Infracrvena spektroskopija kolesterola

Lihtar, Gabriela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:744729

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Gabriela Lihtar

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA KOLESTEROLA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Zagreb, 2017. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 19. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 22. rujna 2017.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK VI
§ 1. UVOD 1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME 3
2.1. Infracrvena spektroskopija 3
2.2. Kolesterol 4
2.3. Priprava uzorka 5
2.4. IR spektar kolesterola 6
2.5. Kvantitativno određivanje kolesterola LDL i HDL u serumu IR spektroskopijom 8
2.6. Određivanje kolesterola u mliječnim proizvodima IR spektroskopijom 12
§ 3. LITERATURNI IZVORI 14

§ Sažetak

Infracrvena (engl. *infrared*, IR) spektroskopija je metoda koja se koristi za strukturnu analizu spojeva raspoznavanjem skupina atoma u molekuli na temelju njihovih vibracija. Kolesterol je složena organska molekula, čija biološka važnost dolazi do izražaja u regulaciji fluidnosti biomembrana i tvorbi lipoproteinskih čestica. U ovom radu prikazana je IR spektroskopija kolesterola, koja obuhvaća pripravu uzorka kolesterola za snimanje IR spektra, asignaciju IR spektra te primjenu IR spektoskopije u analizi uzoraka koji sadrže kolesterol. Detaljno je analiziran IR spektar kolesterola uz pridruživanje načina vibriranja pojedinim vrpcama u spektru. Potencijalna primjena IR spektroskopije kolesterola predstavljena je na primjeru kvantitativnog određivanja kolesterola u serumu i mliječnim proizvodima.

§ 1. UVOD

Infracrveno zračenje obuhvaća dio elektromagnetskog spektra od 1 μm do 1 mm te se njegovom apsorpcijom pobuđuju unutarnja gibanja u molekuli – vibracije. Da bi došlo do pobude vibracije u molekuli mora postojati promjena dipolnog momenta, a broj načina vibriranja molekule ovisi o njenom obliku tj. da li se radi o linearnoj ili nelinearnoj molekuli. Rezultat apsorpcije infracrvenog zračenja neke molekule je IR spektar te se njegovom asignacijom mogu dobiti informacije o strukturi promatrane molekule.

U ovom radu proučavan je IR spektar molekule kolesterola te primjena IR spektroskopije kolesterola. Kolesterol je vrlo važna biomolekula u skupini sterola sa strukturom od četiri sraštena prstena. Zbog svoje strukture ima ulogu regulatora fluidnosti membrane, a većina sinteze kolesterola zbiva se u jetri odakle se u obliku lipoproteinskih čestica prenosi u ostatak organizma. Višak lipoproteinskih čestica poput LDL-a (lipoproteini niske gustoće, engl. *low-density lipoproteins*) u serumu može biti uzrok nastanka aterosklerotičnih naslaga u krvnim žilama što je vrlo opasno zbog mogućnosti začepljenja krvne žile, dok se povećana količina lipoproteinskih čestica poput HDL–a (lipoproteini visoke gustoće, engl. *high-density lipoproteins*) povezuje sa smanjenim rizikom od nastanka kardiovaskularnih bolesti.

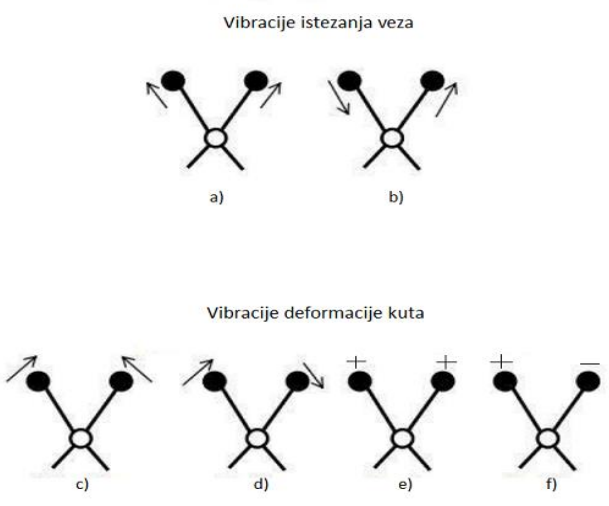
Primjena IR spektroskpije u određivanju kolesterola je široka, a u ovom radu opisana je potencijalna primjena u kvantitativnom određivanju količine kolesterola LDL i HDL u serumu te određivanju kolesterola u mliječnim proizvodima. Obje primjene koriste statističke i matematičke modele za obradu podataka poput parcijalne metode najmanjih kvadrata (engl. *partial least-squares,* PLS) i regresije po glavnim komponentama (engl. *principal component regression,* PCR).

