli oleinske kiseline bili povišeni u odnosu na zdrave pacijente (Yli-Jama i sur., 2002). U usporedbi s razinama masnih kiselina određenima u krvnoj plazmi određen je i sastav masnih kiselina nakon denaturacije albumina gdje se pokazalo da je najzastupljenija opet bila oleinska 33 %, palmitinska 25 %, linolna 20 %, arahidonska 5 %, palmitoleinska 3 %, miristinska 1,5 % i stearinska 1,5 %. 66 % masnih kiselina je nezasićeno, a samo 1 % su činile masne kiseline s 10 ili manje C atoma (Saifer i Goldman, 1961).

2.2. Ekstrakcija masnih kiselina

Ekstrakcija je postupak razdjeljivanja tvari između dvije faze, na temelju različite topljivosti, a koja se međusobno ne miješaju ili se djelomično miješaju. Nakon uspostavljene ravnoteže omjer množinskih koncentracija otopljenih tvari u dvjema fazama koje se ne miješaju konstantan je pri određenoj temperaturi što opisuje Nernstov zakon raspodjele (distribucije) (Eggers i Schwudke, 2016):

$$K(T) = \frac{c_1^A}{c_2^A}$$

u kojem su:

K – Nernstov distribucijski koeficijent pri danoj temperaturi

T – termodinamička temperatura

$c_1(A)$ – množinska koncentracija analita (A) u fazi 1

$c_2(A)$ – množinska koncentracija analita (A) u fazi 2.

Ekstrakcija masnih kiselina iz krvne plazme, odnosno seruma se uglavnom provodi s hlapljivim otapalima zbog mogućnosti njihova uklanjanja uparavanjem što omogućuje povećanje njihove koncentracije kod ponovnog otapanja u manjem volumenu istog ili sličnog otapala pogodnog za daljnju obradu ili izravnu analizu. Prema načelu „slično se otapa u sličnom“ koristit će se blago polarna otapala budući su dugolančane masne kiseline zastupljene u krvi nepolarne, a takvima ih čini njihov dugi hidrofobni lanac. Dakle koriste se ona organska otapala koja omogućuju prevladavanje svih veza (najzastupljenije slabe hidrofobne interakcije, van der Waalsove sile, u manjoj mjeri vodikove i ionske veze dok su kovalentne veze rijetkost) koje molekule lipida ostvaraju sa staničnim komponentama, proteinima i polisaharidima. Kod upotrebe takvih otapala također se ekstrahiraju i druge klase spojeva sličnih svojstava, kao što su na primjer aminokiseline, ugljikohidrati, urea i neke soli, a koji se u većoj mjeri mogu ukloniti dodavanjem određenog volumena vode ili otopine soli nakon čega se sustav razdjeljuje u 2 faze. Važan faktor kod ekstrakcije masnih kiselina je pH vrijednost koja se mora održavati u kiselom području budući tada kiseline ostaju protonirane–nenabijene stoga su topljivije u organskoj fazi. Meng i suradnici su 2007. godine istraživali utjecaj otapala, odnosno smjese otapala i pH u rasponu od 2,5 do 6,8 na efikasnost ekstrakcije dugolančanih masnih kiselina iz krvnog seruma. U svom su radu pokazali da se najveća efikasnost ekstrakcije dugolančanih masnih kiselina iz krvnog seruma postiže smjesom izopropanol:heksan (40:10, v/v) kod pH 3,3.

Do početka 1951. godine uobičajeni postupak za ekstrakciju lipida iz bioloških materijala bila je Bloorova metoda koja se temeljila na ekstrakciji s etanolom, te u drugom koraku nakon uparavanja etanola, izolaciji lipida iz krutog uparenog ostatka sa smjesom dietiletera i etanola. Međutim nedostatak se očitovao u nejednakoj efikasnosti ekstrakcije svih prisutnih lipida u tkivu (Folch i sur., 1951). Potaknut nedostacima prethodnih metoda, španjolski biokemičar Jordi Folch sa suradnicima je 1951. godine objavio jednostavan postupak ekstrakcije lipida iz živčanog tkiva. Postupak se temelji na ekstrakciji sa smjesom otapala koja je imala dvojaki cilj: (i) smjesa organskih otapala mora biti dovoljna polarna da izolira lipide iz staničnih membrana i drugih mjesta na koja su vezana u samoj stanici, ali (ii) opet ne toliko polarna da se nepolarni lipidi ne uspiju ekstrahirati (Iverson i sur., 2001). Ovo prvi zamjećuje Jordi Folch, čija se metoda smatra zlatnim standardom te se i danas široko koristi i smatra najpouzdanijom metodom za ekstrakciju lipida. Metoda se sastoji iz dva jednostavna koraka koja se provode kod 0 °C, a koja ne dovodi do razgradnje termolabilnih lipida. U prvom se koraku tkivo homogenizira sa smjesom

kloroform:metanol (2:1, v/v) kod čega volumetrijski omjer tkiva i smjese otapala za ekstrakciju iznosi 1:20. Zatim se filtriranjem uklanjaju netopljive tvari, a dodatkom velikog volumena vode uklanjaju se i nelipidne tvari. Dodatkom vode dolazi do stvaranja dva sloja metanol-voda (gornja faza) i kloroform (donja faza). Primjenom ove metode u potonji sloj su se ekstrahirali proteolipidi, lipidi i strandin, tvar velike molekulske mase zastupljene u sivoj tvari živčanog tkiva, a topljiva i u vodi i u kloroformu. Strandin je ime dobio po nitima vidljivim kada je suha tvar strandina izložena polariziranom svjetlu (Folch, 1951).

Folch i suradnici 1957. godine dodatno modificiraju prethodno razvijenu metodu za ekstrakciju lipida iz živčanog tkiva u kojoj je krajnji omjer kloroform:metanol:voda 8:4:3 osigurao razdvajanje dviju faza od čega približno 40 % volumnog udjela čini gornji, vodeni sloj. Centrifugiranjem (1000 g na 5-10 min) se može dodatno potaknuti brže razdvajanje faza (Eggers i Schwudke, 2016), a čini se i da navedeni omjer dodatno sprječava stvaranje emulzije koja se pojavljuje kod ekstrakcije lipida kada se kao ekstrakcijsko sredstvo koristi samo kloroform u kombinaciji s vodom (Radin, 1988).

Vodeći se principom koji su osmislili Folch i suradnici, Bligh i Dyer 1959. Godine razvijaju svoju metodu ekstrakcije čija je glavna prednost daleko manji utrošak otapala (1 volumni udio uzorka razrjeđuje se s do 3 volumna dijela smjese kloroform:metanol 1:2, za razliku od Folchove metode gdje se 1 volumni udio uzorka razrjeđuje s do 20 volumna dijela smjese otapala 2:1 kloroform:metanol), stoga i ekonomski isplativija. Metoda korištena za ekstrakciju lipida iz tkiva mišića bakalara koje sadrži oko 80 % vode i 1 % lipida. Tkivo se najprije homogenizira sa smjesom kloroform:metanol (1:2, v/v) kod čega se formira jednofazni sustav. Daljnji dodatak kloroforma i vode potiče nastajanje dvofaznog sustava. Iako se danas koriste različite alternative s obzirom na volumne odnose otapala za ekstrakciju, kod koje je potrebno uzeti u obzir i inicijalnu količinu vode u uzorku ipak se došlo do spoznaje da se najbolji rezultati postižu kada volumetrijski odnosi kloroforma, metanola i vode iznose 1:2:0,8 prije razrjeđivanja te poslije razrjeđivanja 2:2:1,8 (Sündermann i sur., 2016). Količina lipida u gornjoj (vodenoj) fazi iznosi oko 8 mg što je 1 % od ukupne količine lipida te predstavlja zanemariv gubitak. U slučaju masnih kiselina, da se smanji gubitak, odnosno poveća efikasnost ekstrakcije u organsku fazu, razvijena je modificirana, tzv. kisela ili HCl Bligh i Dyer metoda u kojoj se homogenatu tkiva dodaje 1 mL vodene otopine klorovodične kiseline, množinske koncentracije 3 mol dm^{-3} (Jensen, 2008).

