

1. V analizo dobiš vzorec mleka. Vzameš 2,5 ml mleka, dodaš ustrezno količino KOH in etanola ter hidroliziraš. Nato dodaš 3 ml vode ter 7 ml heksana. Od heksanske faze odvzameš 2 ml in z uporabo standardnih raztopin določiš, da je v 2 ml heksanske faze 145 µg holesterola. Koliko holesterola je v 100 ml mleka? Koliko je holesterola v mleku, če vemo, da holesterol vsebuje 15 % nečistoč?

2 ml145 µg
7 ml X

$X = (7 \text{ ml} * 145 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 507,5 \text{ µg}$ → kolikor je holesterola v 2,5 ml ga je sedaj v 7 ml heksanske faze → 7 ml heksanske faze = 2,5 ml mleka507,5 µg
100 ml mlekaX

$$X = (100 \text{ ml} * 507,5 \text{ µg}) / 2,5 \text{ ml} = 20300 \text{ µg} = 20,3 \text{ mg}$$

Nečistoče kot take ne dajejo obarvanih produktov ter tako ne motijo detekcije s spektrofotometrom. Nečistoče, ki pa se nahajajo v holesterolu pa jih eliminiramo na naslednji računski primer:

$0,15 * 20,3 \text{ mg} = 3,045 \text{ mg}$ je nečistoč → $20,3 \text{ mg} - 3,045 \text{ mg}$ nečistoč = 17,3 mg hol.

Ali pa: 100 % 20,3 mg

$(100 - 15) = 85 \%$ X → $X = (85 \% * 20,3 \text{ mg}) / 100 \% = 17,3 \text{ mg}$ holesterola

2. V analizo dobiš dva vzorca mleka. Vzorec A vsebuje 3,2 % maščob, medtem ko je v vzorcu B 1,6 % maščob. Oba vzorca analiziraš na enak način. Vzameš 4 ml mleka, dodaš ustrezno količino KOH, etanola, vode ter 6 ml heksana. Od heksanske faze odvzameš 2 ml in določiš maso holesterola. V 2 ml heksanske faze določiš za vzorec A 140 µg, za vzorec B pa 180 µg holesterola. Izračunaj koliko holesterola vsebuje 100 ml mleka. Ali bi eksperiment ponovil? Utemelji!

A → 2 ml140 µg

6 ml X → $X = (6 \text{ ml} * 140 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 420 \text{ µg}$

420 µg 4 ml

X100 ml → $X = (420 \text{ µg} * 100 \text{ ml}) / 4 \text{ ml} = 10500 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} \rightarrow 10,5 \text{ mg}$

B → 2 ml 180 µg

6 ml X → $X = (6 \text{ ml} * 180 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 540 \text{ µg}$

540 µg 4 ml

X100 ml → $X = (540 \text{ µg} * 100 \text{ ml}) / 4 \text{ ml} = 13500 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} \rightarrow 13,5 \text{ mg}$

Eksperiment bi ponovil, saj je očitno prišlo nekje med postopkom do napake, saj ni možno, da bi vzorec A, ki vsebuje 3,2 % maščob vseboval manj holesterola kot vzorec B, ki vsebuje le 1,6 % maščob. Mogoče smo pri analizi zamešali vzorce, ker v tem primeru bi bili izračuni sprejemljivi.

3. **Heksan je pri sobni temperaturi zelo hlapen. Predpostavi, da je med potekom eksperimenta, preden si odvzel 2 ml heksanske faze za nadaljno analizo, odparel 1 ml heksana. Ali to vpliva na rezultat? Če vpliva, uporabi podatke iz prve naloge in izračunaj pravilne vrednosti!**

Glede na podatke zgornje naloge, ... vzamem 4 ml mleka in dodam 6 ml mleka, vendar, ker mi je 1 ml odhlapel tako dodam samo 5 ml heksana. Sedaj je postopek podoben zgornjemu, le da upoštevamo 5 ml in ne 6 ml heksana.