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija je instrumentna metoda koja se temelji na interakciji infracrvenog zračenja i tvari. Primjenjuje se za strukturnu analizu i identifikaciju spojeva, ali i određivanja kemijskog sastava uzorka.

Područje infracrvenog zračenja obuhvaća dio elektromagnetskog spektra od 1 μm do 1 mm te se dijeli na blisko (0,78–2,50 μm), srednje (2,50–25 μm) i daleko (25–1000 μm) infracrveno područje. U srednjem i dalekom infracrvenom području pobuđuju se osnovne i kombinirane vibracije, dok se u bliskom infracrvenom području uz kombinirane vibracije pobuđuju i viši tonovi. Uvjet koji mora biti zadovoljen da bi došlo do apsorpcije zračenja i pobude vibracijskog gibanja jest da se tijekom vibracije mijenja dipolni moment u molekuli. Broj normalnih načina vibriranja molekule iznosi 3N–5 za linearnu, odnosno 3N–6 za nelinearnu molekulu. Vibracije se dijele na vibracije istezanja veza i vibracije svijanja ili deformacije kuta između veza. Vibracije istezanja veze mogu biti simetrične i antisimetrične. Za troatomne skupine atoma, u kojima su na središnji atom jedne vrste vezana dva atoma druge vrste, vibracije deformacije dijele se na striženje, zibanje, klaćenje i uvijanje (slika 1), dok se za složenije skupine atoma razlikuju deformacije u ravnini i izvan ravnine.



Slika 1. Prikaz molekulskih vibracija: a) simetrična vibracija, b) anitsimetrična vibracija, c) srtiženje, d) zibanje, e) klaćenje, f) uvijanje (preuzeto i prilagođeno prema ref. 1)

Apsorpcija zračenja i pobuda vibracije u molekuli rezultira nastankom apsorpcijske vrpce, koju karakteriziraju položaj, intenzitet i širina. Prikaz svih apsorpcijskih vrpci nastalih snimanjem jednog uzorka naziva se IR spektar, koji prikazuje ovisnost apsorbancije (*A*) ili transmitancije (*T*) o valnom broju. Valni broj je veličina koja se koristi u IR spektroskopiji jer je proporcionalna energiji, a definira se kao recipročna vrijednost valne duljine apsorbiranog zračenja. Najčešće promatrano spektralno područje (srednje infracrveno područje) obuhvaćeno je intervalom 4000–400 cm^{-1} te se dijeli na područje vibracija funkcionalnih skupina (4000–1400 cm^{-1}) i područje „otiska prsta“ (1400–400 cm^{-1}) karakteristično za pojedini spoj.

Priprema uzorka za snimanje općenito ovisi o agregatnom stanju uzorka, a za spojeve kao što su steroli tj. kolesterol, koji je molekula od interesa u ovom radu, snima se spektar uzorka najčešće u čvrstom stanju ili u obliku filmova.