Sara Iverson sa suradnicima 2001. godine uspoređuje dvije najcitiranije metode za ekstrakciju lipida iz bioloških uzoraka metode ekstrakcije prema Folchu i prema Bligh i Dyeru. Iako se Bligh i Dyer metoda izvorno primijenila na mišićno tkivo, u izvornom radu navodi se da je primjenjiva na sva druga tkiva koja sadrže 80 % vode (ili su modificirana da sadrže 80 % vode), no uvijek se primjenjivala na tkivima čiji je udio lipida bio ispod 1,5 %. Kako bi utvrdili što se događa kod ekstrakcije lipida iz uzoraka bogatijim lipidima proveden je eksperiment gdje se koristila metoda prema Folchu i prema Bligh i Dyeru. U tu svrhu korišteni su uzorci tkiva ribe u kojem se udio lipida kretao od 0,5 do 26,6 %. Postupci ekstrakcije provedeni su u potpunosti prema protokolima opisanim uputama navedenih metoda. Nakon provedene ekstrakcije, donja faza obogaćena lipidima osušila se u struji dušika, a sadržaj lipida odredio se gravimetrijski. U uzorcima koji su sadržavali manje od 2 % lipida rezultati Bligh i Dyer metode podudarali su se s rezultatima metode prema Folchu. U uzorcima bogatijim lipidima npr. tkivima koja su obogatili dodatkom ribljeg ulja (20,6-26,6 %) rezultati Folchove metode su se podudarali s očekivanima (21-26 %), dok se ekstrakcijom prema Bligh i Dyeru podcijenio udio lipida za 50 %. Iz navedenog se može zaključiti da se porastom udjela lipida u uzorku smanjuje efikasnost ekstrakcije Bligh i Dyer metodom. Budući da su ovim radom obuhvaćene ekstrakcijske metode i metode same analize dugolančanih masnih kiselina iz krvi, krvne plazme ili krvnog seruma, može se smatrati da su obje metode, i prema Bligh i Dyeru kao i metoda prema Folchu podjednako primjenjive, jer se navedene biološke tekućine smatraju relativno siromašne lipidima.

2.3. Analiza dugolančanih masnih kiselina

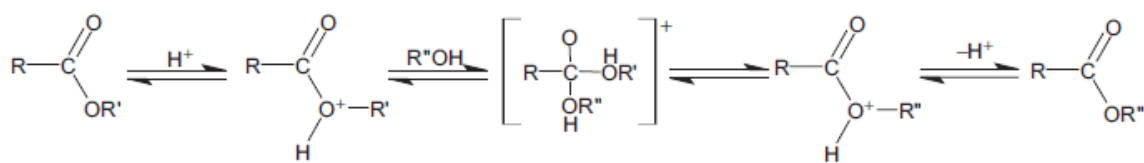
Za analizu masnih kiselina koriste se plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi s različitim sustavima za detekciju. Međutim, za njihovu analizu, plinska kromatografija se pokazala kao metoda izbora na što ukazuje predominantno veliki broj objavljenih znanstvenih radova.

2.3.1. Plinska kromatografija kao metoda za određivanje dugolančanih masnih kiselina

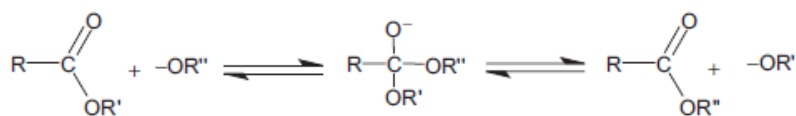
Plinska kromatografija (eng. gas chromatography, GC) kao i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high performance liquid chromatography, HPLC) služi za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih spojeva (Eder, 1995). Sastojci smjese razdjeljuju se između stacionarne faze, koja može biti krutina (eng. gas-solid chromatography, GSC) ili tekućina (eng. gas-liquid chromatography, GLC) i

mobilne faze po kojoj je dobila ime jer je riječ o inernom plinu nositelju koji služi za prijenos analita niz kolonu. Kod analize derivata masnih kiselina podjednako se koriste helij i vodik, neki autori pak preferiraju vodik koji skraćuje vrijeme analize (Ruiz-Rodriguez i sur., 2009; Destailats i Cruz-Hernandez, 2007; Brondz, 2001), osigurava bolju separaciju spojeva (Brondz, 2001) te je jeftiniji (Ackman, 2002). Dugolančane masne kiseline potrebno je prije analize kemijski modificirati, odnosno prevesti u novu kemijsku vrstu (postupak još poznat pod imenom derivatizacija), radi povećanja njihove hlapljivosti odnosno snižavanja temperature vrelišta, bolje separacije i povećanja osjetljivosti detektora (Zhang i sur., 2015; Bielawska i sur., 2010; Brondz, 2001). Koliko je važan korak derivatizacije opisuje znanstveni rad iz 2007. godine (Yi i sur.) u kojem je primjenom plinske kromatografije u sprezi sa spektrometrom masa (eng. gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) detektirano samo dva pika koja korespondiraju slobodnim nederivatiziranim masnim kiselinama, i to C14:0 i C16:0 izoliranih iz krvne plazme. Derivati masnih kiselina koji se separiraju, identificiraju i kvantificiraju primjenom plinske kromatografije uglavnom su metilni esteri slobodnih masnih kiselina (eng. fatty acid methyl esters, FAME) koji nastaju transesterifikacijom (transmetilacijom) masti ili esterifikacijom (metilacijom) slobodnih masnih kiselina u prisutnosti metanola, a sama derivatizacija može biti kiselo ili alkalno katalizirana. Kiseli katalizatori koji se koriste jesu bortrifluorid, acetil klorid, klorovodična i sumporna kiselina u metanolu. Bicalho i suradnici (2008) testirali su kisele katalizatore otopljene u metanolu kod 90 °C (2 %-tna i 5 %-tna otopina sumporne kiseline, 5 %-tna otopina klorovodične kiseline, 14 %-tna otopina bortrifluorida te 5 %-tna i 10 %-tna otopina acetil klorida). Autori su došli su do zaključka da najbolji prinos FAME daje 5 %-tni acetil klorid, iako se u većini objavljenih radova za derivatizaciju masnih kiselina najčešće koristio bortrifluorid kao kiseli katalizator (Bielawska i sur., 2010; Ratnayake i Galli, 2009; Ruiz-Rodriguez, 2009; Kangani i sur., 2008; Dodds i sur., 2005; Hušek i sur., 2002; Eder, 1995; Gutnikov, 1995). Jedan od razloga širokog korištenja bortrifluorida kao kiselog katalizatora leži u činjenici da je reakcija završena unutar dvije minute kod 100 °C. Nedostaci navedenog reagensa kratki je rok trajanja, u slučaju PUFA dolazi do značajnih gubitaka, a isto tako nastaju nepoželjni nusprodukti ako je reagens star ili u prevelikoj koncentraciji (Bielawska i sur., 2010; Eder, 1995), a dolazi i do izomerizacije *cis*- oblika dvostrukih veza u *trans*-oblik (Rosenfeld, 2002). U prošlosti se također koristio diazometan i njegovi derivati jer je reakcija trenutna i to kod sobne temperature, a ako se reakcija odvija kod 0 °C, ne dolazi do transesterifikacije, nastaju isključivo metilni esteri FFA bez promjene izomernog oblika (Brondz, 2001; Eder, 1995; Gutnikov, 1995; Shantha i Napolitano, 1992). Danas se rijetko

upotrebljava zbog svoje toksične, kancerogene i eksplozivne prirode te zbog tvorbe nusprodukata. Trimetilsilil diazometan, koji je korišten kao zamjena za diazometan, ima veću stabilnost, međutim efikasnost katalize manja je u odnosu na diazometan (Rosenfeld, 2002). Alkalni katalizatori koji se često koriste su natrijev metoksid i kalijev hidroksid u metanolu. Reakcije u lužnatoj sredini su brže od onih u kiselom mediju, pa se tako reakcija s natrijevim metoksidom odvija na sobnoj temperaturi, ali uz strogo bezvodne uvjete. Kod derivatizacije u lužnatom mediju nije potrebno dodavati antioksidans (često se upotrebljava butil-hidroksitoluen) jer ne vodi ka tvorbi značajne količine *trans*- izomera poput bortrifluorida i klorovodične kiseline. Također se upotrebljavaju i bazične kvarterne amonijeve soli, kao što su trimetil (m-trifluorotolil) amonijev hidroksid (TMTFTA), tetrametil amonijev hidroksid (TMAH), trimetilfenil amonijev hidroksid (TMPAH) i trimetilsulfonijev hidroksid (TMSH). Vezane masne kiseline prevode se u kvarterne amonijeve soli, potom piroliziraju u metil estere na ulazu u kolonu (Shantha i Napolitano, 1992). Budući da TMAH dovodi do izomerizacije polinezasićenih masnih kiselina Brondz (2001) je predložio upotrebu tetrametilamonijevog acetata (TMAAc) koji ujedno selektivno metilira slobodne masne kiseline u prisustvu vezanih dok autori Ruiz-Rodriguez i sur. (2009) i Gutnikov (1995) favoriziraju upotrebu TMSH-a, koji ima najnižu temperaturu pirolize.