A → 2 ml 140 µg

$$5 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (5 \text{ ml} \cdot 140 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 350 \text{ µg}$$

350 µg 4 ml

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (350 \text{ µg} \cdot 100 \text{ ml}) / 4 \text{ ml} = 8750 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} \rightarrow 8,75 \text{ mg}$$

B → 2 ml 180 µg

$$5 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (5 \text{ ml} \cdot 180 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 450 \text{ µg}$$

450 µg 4 ml

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (450 \text{ µg} \cdot 100 \text{ ml}) / 4 \text{ ml} = 11250 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} \rightarrow 11,3 \text{ mg}$$

Očitno je, da odparjen heksan pomembno vpliva na končni rezultat količine holesterola v mleku. Količina holesterola v tem primeru se je znižala in sicer zaradi tega, ker se ni moral ves holesterol vezati v heksan.

4. **V analizo dobiš vzorec mleka. Vzameš 2,5 ml mleka, dodaš 2 ml KOH in 2 ml etanola ter hidroliziraš. Nato dodaš 3 ml vode ter 7 ml heksana. Od heksanske faze odvzameš 4 ml in z uporabo standardnih raztopin določiš, da je v 4 ml heksanske faze 270 µg holesterola. Koliko holesterola je v 100 ml mleka?**

4 ml 270 µg

$$7 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (7 \text{ ml} \cdot 270 \text{ µg}) / 4 \text{ ml} = 472,5 \text{ µg}$$

472,5 µg 2,5 ml

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (472,5 \text{ µg} \cdot 100 \text{ ml}) / 2,5 \text{ ml} = 18900 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} \rightarrow 18,9 \text{ mg}$$

5. **Predpostavi, da si delal enako kot v prvi nalogi in dodal 7 ml heksana. Med ekstrakcijo je 0,8 ml heksana izparelo in šele potem si odpipetiral 4 ml heksana in določil, da je v 4 ml 270 µg holesterola. Koliko je holesterola v 100 ml mleka?**

4 ml 270 µg

$$6,2 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (6,2 \text{ ml} \cdot 270 \text{ µg}) / 4 \text{ ml} = 418,5 \text{ µg}$$

418,5 µg 2,5 ml

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (418,5 \text{ µg} \cdot 100 \text{ ml}) / 2,5 \text{ ml} = 16740 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} \rightarrow 16,7 \text{ mg}$$

6. Dejansko se ves holesterol ne ekstrahira v heksansko fazo in nekaj holesterola ostane tudi v vodni fazi. Predpostavi, da je razmerje molarnih koncentracij holesterola v vodni in heksanski fazi 1:5. Kolikšna je v tem primeru dejanska vsebnost holesterola v mleku? Vsi ostali podatki so isti kot v nalogi št. 4. Opomba: heksan predstavlja organsko fazo, vse ostale raztopine pa vodno fazo (mleko, KOH, etanol, voda).

Razmerje: voda: heksan=1:5 → za heksan vzamemo celotno dobljeno vrednost in sicer znaša 18,9 mg → $1:5=X:18,9\text{mg}$ → $X=(1*18,9\text{mg})/5=3,78\text{ mg}$ → dejanska vsebnost holesterola znaša: 3,78 mg (v vodi) + 18,9 mg (v heksanu) = 22,7 mg

7. Ko si določeval holesterol v mleku, se del holesterola (20 %) ni ekstrahiril v heksansko fazo. Medtem, ko je bila ekstrakcija v primeru standardnih raztopin popolna. Pri računu si predpostavil, da se je tudi pri vzorcu ekstrahiril ves holesterol in določil, da 100 ml mleka vsebuje 15 mg holesterola. Kakšna je dejanska vsebnost holesterola v mleku?

80 %15 mg

100 %X → $X=(100\%*15\text{mg})/80\%=18,75\text{ mg}$

8. Zakaj smo vzorec mleka kuhali v KOH?

Vzorec mleka smo kuhali zaradi tega, da s pomočjo baze in etanola razbili oz. hidrolizirali triacilglicerole oz. estrske vezi na glicerol in maščobne kisline. Maščobne kisline so se pod vplivom baze spremenile oz. zreagirale z njo do maščobnih soli in s tem zagotovili, da v vzorcu nimamo več maščobe, ki se nam bi kasneje lahko vezala na topilo heksan ter s temo motila analizo ter, da smo holesterol, ki je navadno v živem organizmu vezan na določen protein z estrsko vezjo to vez cepili, da smo s tem zagotovili, da imamo v vzorcu prost holesterol, ki se nam bo lahko vezal z topilom heksanom.