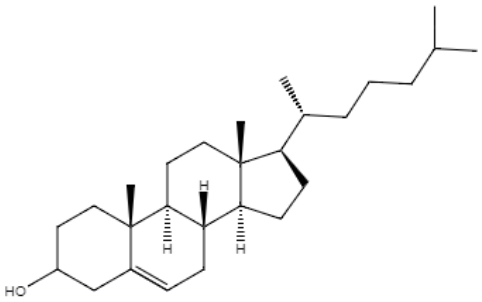
IR spektar se snima pomoću spektrometra čiji su osnovni dijelovi izvor zračenja, spektralni uređaj i detektor, a koji danas postoje u različitim izvedbama. Najčešće se koriste IR spektrometri s Fourierovim transformacijama (FT), koji su zbog većeg odnosa signala prema šumu, veće osjetljivosti i točnosti valnoga broja, pogodni za analizu otopina niskih koncentracija.[2] Kvantitativna analiza otopina pomoću IR spektroskopije moguća je primjenom Beer-Lambertovog zakona, a današnje metode uključuju i primjenu matematičkih i statističkih modela, razvijenih pomoću modela poput parcijalne metode najmanih kvadrata (PLS) i regresije po glavnim komponentama (PCR).

2.2. Kolesterol

Infracrvena spektroskopija danas je jedna od osnovnih metoda za brzu identifikaciju novih i nepoznatih steroida te kvantitativnu analizu poznatih steroida.[3]

Kolesterol je vrlo važna biomolekula koja se svrstava u skupinu membranskih lipida, a zbog strukture čiju glavninu čine četiri sraštena prstena ubraja se u steroide. Zbog svoje rigidne strukture ima ulogu regulatora fluidnosti membrane, pri čemu se fluidnost smanjuje povećanjem količine kolesterola u membrani. Preteča je u sintezi drugih steroidnih molekula, poput steroidnih hormona, žučnih soli i vitamina D. Sintetizira se u svim stanicama sisavaca, a glavnina sinteze odvija se u jetri odakle se krvotokom prenosi u ostatak organizma u obliku lipoproteinskih čestica – hilomikrona, VLDL-a (lipoproteini vrlo niske gustoće, engl. *very low density lopoproteins*), IDL-a (lipoproteini srednje gustoće, engl. *intermediate-density*

lipoproteins), LDL-a i HDL-a. Visoka razina kolesterola u serumu pogoduje nastanku aterosklerotičnih naslaga u krvnim žilama, što je vrlo opasno po zdravlje. Do nastanka takvih nakupina dovodi povećana razina kolesterola LDL u serumu, zbog čega se on još naziva „loš kolesterol“, dok HDL služi isključivo prijenosu kolesterola te se naziva „dobar kolesterol“. Na slici 2 je prikazana struktura molekule kolesterola, na kojoj je vidljivo da uz četiri sraštena prstena molekula sadrži i tri metilne skupine, hidroksilnu skupinu i razgranati alkilni lanac.



Slika 2. Molekulska struktura kolesterola

2.3. Priprava uzorka

Način priprave uzorka za snimanje IR spektra ovisi o agregatnom stanju uzorka. IR spektar sterola najčešće se snima u čvrstom i tekućem stanju.

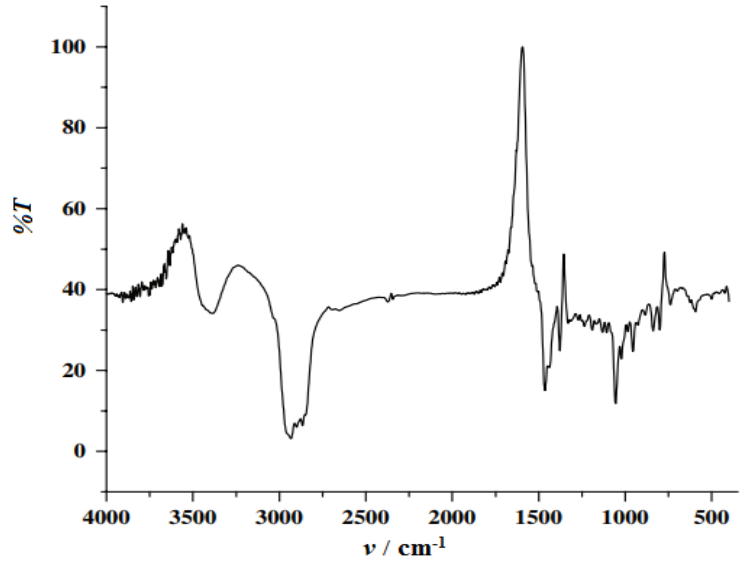
Prilikom priprave uzorka kolesterola u čvrstom stanju koristi se tehnika prešanja KBr pastile. Uzorak mase 1 mg miješa se s kalijevim bromidom u odnosu 1 : 100 i usitnjava u ahatnom tarioniku. KBr propušta IR zračenje do 400 cm^{-1}, što je pogodno jer ne apsorbira zračenje u promatranom području spektra. Usitnjena smjesa preša se pomoću hidrauličke preše u tanku pastilu, koja se zatim u posebnom nosaču stavlja u IR spektrometar. Čvrsti uzorak kolesterola također je moguće pripraviti u parafinskom ulju Nujolu. Suspenzija u ulju nanosi se između dva prozora od kalijeva bromida, koji se smještaju u nosač i postavljaju u spektrometar na put zračenju. Prilikom snimanja IR spektara bioloških uzoraka, a u svrhu kvantitativnog određivanja kolesterola, često se koristi tehnika priprave suhih filmova. Pri tome se tekući uzorak izlijeva na prozore propusne za IR zračenjei suši. Sušenjem uzorka izbjegava se interferencija vibracijskih vrpci vode koju biološki uzorci najčešće sadrže.