Kiselo katalizirana transesterifikacija



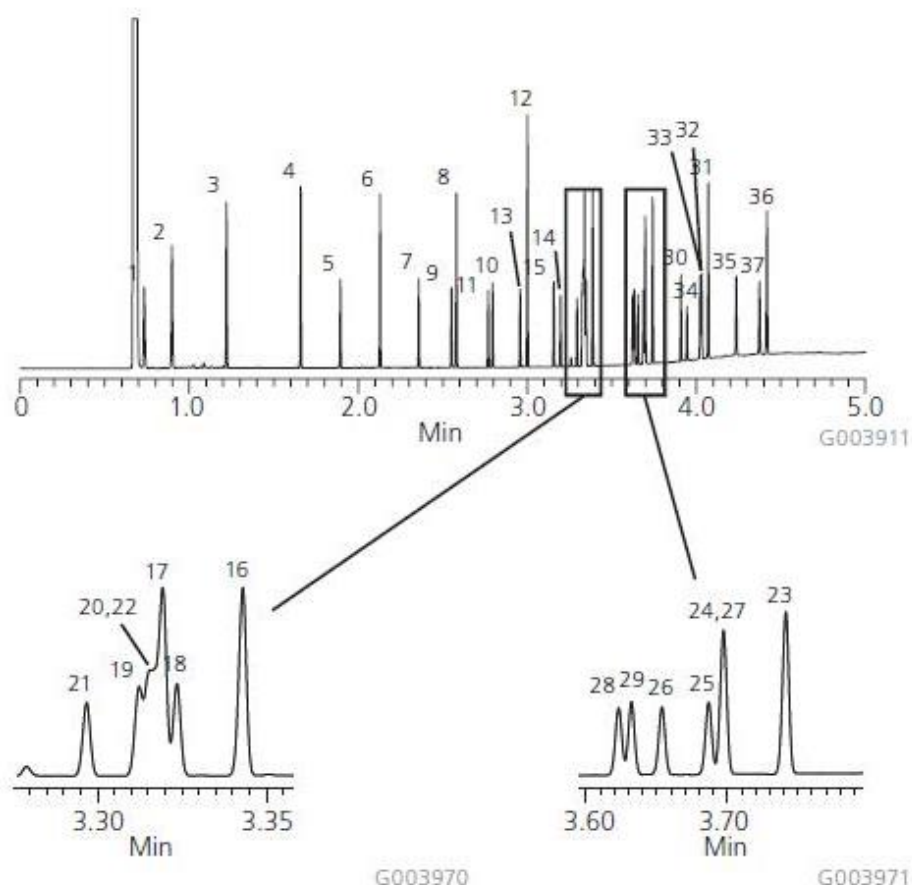
Lužnato katalizirana transesterifikacija

Slika 3: Mehanizam transesterifikacije lipida (Prema Bielawska i sur., 2010)

Detektori su uređaji koji fizičko ili kemijsko svojstvo tvari prevode u električni signal koji se povezuje s koncentracijom analita u uzorku (Snyder i sur., 2009). Za analizu masnih kiselina primjenom plinske kromatografije najčešće se koriste plameno-ionizacijski detektor (eng. flame ionization detector, FID) čije su prednosti točnost i brzina (Wu i sur., 2016), širok raspon linearnosti i robusnost (Bielawska i sur., 2010), ali relativno male

osjetljivosti u odnosu na neke druge detektore kao što je detektor apsorpcije elektrona ili spektrometra masa. Detektor apsorpcije elektrona (eng. electron capture detector, ECD) koristi se za detekciju spojeva koji u svojoj strukturi sadrže halogene elemente ili nitro skupinu. Glavna prednost ovog detektora u odnosu na plameno-ionizacijski detektor je osjetljivost određivanja, a koja može biti i do 10 000 veća. Za derivatizaciju masnih kiselina koriste se reagensi koji u svojoj strukturi sadrže halogene elemente kao što su alikil-kloroformati (npr. metil kloroformat, 2-kloroetil kloroformat ili 2,2,2-trikloroetil kloroformat) (Vreeken i sur., 1992), a na osjetljivost se može dodatno utjecati povećanjem broja halogenih elemenata u derivatu masne kiseline ili korištenje reagensa s halogenim elementima veće elektronegativnosti. Danas se zbog prihvatljive cijene i prednosti potvrde identiteta spoja sve više koristi spektrometar masa za određivanje masnih kiselina ili njihovih derivata.

Stacionarna faza odabire se po polarnosti, može biti nepolarna, srednje polarna ili jako polarna te će ovisno o izboru faze biti različit redoslijed elucije derivata masnih kiselina. Kapilarne kolone od izvučenog kvarca (eng. fused-silica capillary column) su danas gotovo u potpunosti zamijenile punjene kolone. Nepolarne stacionarne faze bazirane su na metilsiloksan ili 100 %-tnom dimetilpolisiloksanu (<https://www.agilent.com>), derivati masnih kiselina eluiraju se prema svojim temperaturama vrelišta (Ackman, 2002; Eder, 1995; Gutnikov, 1995; Shantha i Napolitano, 1992). Najprije se eluiraju kiseline s niskom temperaturom vrelišta (neka najviše nezasićena masna kiselina), nezasićene se masne kiseline eluiraju prije svojih zasićenih analogona zbog nižih temperatura vrelišta i *cis*-izomeri se eluiraju prije *trans*-izomera. Prednosti upotrebe nepolarnih kolona su dulji vijek trajanja (Shantha i Napolitano, 1992) i termostabilnost (Eder, 1995; Gutnikov, 1995; Shantha i Napolitano, 1992) kod analize na visokim temperaturama, ali s druge strane ne može se postići zadovoljavajuće razdvajanje nekih derivata nezasićenih masnih kiselina (Eder, 1995; Shantha i Napolitano, 1992) što se može vidjeti u primjeru prikazanom na slici 4.

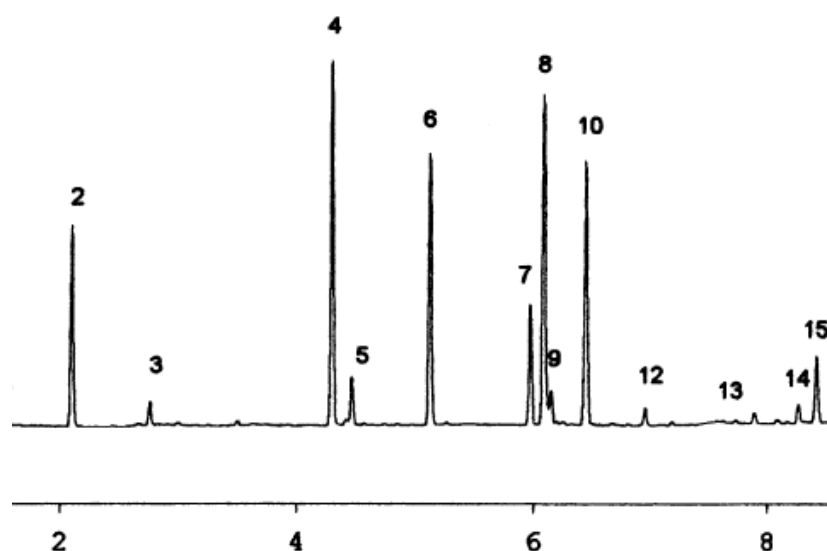


Slika 4 (preuzeto s <https://www.sigmaaldrich.com>): Prikaz redoslijeda eluiranja standardne smjese metilnih estera masnih kiselina (Supelco 37-Component FAME Mix) na nepolarnoj Equiti-1 koloni dužoj 15 m, protok plina nositelja (H_2) bio je konstantan i iznosio je 50 cm/sec, temperatura plameno-ionizacijskog detektora iznosila je 300 °C, a temperatura injektora 250 °C. Kolona se termostatirala programirano od 100 °C do 300 °C po 50 °C/min.