9. Zakaj smo heksan odparevali z dušikom in ne npr. s kisikom?

Heksan moramo odparevati s katerikoli inertnim plinom. Tovrstni plin mora imeti dve lastnosti. Prva je, da ne sme reagirati z OH skupinami na holesterolu (holesterol ima dve reaktivni mesti kamor bi se lahko vezal kisik in sicer eno mesto je OH drugo pa dvojna vez). Npr. kisik ni inertni plin, ker bi takoj reagiral z omenjeno funkcionalno skupino na holesterolu. Drugo lastnost pa je, da ne sme biti eksploziven, kar pa kisik je saj ob prisotnosti hlapnega heksana in iskre nastane močna eksplozija.

10. Zakaj se holesterol mnogo bolje topi v heksanu kot vodi?

Holesterol spada med lipide, kemično je sterol. Za tovrstne spojine je značilno, da so nepolarne, torej se ne topijo v vodi. Topijo pa se v nepolarnih topilih kot je npr. heksan.

11. Tik preden smo želeli izvesti vajo smo opazili, da nam je zmanjkalo dušika za odparevanje heksana, imamo pa jeklenko z argonom. Ali bi za odparevanje lahko uporabili argon? Utemelji!

Ker argon spada med inertne pline bi ga tako lahko uporabili, saj nebi reagiral z OH skupino in dvojno vezjo. Če bi uporabili kisik bi le ta zaradi svoje reaktivnosti takoj reagiral z tema mestoma v holesterolu.

12. Pojasni katere spojine bi se ekstrahirale v heksan poleg holesterola, če mleka nebi hidrolizirali s KOH? Odgovor utemelji!

V primeru, da mleka nebi hidrolizirali s KOH bi se v heksansko fazo vezale vse sestavine mleka, ki so po svoji naravi nepolarne to pa so: triacilgliceroli, lipidi in estri.

13. Izračunaj vsebnost holesterola v mleku (mg/100 ml mleka) z 0,5 %, 1,6 % in 3,5 % maščob. Razloži ali se določene vsebnosti holesterola v mleku z različnim deležem maščob skladajo s pričakovanimi!

A → Iz umeritvene krivulje odčitamo za 0,5 % maščob → 4,9 µg/ml

$$m_{\text{holesterola}} = \gamma_{\text{hol.}} \times V_{\text{heks.}} = 4,9 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 6\text{ml} = 29,4 \mu\text{g}$$

2 ml 29,4 µg

$$5 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (5 \text{ ml} \times 29,4 \mu\text{g}) / 2 \text{ ml} = 73,5 \mu\text{g}$$

73,5 µg 2 ml vzorca

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (73,5 \mu\text{g} \times 100\text{ml}) / 2 \text{ ml} = 3675 \mu\text{g} / 1000 \text{ mg} = 3,7 \text{ mg} \rightarrow 3,7 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

B → Iz umeritvene krivulje odčitamo za 1,6 % maščob → 9,6 µg/ml

$$m_{\text{holesterola}} = \gamma_{\text{hol.}} \times V_{\text{heks.}} = 9,6 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 6\text{ml} = 57,6 \mu\text{g}$$

2 ml 57,6 µg

$$5 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (5 \text{ ml} \times 57,6 \mu\text{g}) / 2 \text{ ml} = 144 \mu\text{g}$$

144 µg 2 ml vzorca

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (144 \mu\text{g} \times 100\text{ml}) / 2 \text{ ml} = 7200 \mu\text{g} / 1000 \text{ mg} = 7,2 \text{ mg} \rightarrow 7,2 \text{ mg} / 100\text{ml}$$

C → Iz umeritvene krivulje odčitamo za 3,5 % maščob → 15,0 µg/ml

$$m_{\text{holesterola}} = \gamma_{\text{hol.}} \times V_{\text{heks.}} = 15,0 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 6\text{ml} = 90 \mu\text{g}$$