2.4. IR spektar kolesterola

Molekula kolesterola sastoji se od 74 atoma te posjeduje 216 normalnih načina vibriranja,[4] od kojih mnogi nisu vidljivi u IR spektru. Ipak, IR spektar kolesterola je složen, a njegovu asignaciju moguće je provesti bilo korištenjem tablica za asignaciju skupina spojeva i literaturno dostupnih podataka o strukturno sličnim spojevima bilo pomoću računalnih metoda koje računaju vibracijske frekvencije određene molekule i omogućavaju usporedbu s eksperimentalno snimljenim spektrom. U ovom radu navedene vrpce i njima pridružene vibracije skupina atoma preuzete su iz znanstvenog članka u kojem je spektar analiziran primjenom računalnih metoda.[4]

FT-IR spektar kolesterola prikazan je na slici 3, a asignacija opaženih vrpci dana je u tablici 1. Široka vrpca pri 3400 cm^{-1} odgovara istezanju skupine OH, dok svijanje iste skupine, koje inače rezultira vrpcom u području od 1500–1300 cm^{-1}, nije primjećeno u spektru kolesterola. Vrpce koje se javljaju u području spektra od 3000 do 2800 cm^{-1} odgovaraju simetričnim i antisimetričnim vibracijama istezanja metilenskih (CH_2) i metilnih (CH_3) skupina. Točnije, radi se o vrpcama koje se nalaze pri 2866 cm^{-1}, 2899 cm^{-1} i 2932 cm^{-1}, a pripadaju redom simetričnom istezanju skupina CH_2 i CH_3, simetričnom istezanju skupine CH_2 (oštra vrpca) te antisimetričnom istezanju skupina CH_2 i CH_3. Istezanje dvostruke veze u jednom od sraštenih prstenova kolesterola daje slabu vrpcu pri 1674 cm^{-1}, dok vrpce pri 985, 927 i 674 cm^{-1} potječu od vibracija svijanja kuta između dvostruke veze C═C i veze kojom je vodikov atoma vezan na dvostruku vezu. Vrpca pri 1464 cm^{-1} posljedica je antisimetrične deformacije metilne skupine, dok se vrpca pri 1378 cm^{-1} pripisuje simetričnoj deformaciji metilne skupine i svijanju metilenske skupine. Vibracija deformacije prstena u molekuli kolesterola rezultira oštrom vrpcom pri 1055 cm^{-1}, a istezne vibracije veza C─C u prstenovima vrpcom pri 840 cm^{-1}. Sve vrpce u području ispod 900 cm^{-1} posljedica su vibracija svijanja skupina CH izvan ravnine.

IR spektar kolesterola je jedinstven te je svojevrstan „otisak prsta“ molekule kolesterola.[4] IR spektar bilo kojeg uzorka kolesterola sadržavat će karakteristične vibracijske vrpce. Stoga je analiza i asignacija njegova spektra od velike koristi pri analizi složenih uzoraka koji sadrže kolesterol.