Što se tiče najviše zastupljenih masnih kiselina u krvnoj plazmi najprije se eluira palmitinska (pik br. 12), slijede ju oleinska (pik br. 17) i stearinska (pik br. 16)-gdje se primjećuje da nezasićena masna kiselina izlazi prije zasićene s jednakom duljinom lanca zbog svoje niže temperature vrelišta, potom izlaze linolna (pik br. 19), α -linolenska (pik br. 22), arahidonska (pik br. 28), eikozapentaenska (pik br. 29) i dokozaheksaenska (pik br. 34). Na kromatogramu se vidi da nisu uspješno razdvojeni svi derivati masnih kiselina, od pika br. 19 do pika br. 18, a redom predstavljaju derivate linolne (pik br. 19), *trans*-linolne (pik br.20), α -linolenske (pik br. 22), oleinske (pik br. 17) i *trans*-oleinske kiseline (pik br. 18). Također se ne razdvajaju dobro niti metilni esteri eikozanoične (pik br. 24) i eikozatrienoične (pik br. 27) kiseline. Iako je za analizu masnih kiselina u prikazanom

kromatogramu korištena standardna smjesa metilnih estera masnih kiselina sličan redoslijed eluiranja prisutan je kod analize FAME u krvi, iako se neke od navedenih masnih kiselina prisutne u krvi u izrazito malim količinama (Bicalho i sur., 2008).

Srednje polarne faze koje se upotrebljavaju za analizu derivata masnih kiselina uglavnom su one na bazi difenil i dimetil siloksana (<https://www.sigmaaldrich.com>), zbog zadovoljavajuće termostabilnosti i rezolucijske moći (Eder, 1995). Za razdvajanja geometrijskih (*cis-* i *trans-*) i pozicijskih (izomeri kod kojih je različita pozicija dvostruke veze, primjer C18:1n-9 i C18:1n-7 tzv. kritični par) izomera (Bielawska i sur., 2010; Ruiz-Rodriguez i sur., 2009; Roberts i sur., 2008; Eder, 1995) koriste se polarne stacionarne faze na bazi polietilen glikola ili cianoalkil polisiloksana. Kod polarnih stacionarnih faza derivati masnih kiselina separiraju se po broju C atoma te po broju i poziciji dvostrukih veza (Ratnayake i Galli, 2009; Ruiz-Rodriguez i sur., 2009; Eder, 1995; Gutnikov, 1995). Vrijeme zadržavanja povećava se porastom broja C atoma i porastom broja dvostrukih veza, a ujedno se nezasićene masne kiseline eluiraju poslije svojih zasićenih analogona što je upravo obrnuto u odnosu na redoslijed eluiranja na nepolarnoj stacionarnoj fazi. Kod ovih stacionarnih faza također se javlja problem razdvajanja geometrijskih i pozicijskih izomera, najčešće oleinske (C18:1) kiseline što je ilustrirano u primjeru na slici 5.



Slika 5 (prema Hušek i sur., 2002): Prikaz redoslijeda eluiranja metilnih estera masnih kiselina izoliranih iz krvnog seruma. Razdvajanje se provelo na 12 m dugoj polarnoj koloni od polietilen glikola, plin nositelj bio je vodik s protokom od 45 cm/sec, temperatura plameno-ionizacijskog detektora iznosila je 280 °C, a injektra 250 °C. Kolona se gradijentno termostatirala od 120 °C do 260 °C po 10 °C/min.

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1039-1043.

kolone na početku je bila 50 °C na 0,75 min, zatim se povećavala za 40 °C/min do 155 °C, potom za 6 °C/min do 210 °C, potom za 15 °C/min do 250 °C na kojoj je držana 1 min, kao unutarnji standardi korištene dugolančane masne kiseline koje se prirodno ne javljaju u humanom tkivu. Analizom standardne smjese FAME uspješno su razdvojeni pozicijski i geometrijski izomeri oleinske kiseline, gotovo svi FAME osim C20:2 n-6 koji se preklapa s C21:0 i C22:2 n-6 koji se preklapa s C23:0, što nije predstavljalo problem, s obzirom na to da navedene zasićene kiseline nisu zastupljene ili su jako malo zastupljene u krvnoj plazmi. C20:2 n-6 i C21:0 uspješno su razdvojili Dodds i suradnici (2005) analizom FAME na jako polarnoj DB-23 kapilarnoj koloni dugoj 60 m, u kojoj je helij korišten kao plin nositelj, temperatura kolone programirana je od 125 °C po 3 °C/min do 240 °C, a kao unutarnji standard korištena je C21:0.

Na temelju opisanih znanstvenih radova može se zapaziti da se pretežno koristi gradijentno termostatiranje kolone kod koje se temperatura kolone konstantno ili skokovito povisuje slijedeći separaciju spojeva u uzorku, a što omogućuje separaciju masnih kiselina velikog raspona vrelišta. Naime, analiza masnih kiselina širokog raspona vrelišta kod izotermalnih uvjeta i na niskoj temperaturi rezultira prihvatljivim razdvajanjem njihovih derivata s nižim vrelištem, dok se derivati s višim vrelištima sporije eluiraju, dolazi do širenja elucijskih vrpca (kromatografskih pikova), a posljedično i do povećanja vremena potrebnog za analizu. Kod izotermalne analize na višim temperaturama kolone došlo bi do eluiranja derivata masnih kiselina s nižom temperaturom vrelišta bez zadovoljavajućeg razdvajanja. Temperatura vrelišta metil palmitata iznosi 441-445 °C, metil stearata 397-401 °C, metil oleata 407-411 °C i metil linoleata 393-395 °C pri atmosferskom tlaku (<http://www.chemspider.com>), uzme li se u obzir razlika u temperaturi vrelišta između palmitata i oleata koja iznosi najmanje 34 °C, između palmitata i linoleata 48 °C očito je zašto se koristi gradijentno termostatiranje kolone kod analize dugolančanih masnih kiselina. Osim temperature kolone bitna je i temperatura injektora (sustav za uštrcavanje i miješanje uzorka s mobilnom fazom) koja mora biti dovoljno visoka da osigura trenutno isparavanje uzorka, uglavnom je postavljena na 250 °C (Cruz-Hernandez i sur., 2017; Ecker i sur., 2012; Bicalho i sur., 2008; Destailats i Cruz-Hernandez, 2007) do 300 °C (Dodds i sur., 2005).

