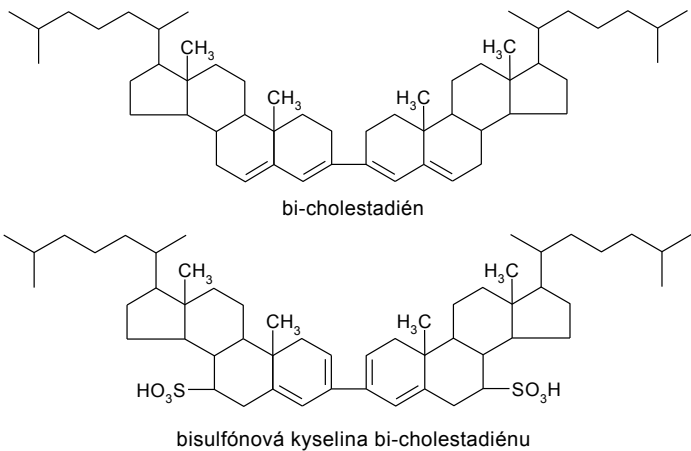


TÉMA	LIPIDY						
Úloha 12:	Stanovenie koncentrácie cholesterolu						
Princíp:	<p>Cholesterol patrí medzi najdôležitejšie steroly. V krvi sa transportuje v podobe lipoproteínov. V malom množstve je nevyhnutnou súčasťou organizmu, kde sa zúčastňuje na osmotických a difúzných procesoch bunky (je súčasťou biologických membrán.).</p> <p>Poruchy metabolizmu a transportu cholesterolu podporujú vznik srdcovo-cievnych ochorení. Jeho nadmerný príjem v potrave spôsobuje zúženie priesvitu (vnútorného prierezu) ciev a následné cirkulačné poruchy. Keďže sa cholesterol nachádza v živočíšnych potravinách, mal by sa ich príjem v strave obmedzovať.</p> <p>Pri Liebermann-Burchardovej reakcii sa z cholesterolu v prostredí kyseliny octovej a sírovej odštiepuje molekula vody, pričom vzniká karbóniový kation 3,5-cholestadiénu. Jeho oxidáciou v prítomnosti acetanhydridu vzniká modrozelený produkt, pentaenylový kation s absorpčným maximom 620 nm:</p>						
	<div style="text-align: center;"> <p style="text-align: center;">cholesterol + CH₃COOH, H₂SO₄ pentaenylový kation + acetanhydrid</p> </div>						
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> štandardný roztok cholesterolu v chloroforme s koncentráciou 1 mg/ml vzorka cholesterolu s neznámou koncentráciou chloroform Liebermann-Burchardov roztok (0,5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej zmiešame s 10 ml vychladeného acetanhydridu. Následne, za stáleho miešania, pridáme 5 ml ľadovej kyseliny octovej. Pripravený roztok uchováme v chlade. Pred použitím necháme zohriať na izbovú teplotu.) 						
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, sklenené kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	<p>Do šiestich označených skúmaviek pipetujeme sklenenými pipetami štandardný roztok cholesterolu (1 mg/ml) podľa tabuľky 2.7 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 3 ml roztoku vzorky cholesterolu s neznámou koncentráciou (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky).</p> <p>Pozor, pri stanovovaní absorbancie jednotlivých roztokov kyvetu nepremývame vodou. Používame sklenené (nie plastové!) kyvety.</p>						
TABUĽKA 2.7	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard cholesterolu [ml]	–	0,5	1	1,5	2	2,5	–
neznáma vzorka [ml]	–	–	–	–	–	–	3
Lieb.-Burch. roztok [ml]	2	2	2	2	2	2	2
chloroform [ml]	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2
	zazátkovať a premiešať nechať 15 min reagovať v tme určiť absorbanciu pri 620 nm						
množstvo cholesterolu v skúmavke [mg]	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	x
absorbancia pri 620 nm	–						

Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorpcie štandardného roztoku cholesterolu pri 620 nm od množstva) a z neho určíme množstvo cholesterolu v mg na 3 ml vzorky (x) . Túto hodnotu následne prepočítame na 1 ml vzorky. Stanovené množstvo cholesterolu porovnáme so skutočnou hodnotou a vypočítame relatívnu chybu (v %).
Záver:	Uvedieme koncentráciu cholesterolu vo vzorke (v mg/ml) spolu s relatívnou chybou.
Úloha 13:	Dôkaz cholesterolu: Salkowského reakcia
Princíp:	<p>Koncentrovaná kyselina sírová je značne hygroskopická a spôsobuje odštiepenie vody z molekuly cholesterolu. Pritom dochádza ku kovalentnému spojeniu dvoch molekúl cholesterolu na pozícii 3 za vzniku bi-cholestadiénu. Následne sa kyselina sírová viaže na molekulu bi-cholestadiénu na pozíciách 7 a 7', pričom sa tvorí finálny produkt, červeno sfarbená bi-sulfónová kyselina bi-cholestadiénu.</p>  <p style="text-align: center;">bi-cholestadién</p> <p style="text-align: center;">bisulfónová kyselina bi-cholestadiénu</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. živočíšny tuk 2. rastlinný olej 3. 2 % roztok cholesterolu v chloroforme 4. chloroform 5. koncentrovaná kyselina sírová
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, mikropipety
Postup:	Do prvej skúmavky dáme 1 g živočíšneho tuku, do druhej 1 ml rastlinného oleja a do tretej 1 ml chloroformového roztoku cholesterolu. Do každej z nich pridáme po 4 ml chloroformu a 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Opatrne premiešame a necháme stáť. Pozorujeme postupnú zmenu sfarbenia reakčných zmesí, pričom horné chloroformové vrstvy majú oranžové až červené sfarbenia a spodné kyselinové vrstvy sa sfarbia na žltozeleno.
Pozorovanie:	Porovnáme a zapíšeme sfarbenia roztokov v jednotlivých skúmavkách.