Slika 3. IR spektar kolesterola (preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)

Tablica 1. Asignacija vibracijskih vrpci u IR spektru kolesterola[4]

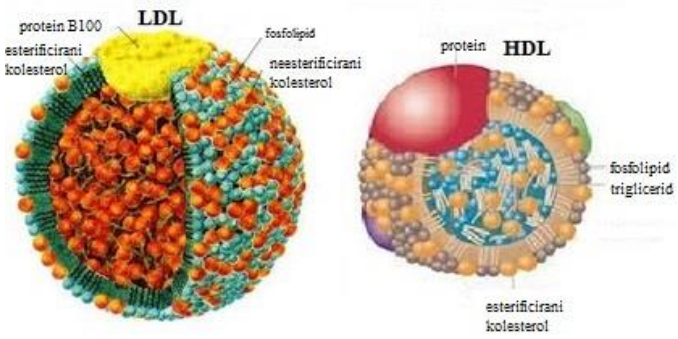
Valni broj / cm^{-1}		Asignacija
Eksperimentalni IR spektar	Izračunati IR spektar	
674	713	svijanje izvan ravnine ═CH
700	739	svijanje izvan ravnine CH
739	787	svijanje izvan ravnine CH
800	801	svijanje izvan ravnine CH
840	847	istezanje C─C─C
885	899	svijanje izvan ravnine CH
927	927	svijanje ═CH
985	994	svijanje ═CH
1022	1005	svijanje u ravnini CH
1055	1042	deformacije prstena
1108	1104	svijanje u ravnini CH
1131	1136	svijanje u ravnini CH
1170	1178	svijanje u ravnini CH
1191	1185	istezanje C─C
1236	1245	deformacija CH_2
1272	1268	svijanje CH_2
1317	1306	klaćenje CH_2
1331	1331	svijanje CH_2
1378	1382	simetrična deformacija CH_3 i svijanje CH_2
1438		svijanje CH_2 i CH_3
1464	1469	antsimetrična deformacija CH_3
1674	1665	istezanje C═C
2866	2876	simetrično istezanje C─H (CH_2 i CH_3)
2899		simetrično istezanje C─H (CH_2)
2932	2957	antisimetrično istezanje C─H (CH_2 i CH_3)
3400		istezanje O─H

2.5. Kvantitativno određivanje kolesterola LDL i HDL u serumu IR spektroskopijom

Lipoproteini niske gustoće (LDL) i lipoproteini visoke gustoće (HDL) pripadaju skupini lipoproteinskih čestica koje služe za prijenos kolesterola i triacilglicerola u tjelesnim tekućinama, a glavni su izvor kolesterola za stanice izvan jetre i crijeva.[5] Povećana razina

LDL u krvi može uzrokovati zadebljanje krvnih žila i nastanak ateroskleroze, dok se HDL povezuje sa smanjenim rizikom nastanka kardiovaskularnih bolesti. Zbog toga je važno pratiti njihovu količinu u krvi, osobito kod kritičnih skupina ljudi. Za određivanje količine kolesterola trenutno se uz standardne kliničke testove (za određivanje kolesterola HDL, ukupnog kolesterola i triglicerida), koristi Friedwaldova fomula (za određivanje kolesterola LDL), koja nije primjenjiva u slučajevima kada su u serumu prisutni hilomikroni te kod pacijenata koji su alkoholičari ili imaju dijabetes tipa 2.[6] Osim navedenih funkcionalnih razlika, LDL i HDL se razlikuju i strukturno (slika 4). LDL se sastoji od 50% kolesterola i 25% proteina (B100 protein), dok je HDL veći te se sastoji od 20% kolesterola i 50% proteina (proteini A–1 i A–11).