Pazda i suradnici (2017) određivali su sastav masnih kiselina kod pacijenata s kroničnom bolešću bubrega najviše se osvrćući na izbor prikladne stacionarne faze o kojoj ovisi separacija i detekcija derivata masnih kiselina u krvnom serumu. Masne kiseline su se derivatizirale u 10 %-tnoj otopini bortrifluorida u metanolu i separirale na ZB-5

kapilarnoj koloni. U svom su radu autori testirali četiri vrste stacionarnih faza s obzirom na njihovu polarnost za određivanje metilnih estera masnih kiselina koristeći standardnu smjesu masnih kiselina (Supelco 37 Component Mix): ZB-5 (5 %-fenil 95 %-dimetilpolisiloksan stacionarna faza), Zb-Wax plus (polietilen glikol stacionarna faza), Rtx-225 (50 %-cianopropilmetil 50 %-fenilmetilpolisiloksan stacionarna faza) i Rtx-2560 (biscianopropilpolisiloksan stacionarna faza). Zb-Wax plus i Rtx 2560 kolone su se pokazale kao neprikladne, jer nisu omogućile razdvajanje kritičnih parova masnih kiselina bitnih kod ovih bolesnika (npr. na Rtx-2560 koloni nisu se uspješno razdvojile eikozanoična 20:0 i γ -linolenska kiselina 18:3 n-6). Kao najprikladnija kolona pokazala se ZB-5 jer je omogućila kvantifikaciju analita u tragovima, imala manju granicu detekcije i omogućila razdvajanje trikozanoične kiseline od ostalih sastojaka u odnosu na Rtx 225 kolonu. Zbog toga je za određivanje masnih kiselina u krvnom serumu bolesnika izabrana kolona ZB-5 duljine 30 m, gradijent temperature od 60 °C koji se povećavao za 4 °C/min do 300 °C. Helij je korišten kao plin nositelj, a GC analiza se provodila u sprezi sa spektrometrom masa. Kod navedenih uvjeta određeno je 30 derivata masnih kiselina i pokazano je da pacijenti s kroničnom bolešću bubrega imaju visoke koncentracije MUFA i niske koncentracije ω -6 masnih kiselina u krvnom serumu.

2017. Cruz-Hernandez i suradnici razvijaju brzu metodu za određivanje masnih kiselina u eritrocitima i krvnoj plazmi. U tom radu derivatizacija masnih kiselina provedena je u otopini klorovodične kiseline u metanolu, a analiza se provela na BPX-70 kapilarnoj koloni dugoj 10 m, uz gradijent temperature od 50 °C (2 min), onda se povećala na 180 °C po 120 °C/min, zatim po 20 °C/min do 220 °C da bi na kraju dosegla temperaturu od 250 °C. Kao plin nositelj je korišten vodik, temperatura injektora je bila 250 °C, uz plameno-ionizacijski detektor. Redoslijed eluiranja je bio sljedeći: 16:0, 18:0, 18:1 n-9 i 18:1 n-7 koje se nisu potpuno razdvojile, 18:2 n-6, 18:3 n-3, 20:0, 20:1 n-11, 20:1 n-9, 20:2 n-6, 20:4 n-6, 22:0, 20:5 n-3, 24:0, 22:5 n-6, 24:1 n-9, 22:5 n-3 i 22:6 n-3. Granica detekcije je bila 0,05 mg/100 mL, a vrijeme analize bilo je unutar 4,5 min. Kod opisanih uvjeta došlo je do zadovoljavajućeg razdvajanja svih derivata masnih kiselina, osim u slučaju navedenih pozicijskih izomera (18:1 n-9 i 18:1 n-7).

Ecker i suradnici 2012. godine razvijaju brzu i robusnu GC-MS metodu za kvantifikaciju pozicijskih i geometrijskih izomera masnih kiselina u biološkim materijalima primjenjivu u kliničkim studijima. Masne su kiseline derivatizirane u 10 %-tnoj otopini acetil klorida u metanolu, a za njihovu ekstrakciju iz krvne plazme koristio se *n*-heksan. Analiza je provedena na jako polarnoj BPX-70 koloni, plin nositelj je bio helij, temperatura

injektora je bila 250 °C, uz prethodno navedeni gradijent temperature kolone. Redoslijed eluiranja je bio očekivani, najprije su se eluirale kratkolančane masne kiseline, ω -6 su izlazile prije ω -3 masnih kiselina te su *trans*- izomeri izlazi prije odgovarajućih *cis*-izomera (redoslijed jest bio da se prvo eluiira 18:1 n-9 t9, potom 18:1 n-9 c9, 18:1 n-7 c11, 18:2 n-6 t9t12, 18:2 n-6 c9c12, 18:3 n-6 c6c9c12 i 18:3 n-3 c9c12c15). Granica detekcije iznosila je 1,9-16 fmol, a razvijena se metoda pokazala kao pouzdana za svakodnevne rutinske analize bioloških materijala.

Želeći razdvojiti masne kiseline iz složenih matrica poput mlijeka, ulja ili nekih drugih složenih bioloških materijala Destailats i Cruz-Hernandez (2007) u svom su radu koristili kratke i jako polarne stacionarne faze. Usporedo s analizom mliječne masti, kakaovog maslaca i ulja od tune, analizirali su i masne kiseline iz krvne plazme koje derivatiziraju prema postupku opisanom u radu Masooda i suradnika (2005) s acetil kloridom kao kiselim katalizatorom. Dobivene FAME razdvajaju na 10 m dugoj BPX-70 kapilarnoj koloni, temperatura injektora iznosila je 250 °C, plin nositelj je bio vodik, kolona se gradijentno termostatirala od 50 °C (2 min), potom je porasla na 180 °C za 120 °C/min, zatim se povećavala po 20 °C/min do 220 °C te je na kraju dosegla temperaturu od 250 °C za 50 °C/min. Međutim, rezultati analize derivata masnih kiselina iz mliječne masti pokazali su da je pri danim uvjetima došlo do preklapanja pikova oleinske kiseline *trans*- konfiguracije, od *trans*- 4 do *trans*- 11 izomera, uz to su se još preklapili izomeri od *trans*- 12 do *trans*- 16 s njima odgovarajućim pozicijskim izomerima *cis*- konfiguracije. Isti uvjeti su primjenjeni za analizu masnih kiselina u krvnoj plazmi, kod čega je došlo do razdvajanja derivata masnih kiselina, osim u slučaju kritičnog para 18:1 n-9 i 18:1 n-7, ali treba uzeti u obzir da je krvna plazma siromašnija brojem masnih kiselina, pogotovo *trans*- masnih kiselina, u odnosu na mliječnu mast, čime je izbjegnuto preklapanje velikog broja pikova derivata masnih kiselina.

2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kao metoda za određivanje dugolančanih masnih kiselina

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high performance liquid chromatography, HPLC) također je tehnika pomoću koje se kemijski spojevi u složenoj smjesi separiraju, identificiraju i kvantificiraju u kojoj mobilna faza nije plin, nego tekućina, prednost u odnosu na GC leži u razdvajanju masnih kiselina na sobnoj temperaturi ili temperaturama od 30 °C do 40 °C. Analiza na relativno niskoj temperaturi doprinosi smanjenju rizika izomerizacije PUFA i gubitka termolabilnih kiselina (Lima i

Abdalla, 2002). Spojevi se razdjeljuju između pokretne, mobilne faze i nepokretne, stacionarne faze na principu adsorpcije, razdiobe, ionske izmjene ili isključenjem veličinom i oblikom molekula. Kao i u slučaju plinsko-kromatografske analize, masne kiseline potrebno je prije same analize prevesti u kemijski oblik prikladan za analizu, znači derivatizirati, bilo prije ulaska u kromatografsku kolonu (eng. pre-column) ili nakon izlaska iz kolone, a prije ulaska u detektor (eng. post-column). Derivatizacija se provodi da se poveća osjetljivost određivanja, kada je njihova zastupljenost u krvi mala (Bicalho i sur., 2008) ili detekcije i selektivnosti. Zasićene masne kiseline ne apsorbiraju, odnosno jako slabo apsorbiraju elektromagnetno zračenje u UV-Vis području niti pokazuju prirodnu fluorescenciju (Bielawska i sur., 2010; Chen i Chuang, 2002). Nasuprot tome, nezasićene masne kiseline apsorbiraju elektromagnetno zračenje u području oko 200 nm (UV područje), no to je ujedno područje u kojem otapala koja se najčešće koriste za mobilnu fazu pokazuju maksimum adsorpcije i time interferiraju sa signalom analita od interesa. Kod određivanja u kojima se koristi UV-Vis detektor (npr. detektor s nizom dioda) masne kiseline derivatiziraju se s reagensima koji izazivaju batokromni pomak, pomak maksimuma adsorpcije elektromagnetskog zračenja u područje većih valnih duljina, čime se izbjegava interferiranje otapala i nederivatiziranih vrsta (Püttman i sur., 1993). Primjenom navedenih detektora najčešće se analiziraju fenacilni, bromofenacilni i naftacilni esteri slobodnih masnih kiselina, a u literaturi kao najčešće korišteni reagensi spominju se fenacil bromid (Lima i Abdalla, 2002; Mehta i sur., 1998; Toyooka, 1995; Uji i sur., 1987; Borch, 1975) i *p*-bromofenacil bromid (Lima i Abdalla, 2002; Mehta i sur., 1998; Püttman i sur., 1993; Jordi, 1978). Mehta i sur. (1998) su za dobivanje fenacilnih estera masnih kiselina koristili prethodno navedenim reagensima te su uspoređivali učinkovitost derivatizacije. Fenacil bromid se pokazao učinkovitijim reagensom, masne kiseline derivatizirale se se unutar 15 min, dok reakcija s *p*-bromofenacil bromidom traje 45 min. Iako *p*-bromofenacil bromid rezultira većim odzivom detektora, ne dolazi do potpunog razdvajanja kromatografskih pikova tzv. kritičnih parova, palmitinske (16:0) i oleinske (18:1) kiseline. Chen i Chuang (2002) također primjećuju da se bolje razdvajaju fenacil bromid derivati od *p*-bromofenacil bromid derivata.