2 ml 90 µg

$$5 \text{ ml} \dots\dots\dots X \rightarrow X = (5 \text{ ml} \times 90 \mu\text{g}) / 2 \text{ ml} = 225 \mu\text{g}$$

225 µg 2 ml vzorca

$$X \dots\dots\dots 100 \text{ ml} \rightarrow X = (225 \mu\text{g} \times 100\text{ml}) / 2 \text{ ml} = 11250 \mu\text{g} / 1000 \text{ mg} = 11,3 \text{ mg} \rightarrow 11,3 \text{ mg} / 100\text{ml}$$

Vsebnosti holesterola se skladajo s pričakovanimi, saj smo pričakovali, da bo v 0,5 % mastnem mleku vsebnost holesterola najmanjša med tem ko pri 3,5 % mleku najvišja. To smo pričakovali zaradi tega, ker se holesterol nahaja v mlečni maščobi in če je maščobe več je tudi prisotnega tudi več holesterola

14. Predpostavi, da si epruveto z mlekom z 1,6 % maščobe pred centrifugiranjem uravnotežil z:

a) 0,6 ml heksan

b) 0,6 ml H₂O

Izračunaj kakšen je pravilen rezultat v primeru a) in primeru b)!

a) ker dodamo 0,6 ml heksana ta volumen prištejemo predhodnem volumnu 5 ml in dobimo 5,6 ml heksana.

2 ml 57,6 µg

5,6 ml X → $X = (5,6 \text{ ml} \cdot 57,6 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 161,3 \text{ µg}$

2 ml (vzorec) 161,3 µg

100 ml X → $X = (100 \text{ ml} \cdot 161,3 \text{ µg}) / 2 \text{ ml} = 8065 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} = 8,1 \text{ mg}$

→ 8,1 mg holesterola/100 ml mleka

b) voda nima na analizo holesterola nobenega vpliva zato ostane koncentracija holesterola ista kot pri prejšnji nalogi in sicer znaša 7,2 ml holest./100 ml mleka

15. Med vajo se nam je tako kot ponavadi mudilo, zato nismo počakali predpisanih 30 min, da se razvije barva, ampak smo merili absorbanco nastalega kompleksa že po 10 min. Tudi pri pripravi umeritvene točke nismo bili najbolj načelni. Tu smo absorbanco določali po 20 min. Kolikšna je dejanska vsebnost holesterola v mleku z 1,6 % maščobe, če je prirast absorbance takšna funkcija časa kot je razvidno iz grafa?

Iz grafa sem odčital: $A_{10 \text{ min}} = 0,7$ ter $A_{20 \text{ min}} = 0,9$ $(0,9/0,7) \cdot 7,2 \text{ mg} = 9,3 \text{ mg} \rightarrow 9,3 \text{ mg}/100 \text{ ml}$

16. Heksan je relativno zelo hlapen in nam med postopkom odpareva. Pojasni kako to vpliva na pravilnost rezultatov analize! Pojasni kako bi problem lahko rešil tako tehnično kot računsko!

Če bi heksan odparel, bi na koncu dobili napačno vsebnost holesterola v mleku in sicer bi dobili večjo vsebnost. Koncentracija holesterola v heksanu se spremeni če ga odparevamo in sicer se njegova koncentracija poveča.

Tehnično bi problem rešil tako, da bi dodali volumen topila, ki je izhlapel še preden bi iz vzorca odpipetirali 2 ml heksanske faze.

Problema pa bi se lahko lotili tudi računsko tako kot je prikazano pri nekaterih zgornjih primerih.

17. Ali je holesterol vitamin?

Ne, holesterol je provitamin saj iz njega nastaja vitamin D₃, steroidni hormoni in žolčne kisline.

18. Ali holesterol uvrščamo med aromatske spojine (pomoč – benzen in derivati so aromatske spojine)? Utemelji!

Holesterol sicer ima v svoji strukturi 4 obroče in od teh so trije celo 6-členski vendar nobeden izmed njih ni benzenov obroč kar pomeni, da holesterol ni aromatska ampak ciklična spojina.