Na nizu uzoraka seruma istražena je potencijalna primjena infracrvene spektroskopije za određivanje kolesterola LDL i HDL u serumu.[6] Uzorci za snimanje pripremani su tehnikom filmova, odnosno izlijevanjem otopina na prozore od barijeva fluorida i sušenjem pod sniženim tlakom. Serum je otopina koja uz kolesterol sadrži mnoge tvari poput proteina, triglicerida, uree, glukoze i dr., te je spektar suhog filma pripravljenog iz takve otopine izrazito složen zbog raznih spektralnih doprinosa svake od navedenih molekulskih vrsta.[6]



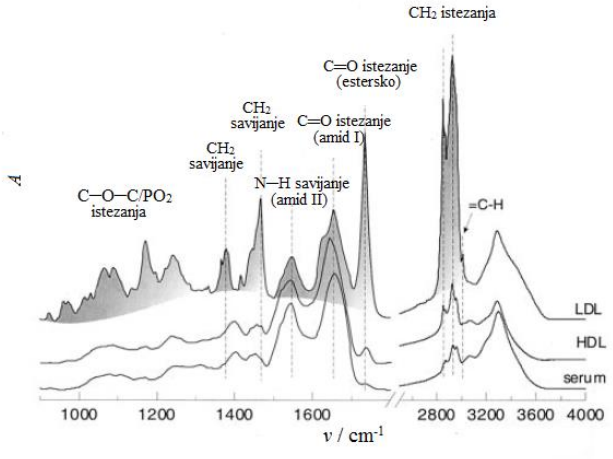
Slika 4. Struktura HDL i LDL (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7)

Zbog toga je za analizu spektra razvijen kalibracijski model pomoću parcijalne metode najmanjih kvadrata, koji je omogućio istovremeno određivanje koncentracija pojedinih sastojaka (LDL i HDL). Rezultati kalibracijskog modela uspoređeni su s rezultatima klasičnih kliničkih testova.

Za provedbu regresije PLS snimljeni su spektri LDL-a, HDL-a i seruma te je provedena njihova analiza (slika 5). Zbog sličnog molekulskog sastava u spektrima se mogu opaziti

vrpce koje odgovaraju vibracijama istih molekulskih skupina. Primjerice, uočavaju se vrpce pri 2852 cm^{-1} i 2926 cm^{-1} koje potječu od simetričnog i antisimetričnog istezanja metilenske skupine. Zatim slijede vrpce nastale uslijed istezanja skupina C═O iz esterskih veza esterificiranih molekula kolesterola pri 1735 cm^{-1}, koja je najintenzivnija u spektru LDL-a. Pri 1655 cm^{-1} i 1546 cm^{-1} nalaze se vrpce nastale istezanjem peptidnih skupina u proteinima, prva vrpca (amid I) posljedica je istezanja skupine C═O u peptidnoj vezi, a druga vrpca (amid II) svijanja skupine NH. Strižne vibracije skupine CH_2 opažaju se pri 1467 cm^{-1}, dok se pri 1446 cm^{-1} i 1378 cm^{-1} nalaze vrpce koje se pripisuju simetričnom i antisimetričnom svijanju skupina CH_3 u lipidima i proteinima. Posljednje asignirane vrpce u spektru, one koje odgovaraju skupinama PO_2^- u strukturi lipida, nalaze se pri 1242 cm^{-1} i 1088 cm^{-1}, dok se vrpce simetričnog i antisimetričnog istezanja esterske skupine C─O─C javljaju pri 1173cm^{-1} i 1065 cm^{-1}.

Zahvaljujući svojem sastavu LDL se znatno razlikuje od HDL-a i seruma, ponajprije po visokom udjelu esterificiranog kolesterola, pa se u njegovom spektru opažaju vrlo jake apsorpcijske vrpce istezanja C═O veze esterske skupine pri 1735 cm^{-1} i istezanja CH_2 pri 2852 cm^{-1} i 2926 cm^{-1}. U spektru HDL-a navedene apsorpcijske vrpce su značajno slabijeg intenziteta zbog veće količine proteina koje te čestice sadrže.



Slika 5. IR spektri LDL-a, HDL-a i seruma (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8)

Zatim su pripravljene otopine različitih koncentracija LDL-a i HDL-a (slučajno odabranim uzorcima su dodane poznate količine LDL-a/HDL-a) te je svakoj otopini snimljen IR spektar.