Danas je u uporabi sve više zastupljen fluorescencijski detektor zbog svoje daleko veće osjetljivosti (Syder i suradnici 2009. govore o stotruko većoj osjetljivosti) od UV-Vis detektora (Dołowy i Pyka, 2014; Bielawska i sur., 2010; Du i sur., 2007; Lima i Abdalla, 2002; Chen i Chuang, 2002; Toyooka, 2002; Brondz, 2001). Budući masne kiseline prirodno ne fluoresciraju potrebno ih je prevesti u kumarinske derivate. Najčešći reagensi

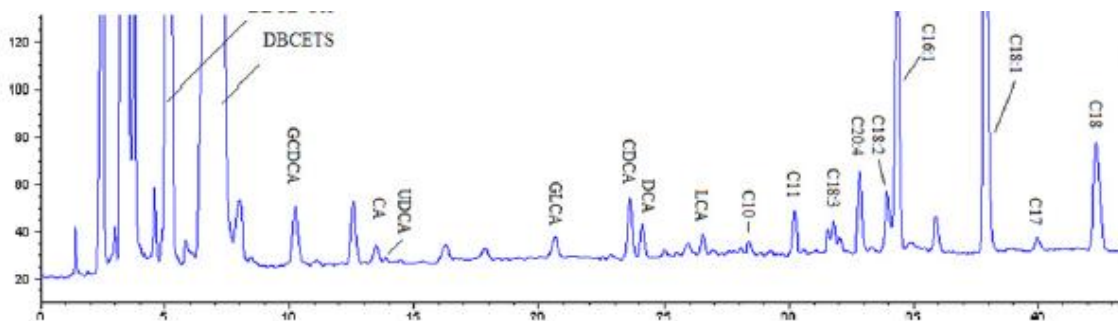
kumarinske strukture su 4-bromometil-7-metoksi-kumarin (BrMMC) i 4-bromometil-7-acetoksi-kumarin (BrMAC), čiji se derivati mogu detektirati na femtomolnoj razini. Od ostalih reagensa najčešće se koriste oni iz skupine diazometana (9-antrildiazometan i 1-prenildiazometan) te kvinoksalin, hidrazin, benzofurazan, sulfonati ili fluorescein (Bielawska i sur., 2010; Chen i Chuang, 2002). U nastavku će više biti riječi analizi masnih kiselina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u sprezi s fluorescencijskim detektorom te njihovoj derivatizaciji s novijim fluorescencijskim reagensima.

S obzirom na polarnost mobilne i stacionarne faze, danas se u većini slučajeva za analizu masnih kiselina, odnosno njihovih derivata koristi kromatografija obrnutih faza (eng. reversed-phase, RP) u kojoj je mobilna faza polarna, a stacionarna nepolarna. Stacionarna faza je silika gel na kojem su vezane oktasililne grupe, (C8) koje se pretežno koriste u analizi kratkolančanih zasićenih masnih kiselina (Bielawska i sur., 2010) te najčešće oktadecilsilil (C18) čiji je alkilni lanac duži što rezultira produljenim vremenom zadržavanja i povećanom selektivnošću spojeva (Lima i Abdalla, 2002). Mobilna faza se sastoji od vode i organskog otapala, a tri najčešća organska otapala koja se koriste zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava u smislu odgovarajuće viskoznosti, topljivosti, mješivosti, stabilnosti i reaktivnosti (Lima i Abdalla, 2002) su metanol, acetonitril i tetrahidrofuran (Snyder, 2000). Za protoniranje masnih kiselina dodaje se niska koncentracija slabe kiseline, kao što je ledena octena kiselina (uobičajeno 0,05-0,1 %, v/v) (Chen i Chuang, 2002) što rezultira simetričnim i oštrim pikovima (<http://lipidlibrary.aocs.org>). Razdvajanje se temelji na različitim brzinama putovanja kemijskih spojeva kroz kromatografsku kolonu, a zadržavanje određene masne kiseline u koloni funkcija je i molekulske strukture i eksperimentalnih uvjeta (Snyder i sur., 2009; Snyder 2000). Ako spoj ostvaruje više interakcija sa stacionarnom fazom on putuje sporije kroz kolonu te se i kasnije eluira, za razliku od spoja koji ostvaruje manje interakcija, sukladno tome brže se giba duž kolone i ranije eluira. Masne kiseline razdvajaju se po duljini lanca i stupnju nezasićenosti (<http://lipidlibrary.aocs.org>; Chen i Chuang, 2002). U slučaju masnih kiselina vrijeme zadržavanja povećava se povećanjem duljine lanca (Borch, 1975). Nezasićene masne kiseline eluiraju se prije svojih zasićenih analoga jer prva dvostruka veza „smanjuje” duljinu lanca za malo manje od 2C atoma što smanjuje njihovo vrijeme zadržavanja (Lima i Abdalla, 2002; Borch, 1975). Pri tome je važno za napomenuti da svaki sljedeći porast broja dvostrukih veza ima sve manji utjecaj na duljinu lanca (<http://lipidlibrary.aocs.org>), a time i sve manji utjecaj na vrijeme zadržavanja.

Uviđajući da je koncentracija masnih kiselina u krvnom serumu usko povezana s Alzheimerovom bolešću i depresijom, Nishikiori i suradnici 2014. godine razvijaju metodu u kojoj su kao derivatizacijski reagens koristili 4-N,N-dimetilaminosulfonil-7-N-(2-aminoetil)amino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-ED), a derivat je pogodan za određivanje uz fluorescencijski detektor. Na taj način su odredili pet derivata masnih kiselina i to palmitoleinsku, oleinsku, linolnu, α -linolensku i arahidonsku u krvnom serumu. Prije derivatizacije masne kiseline su ekstrahirali iz seruma smjesom kloroforma, metanola, *n*-heptana i vode. Za razdvajanje derivata koristila se C18 kolona i gradijentno eluiranje (otopina A=0,1 %-tna otopina trifluoroctene kiseline u acetonitrilu, otopina B=0.1 %-tna vodena otopina trifluoroctene kiseline i otopina C=0.1 %-tna otopina trifluoroctene kiseline u metanolu). Gradijent je bio sljedeći, 0-25 min: A=60-70 %, B=30-20 % i C=10 %, 25-40 min: A=70 %, B=20 % i C=10 %, 40-55 min: A=70-77 %, B=20-13 % i C=10 %, 55-65 min: A=77 %, B=13 % i C=10 %, 65-84,50 min: A=60 %, B=30 % i C=10 %. Gradijentno eluiranje s dva ili više otapala čiji se omjer kontinuirano ili skokovito mijenja, ima istu ulogu kao gradijentno povišenje temperature kod plinsko-kromatografske analize, u svrhu poboljšanja odjeljivanja i smanjenja vremena zadržavanja kasno-eluirajućih kemijskih vrsta. Temperatura kolone je bila postavljena na 40 °C, a valna duljina ekscitacije i emisije fluorescencijskog detektora iznosila je 450 nm i 560 nm. Opisanom metodom uspješno je razdvojeno svih pet derivata masnih kiselina s zadovoljavajućom granicom detekcije, od 2,29 fmol za palmitoleinsku kiselinu do 4,75 fmol za oleinsku kiselinu. Glavna prednost metode je potreban mali volumen krvnog seruma, a metoda se pokazala pouzdana i primjenjiva za primjenu u kliničkoj dijagnostici bolesti vezanih za metabolizam masnih kiselina.

Li i suradnici 2012. godine koriste novi fluorescencijski reagens 2-(7H-dibenzo[a,g]karbazol-7-yl)etil 4-metilbenzensulfonat (DBCETS) i time razvijaju novu metodu određivanja slobodnih masnih kiselina u krvnom serumu pacijenata oboljelih od hepatocelularnog karcinoma koji se javlja u bolesnika s cirozom jetre. Derivati su se razdvojili na Hypersil BDS-C8 koloni i gradijentno eluirali otopinom A (smjesa acetonitril:voda= 50:50, v/v) i otopinom B (100 %-tni acetonitril). Gradijentno eluiranje je bilo: 0 min: 25 % B, 20 min: 45 % B, 25 min: 85 % B i 35 min: 100 % B. Temperatura kolone bila je 35 °C, valna duljina ekscitacije i emisije fluorescencijskog detektora iznosila je 300 nm i 395 nm. Redoslijed eluiranja derivata masnih kiselina bio je sličan prethodno opisanoj metodi, najprije su se eluirali srednjedugolančane masne kiseline s 10 do 11 C atoma, potom α -linolenska i arahidonska kiselina, koje slijede linolna i palmitoleinska

kiselina (koje se, za razliku od postupka opisanog u radu Nishikiorija i sur., 2014, nisu u potpunosti razdvojile), i na kraju su se eluirale oleinska, heptadekanska i stearinska kiselina što se vidi na slici 7. Razvijena metoda također ima nisku granicu detekcije 0,28-0,57 ng/mL i visok raspon točnosti, od 92,26 do 102,45 %.



Slika 7 (Prema Li i sur., 2012): Prikaz redoslijeda eluiranja dobivenih derivata masnih kiselina izoliranih iz krvnog seruma.

2007. godine Du i suradnici sintetizirali su novi fluorescencijski reagens 6-oxy-(acetil piperazin) fluorescein (APF) koji se pokazao kao odličan fluorofor za detekciju sedam (laurinska, miristinska, arahidonska, linolna, palmitinska, oleinska i stearinska) masnih kiselina prisutnih u niskim koncentracijama u krvnom serumu. Kako krvni serum sadrži i amino kiseline koje također reagiraju s APF-om i time predstavljale interferente u analizi, masne kiseline su se prije derivatizacije ekstrahirale dietileterom da se uklone aminokiseline. Razdvajanje se provodilo na C18 koloni, uz izokratno eluiranje, a optimalan sastav mobilne faze bila je smjesa metanol:voda=88:12, v/v. Primijećeno je da kod drugih volumnih omjera metanola i vode dolazi do preklapanja kromatografskih pikova arahidonske i linolne kiseline. Derivati zasićenih kiselina (laurinska i miristinska) očekivano su se eluirali prvi, a potom slijede derivati arahidonske, linolne, palmitinske, oleinske i stearinske kiseline. Granica detekcije se kretala od 0,1 nmol/L za laurinsku kiselinu do 6,4 nmol/L za stearinsku kiselinu. Metoda se uspješno primijenila za usporedbu sastava masnih kiselina u krvnom serumu zdravih pojedinaca i pojedinaca u stanju hiperlipemije (povećanje koncentracije neutralnih masti u krvi), zbog niske granice detekcije metoda je primjenjiva na uzorke s niskom koncentracijom masnih kiselina. Prednost ovog APF reagensa je niska cijena sinteze te dugo vremenska stabilnost derivata bez stvaranja ikakvih nusprodukata.

3. ZAKLJUČAK

- Ekstrakcijske metode opisane u radovima Folcha i sur. (1951; 1957), te Bligh i Dyer (1959) pokazale su se prikladnima za efikasnu ekstrakciju jako dugolančanih masnih kiselina (C20-C28). Kod ekstrakcije važno je optimirati pH vrijednost kako bi kiseline ostale protonirane i time topljive u organskom mediju za ekstrakciju.
- U analizi masnih kiselina primjenom plinske kromatografije najčešće se koristio plameno-ionizacijski detektor, ali u novije vrijeme je zamijenjen spektrometrom masa. Masne kiseline se u većini slučajeva analiziraju u obliku metilnih estera.
- U analizi masnih kiselina primjenom tekućinske kromatografije najčešće se koristi UV-Vis detektor te u potrebi za većom osjetljivošću i fluorescencijski detektor. U tu svrhu masne kiseline potrebno je derivatizirati s odgovarajućim reagensima čiji derivati dovoljno jako apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u UV-Vis području ili s reagensima koji stvaraju fluorescirajuće derivate.
- Kod obje navedene tehnike potrebno je obratiti pažnju na zadovoljavajuće razdvajanje kritičnih parova što treba biti nit vodilja pri odabiru i reagensa za derivatizaciju i eksperimentalnih uvjeta.

4. Popis literature

1. Ackman, R. G. (2002) The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century. *Analytica Chimica Acta* **465**: 175-192.
2. Aganović, I., Likić, R., Dušek, T. (2004) Definicija i epidemiologija metaboličkog sindroma. *Medicus* **13**: 9-14.
3. Anneken, D. J., Both, S., Christoph, R., Fieg, G., Steinberner, U., Westfechtel, A. (2012) Fatty Acids. *Ullmann`s Encyclopedia of Industrial Chemistry* **14**: 74-116.
4. Anonimus
<<http://lipidbank.jp/cgi-bin/detail.cgi?id=DFA0003>> (pristupljeno 11.9.2018.).
5. Anonimus
<<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0001.htm#top>> (pristupljeno 11.9.2018.).
6. Anonimus
<<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4447491.html>>
(pristupljeno 11.9.2018).
7. Anonimus
<<https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/vf-1ms>> (pristupljeno 11.9.2018.).
8. Anonimus
<https://www.lipidmaps.org/data/classification/LM_classification_exp.php>
(pristupljeno 11.9.2018).
9. Apple, F. S., Wu, A. H. B., Mair, J., Ravkilde, J., Panteghini, M., Tate, J., Pagani, F., Christenson, R. H., Mockel, M., Danne, O., Jaffe, A. S. (2005) Future Biomarkers for Detection of Ischemia and Risk Stratification in Acute Coronary Syndrome. *Clinical Chemistry* **51**: 810-824.
10. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2012) Biochemistry, 7. izd., W. H. Freeman and Company, New York.
11. Bicalho, B., David, F., Rumllel, K., Kindt, E., Sandra, P. (2008) Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1211**: 120-128.
12. Bielawska, K., Dziakowska, I., Roszkowska-Jakimiec, W. (2010) Chromatographic determination of fatty acids in biological material. *Toxicology Mechanisms and Methods* **20**: 526-537.

13. Binienda, Z. K., Sarkar, S., Silva-Ramirez, S., Gonzalez, C. (2013) Role of Free Fatty Acids in Physiological Conditions and Mitochondrial Dysfunction. *Food and Nutrition Sciences* **4**: 6-15.
14. Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911-917.
15. Boden, G. (2002) Effects of Free Fatty Acids (FFA) on Glucose Metabolism: Significance for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **111**: 121-124.
16. Boden, G. (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* **18**: 139-143.
17. Borch, R. F. (1975) Separation of Long Chain Fatty Acids as Phenacyl Esters by High Pressure Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **47**: 2437-2439.
18. Brenna, J. T., Plourde, M., Stark, K. D., Jones, P. J., Lin, Y.-H. (2018) Best practices for the design, laboratory analysis, and reporting of trials involving fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition* **108**: 211-227.
19. Brondz, I. (2001) Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta* **465**: 1-37.
20. Buchanan, M. D., GC Analysis of FAMES by Boiling Point Elution
<<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-eu/gc-analyses-of-fames.html>> (pristupljeno 11.9.2018.).
21. Chenn, S.-H., Chuang, Y.-J. (2002) Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **465**: 145-155.
22. Christie, W. W., Fatty Acid Analysis by HPLC
<<http://lipidlibrary.aocs.org/search/searchresults.cfm?QuickSearch=HPLC+fatty+acids&Go=Go>>(pristupljeno 11.9.2018).
23. Cruz-Hernandez, C., Thakkar, S. K., Masserey-Elmelegy, I., Buosi, W., Fontannaz, P., Giuffrida, F. (2017) Quantification of fatty acids in erythrocytes and plasma by fast gas chromatography. *Journal of Separation Science* **40**: 3289-3300.
24. Destailats, F., Cruz-Hernandez, C. (2007) Fast analysis by gas-liquid chromatography: Perspective on the resolution of complex fatty acid compositions. *Journal of Chromatography A* **1169**: 175-178.
25. Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D., Kennish, J. M. (2005) Gas Chromatographic Quantification of Fatty Acid Methyl Esters: Flame Ionization Detection vs. Electron Impact Mass Spectrometry. *Lipids* **40**: 419-428.