Utvrđeno je da se povećenjem koncentracije LDL-a/HDL-a u otopini intenziteti karakterističnih apsorpcijskih povećavaju, primjerice vrpci pri 1736 cm^{-1}, 2852 cm^{-1} i 2926 cm^{-1}. Pri tome je primjećena linearna korelacija između koncentracije kolesterola LDL i kolesterola HDL u otopini i odgovrajućih apsorbancija tj. pokazano je da vrijedi Beer-Lambertov zakon. Razlika u izgledu spektara i dobra korelacija između apsorbancije i koncentracije omogućuje regresiju PLS i kvantitativno određivanje koncentracije kolesterola LDL i HDL u istoj otopini. Za izradu PLS modela korištena su različita spektralna područja: 1800–1700 cm^{-1} i 3000–2800 cm^{-1} za LDL, a 1500–900cm^{-1}, 1800–1700 cm^{-1} i 3500–2800 cm^{-1} za HDL.

Razvijeni modeli pokazali su vrlo dobro slaganje s koncentracijama izmjerenim klasičnim kliničkim testovima, što je ukazalo na potencijalnu primjenu IR spektroskopije za određivanje kolesterola HDL i LDL u serumu. Bolje slaganje rezultata IR spektroskopije i rezultata klasičnih kliničkih testova primijećeno je prilikom određivanja kolesterola LDL, a nešto lošije slaganje kod određivanja kolesterola HDL. Velika prednost IR spektroskopije u odnosu na rutinski korištene metode je mogućnost istovremenog određivanja kolesterola LDL, kolesterola HDL, triglicerida i ukupnog kolesterola korištenjam samo jedne metode, dok se u sklopu standardne kliničke procedure koristi nekoliko metoda uz Friedwaldovu formulu koju nije moguće primjeniti u svim slučajevima. Također, prilikom određivanja koncentracije kolesterola u serumu pomoću IR spektroskopije nije potreban nikakav reagens, a pritom se koristi samo mala količina uzorka (5 μL). Ova metoda je i jeftnija u usporedbi s kliničkim metodama. Sve u svemu, istraživanje je pokazalo da IR spektroskopija ima veliki potencijal za primjenu u kliničkom određivanju koncentracije kolesterola u serumu, samo je potrebno istražiti utjecaj onečišćenja na spektar i osmisliti prilagodbe kako bi bila pogodna za rutinsku upotrebu.

Određivanju količine kolestesterola LDL u serumu moguće je i u bliskom infracrvenom području (12800–4000 cm^{-1}).[8] U istraživanju provedenom na ovu temu, isto kao i prilikom određivanja kolesterola pomoću IR spektroskopije u srednjem infracrvenom području, koristila se metoda parcijalnih najmanjih kvadrata za izradu modela, a za razliku od prethodnog istraživanja snimani su spektri tekućih uzoraka. Iako su rezultati pokazali dobro slaganje prilikom određivanja kolesterola LDL, triglicerida i ukupnog kolesterola, ova metoda nije se pokazala pouzdanom za određivanje kolesterola HDL.

2.6. Određivanje kolesterola u mliječnim proizvodima IR spektroskopijom

Primjena spektroskopskih tehnika u prehrambenoj industriji sve više raste, primjerice u mljekarstvu, gdje omogućuje brzu i jeftinu kvalitativnu i kvantitativnu analizu bez razaranja uzorka, što posljedično olakšava proizvodnju i distribuciju hrane.[9] Infracrvena spektroskopija, kao metoda navedenih karakteristika, odabrana je za određivanje kolesterola u mliječnim proizvodima. Uobičajena metoda određivanja kolesterola u mliječnim proizvodima uključuje saponifikaciju s metanolnom otopinom kalijeva hidroksida, ekstrakciju nesaponificiranih frakcija s heksanom i daljnju analizu plinskom kromatografijom, u ukupnom trajanju od tridesetak minuta po uzorku.[10] Iako jednostavna, kromatografska metoda neprikladna je za analizu velikog broja uzoraka, spora je i skupa.