26. Dołowy, M., Pyka, A. (2014) Chromatographic Methods in the Separation of Long-Chain Mono- and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Chemistry* **2015**: 1-20.
27. Du, X.-L., Zhang, H.-S., Guo, X.-F., Deng, Y.-H., Wang, H. (2007) 6-Oxy-(acetyl piperazine) fluorescein as a new fluorescent labeling reagent for free fatty acids in serum using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1169**: 77-85.
28. Ecker, J., Scherer, M., Schmitz, G., Liebisch, G. (2012) A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B* **897**: 98-104.
29. Enig, M. G., (2000) Know Your Fats: The Complete Primer for Understanding the Nutrition of Fats, Oils, and Cholesterol, Bethesda Press, Maryland.
30. Ferreri, C., Chatgililoglu, C. (2015) Fatty Acid Families: Metabolism and Nutrition. U: Membrane Lipidomics for Personalized Health (Ferreri, C., Chatgililoglu, C., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 21-40.
31. Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A., LeBaron, F. N. (1951) Preparation of lipide extracts from brain tissue. *Journal of Biological Chemistry* **191**: 833-841.
32. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**: 497-509.
33. Glaser, C., Demmelmair, H., Koletzko, B. (2010) High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct *In Situ* Transesterification. *PLoS ONE* **5**: 1-6.
34. Hamilton, R. J. (2008) Fatty acids: structure, occurrence, nomenclature, biosynthesis and properties. U: Trans Fatty Acids (Dijkstra, A. J., Hamilton, R. J., Hamm, W., ured.), Blackwell Publishing Ltd, New Jersey, str. 1-24.
35. Hodson, L., Skeaff, C. M., Fielding, B. A. (2008) Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research* **47**: 348-380.
36. Hušek, P., Šimek, P., Tvrzická, E. (2002) Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum. *Analytica Chimica Acta* **465**: 433-439.
37. Iverson, S. J., Lang, S. L. C., Cooper, M. H. (2001) Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids* **36**: 1283-1287.

38. Jensen, S. K. (2008) Improved Bligh and Dyer extraction procedure. *Lipid Technology* **20**: 280-281.
39. Katan, M. B., Zock, P. L., Mensink, R. P. (1994) Effects of fats and fatty acids on blood lipid sin humans: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition* **60**: 1017-1022.
40. Kunau, W.-H. (1976) Chemistry and Biochemistry of Unsaturated Fatty Acids. *Angewandte Cheme* **15**: 61-74.
41. Lawrence, G. D., (2010) The Fats of Life: Essential Fatty Acids in Health and Disease, Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, and London.
42. Li, G.-L., Chen, G., Liu, Y.-Q., Jing, N.-H., You, J.-M. (2012) A sensitive and selective HPLC-FLD method with fluorescent labeling for simultaneous detection of bile acid and free fatty acid in human serum. *Journal of Chromatography B* **895-896**: 191-195.
43. Lima, E. S., Abdalla, D. S. P. (2002) High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta* **465**: 81-91.
44. Masood, A., Stark, K. D., Salem, N. Jr. (2005) A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *Journal of Lipid Research* **46**: 2299-2305.
45. Mehta, A., Oeser, A. M., Carlson, M. G. (1998) Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **719**: 9-23.
46. Meng, Z., Wen, D., Sun, D., Gao, F., Li, W., Liao, Y., Liu, H. (2007) Rapid determination of C12–C26 non-derivatized fatty acids in human serum by fast gas chromatography. *Journal of Separation Science* **30**: 1537-1543.
47. Metelko, Ž., Crkvenčić, N. (2004) Sindrom metaboličke inzulinske rezistencije i metabolizam ugljikohidrata. *Medicus* **13**: 41-49.
48. Nakamura, M. T., Yudell, B. E., Loor, J. J. (2013) Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research* **53**: 124-144.
49. Nishikiori, M., Iizuka, H., Ichiba, H., Sadamoto, K., Fukushima, T. (2014) Determination of Free Fatty Acids in Human Serum by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatographic Science* **53**: 537-541.
50. Ouehenberger, O., Armando, A. M., Brown, A. H., Milne, S. B., Myers, D. S., Merrill, A. H., Bandyopadhyay, S., Jones, K. N., Kelly, S., Shaner, R. L., Sullards, C. M., Wang, E., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Leiker, T. J., Raetz, C. R. H., Guan, Z., Laird, G. M., Six, D. A., Russel, D. W., McDonald, J. G., Subramaniam, S., Fahy,

- E., Dennis, E. A. (2010) Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipid sin human plasma. *Journal of Lipid Research* **51**: 3299-3305.
51. Pazda, M., Stepnowski, P., Sledzinski, T., Chmielewski, M., Mika, A. (2017) Suitability of selected chromatographic columns for analysis of fatty acids in dialyzed patients. *Biomedical Chromatography* **31**: 1-17.
 52. Püttmann, M., Krug, H., von Ochenstein, E., Kattermann, R. (1993) Fast HPLC Determination of Serum Free Fatty Acids int he Picomole Range. *Clinical Chemistry* **39**: 825-832.
 53. Radin, N. S. (1988) Lipid Extraction. U: Lipids and Related Compounds (Boulton, A. A., Baker, G. B., Horrocks, L. A., ured.), Humana Press, New York, str. 1-61.
 54. Ratnayake, W. M. N., Galli, C. (2009) Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper. *Annals of Nutrition and Metabolism* **55**: 8-43.
 55. Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M. (1995) Unbound free fatty acid level in human serum. *The Journal of Lipid Research* **36**: 229-240.
 56. Roberts, L. D., McCombie, G., Titman, C. M., Griffin, J. L. (2008) A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. *Journal of Chromatography B* **871**: 174-181.
 57. Rosenfeld, J. M. (2002) Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta* **465**: 93-100.
 58. Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., Ibanez, E. (2010) Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**: 305-326.
 59. Saifer, G., Goldman, L. (1960) The free fatty acids bound to human serum albumin. *Journal of Lipid Research* **2**: 268-270.
 60. Shantha, N. C., Napolitano, G. E. (1992) Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography* **624**: 37-51.
 61. Snyder, L. R. (2000) HPLC: past and present. *Analytical Chemistry* **72**: 412-420.
 62. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. (2009) Detection. U: Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3. zd. (Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 147-197.
 63. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., Sharma, S. (2011) The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* **2**: 236-240.

64. Vreeken, R. J., Jager, M. E., Ghijsen, R. T., Brinkman, U. A. Th. (1992) The Derivatization of Fatty Acids by (Chloro)Alkyl Chloroformates in Non-Aqueous and Aqueous Media for GC Analysis. *Journal of High Resolution Chromatography* **15**: 785-790.
65. Wilding, J. P. H. (2007) The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* **24**: 934-945.
66. Yi, L., Liang, Y., Yuan, D., Gao, H., Zhou, H. (2007) Simultaneously quantitative measurement of comprehensive profiles of esterified and non-esterified fatty acids in plasma of type 2 diabetic patients. *Chemistry and Physics of Lipids* **150**: 204-216.
67. Zhang, H., Wang, Z., Liu, O. (2015) Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **5**: 223-230.
68. Žmire, J. (2004) Debljina i metabolička inzulinska rezistencija. *Medicus* **13**: 27-35.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antelina Bošković

ime i prezime studenta