Istraživanje provedeno na komercijalnim uzorcima mliječnih proizvoda pokazalo je da se FT-IR spektroskopija može koristiti za određivanje kolesterola.[11] Za predviđanje količine kolesterola u uzorcima korišten je model razvijen metodama parcijalnih najmanjih kvadrata i regresije po glavnim komponentama, a rezultati su provjereni pomoću standardne metode određivanja s ftalaldehidom i metodom dodavanja poznate količine analita. Metoda određivanja kolesterola s ftalaldehidom uključuje uparavanje uzorka nakon ekstrakcije heksanom, dodatak ftalaldehida i sumporne kiseline, te mjerenje apsorbancije proporcionalne koncentraciji kolesterola u uzorku. Analizirani su uzorci mliječnih proizvoda poput mlijeka, mlijeka u prahu, jogurta, sira i maslaca te je promatrano područje spektra između 3000 i 2800 cm^{-1}, u kojem se opažaju vrpce simetričnog i asimetričnog istezanja metilenskih i metilnih skupina. Rezultati su uspoređeni s rezultatima standardne metode s ftalaldehidom (tablica 2) te su uočena slaganja. Predložena metoda pokazala se jeftinijom i bržom, pri čemu je rezultat dobiven u manje od pet minuta.[11]

Tablica 2. Usporedni prikaz koncentracija kolesterola određenih standardnom metodom s ftalaldehidom i FT-IR metodom[11]

Mliječni proizvod	Koncentracija kolesterola određena standardnom metodom s ftalaldehidom (mg/100 mL)	Koncentracija kolesterola određena FT-IR metodom (mg/100 mL)
Mlijeko	13,067	13,142
Jogurt	1,956	2,167
Mlijeko u prahu	19,733	21,02
Sir	77,067	78,425
Maslac	204	208,059

Zaključno, kolesterol je složena biomolekula koja ima vrlo važnu ulogu u regulaciji fluidnosti biomembrana i sastavni je dio lipoproteinskih čestica koje prenose kolesterol krvotokom. Njegov IR spektar je složen, iako je moguće većinu vrpci pridružiti određenim načinima vibriranja skupina atoma u molekuli, između kojih se najviše ističu vrpce koje potječu od simetričnog i antisimetričnog istezanja skupina CH_2 i CH_3 te istezanje veza O─H i C═C. Poznavanje spektra kolesterola izuzetno je korisno u slučaju analize složenih realnih uzoraka koji sadrže kolesterol. IR spektroskopija kolesterola pronašla je potencijalnu primjenu u kvantitativnom određivanju kolesterola u serumu i mliječnim proizvodima uz uporabu matematičkih i statističkih modela.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. https://www.researchgate.net/figure/275583514_fig9_Figure-13-Schematic-representation-of-the-different-molecular-vibration-modes-showing (datum pristupa 4. srpnja 2017.)
2. H. Günzler, H. U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006, str. 54-55.
3. http://journals.sagepub.com/doi/pdf/ (datum pristupa 27. ožujka 2017.)
4. U. Gupta, V. K. Singh, V. Kumar, Y. Khajuria, *Mater. Focus*, **3** (2014) 211-217.
5. J. M. Berg, J. T. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 742.
6. K. Z. Liu, R. A. Shaw, A. Man, T. C. Dembinski, H. T. Mantsch, *Clin. Chem.* **48** (2002) 499-506.
7. http://cholesterolinformationforyou.weebly.com/uploads/2/6/5/9/26590190/8131970.jpg?427 (datum pristupa 26. kolovoza 2017.)
8. K. Z. Liu, M. Shi, A. Man, T. C. Dembinski, R. A. Shaw, *Vib. Spectrosc.* **38** (2005) 203-208.
9. B. Matijević, M. Blažić, *Mljekarstvo* **58** (2008) 151-169.
10. http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(98)75842-4/pdf (datum pristupa 14. srpnja 2017.)
11. M. M. Paradkar, J. Irudayaraj, *Int. J. Dairy Technol.* **55** (2002) 127-132.