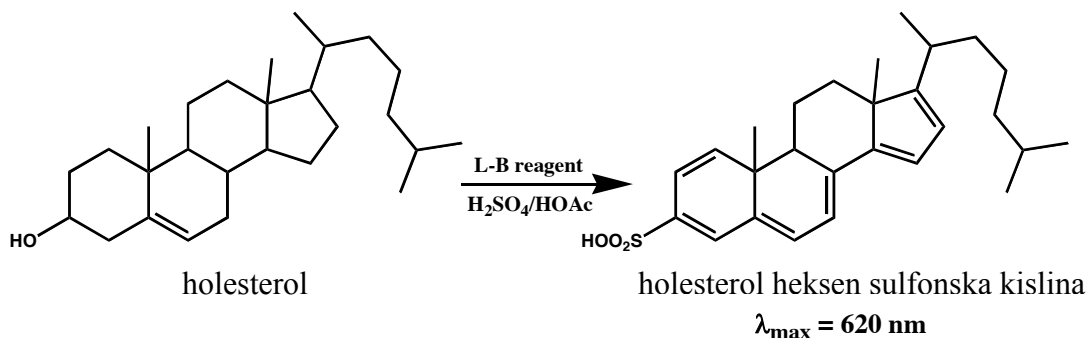


## Določanje holesterola

**Namen vaje:** Izolacija lipidov in določanje holesterola v kokošjih jajcih in govejih jetrih.

**Uvod:** Holesterol je za življenje živali nujno potrebna molekula. V živalski celici ima dve pomembni vlogi, je ključna komponenta membran živalskih celic, saj v njih uravnava njihovo fluidnost ter je tudi izhodna spojina pri sintezi steroidnih hormonov, žolčnih kislin in vitamina D. Kadar pride v organizmu do neučinkovitosti pri prenosu holesterola, nastopijo motnje metabolizma in posledično zdravstvene težave, bolezni srca in ožilja. Pri vaji bomo določali celokupno koncentracijo holesterola (holesterol in holesterolne estre) z metodo po Liebermann-Burchardu, pri kateri pride do tvorbe zeleno modrega kompleksa med žveplovo (VI) kislino, holesterolom in acetanhidridom.



Slika1: Tvorba zeleno modrega kompleksa pri metodi določanja holesterola po Liebermann-Burchardu.

### Potek dela:

#### Izolacija lipidov iz jajc

1. V 15 mL centrifugirko zatehtaj 1 g rumenjaka in dodaj 10 mL mešanice kloroform:metanol (2:1, v/v) ter premešaj z vibracijskim mešalom (vorteksiraj).
2. Prefiltriraj suspenzijo skozi filter papir in filtratu dodaj 0,2 volumna raztopine 0,02% CaCl<sub>2</sub>, dobro premešaj in počakaj, da se suspenzija loči v dve fazi.
3. S Pasteurjevo pipeto previdno odstrani zgornjo fazo.
4. Spodnji fazi dodaj 2 volumna mešanice kloroform:metanol: voda (2:50:50, v/v) in močno premešaj (vorteksiraj). Pusti na stojalu in počakaj, da se ločita organska in vodna faza.
5. Odstrani zgornjo fazo in zadrži le spodnjo organsko fazo. Določi volumen organski fazi.
6. 0,1 mL lipidov uporabi za določanje holesterola, preostanku pa bomo do naslednjič odstranili topilo in boste določili maso izoliranih lipidov iz enega grama rumenjaka.

#### Izolacija lipidov iz govejih jeter

1. Nareži 1 g govejih jeter ter jih homogeniziraj v 2 ml destilirane vode s teflonskim homogenizerjem.
2. V 15 mL centrifugirko odmeri 2 mL v destilirani vodi homogeniziranih govejih jeter. In dodaj 10 mL mešanice kloroform:metanol (2:1, v/v) ter nadaljuj s točko 2. zgornjega postopka.

#### Določanje holesterola

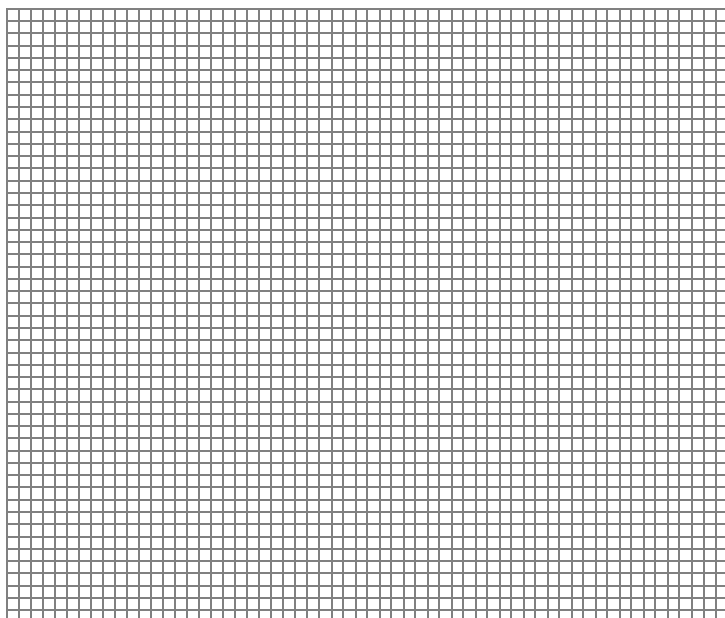
1. V 6 epruvet odpipetiraj po 100  $\mu\text{L}$  znane koncentracije holesterola (2,5 mM, 5 mM, 10 mM), lipide iz jajc, lipide iz jeter ter 100  $\mu\text{L}$  kloroforma za slepi vzorec.
2. Dodaj 1 mL Liebermann-Burchardovega reagenta in inkubiraj 10 min pri 35 °C.
3. Primerjaj intenzitete barv in oceni vsebnost holesterola z merjenjem absorbance pri 620 nm.

Pozor: delaj v digestoriju in uporablaj rokavice po navodilih asistenta!

## Rezultati:

Dopolni tabelo!

	vzorec	barva	$A_{620}$
1	slepi		/
2	2,5 mM holesterol		
3	5 mM holesterol		
4	10 mM holesterol		
5	jajce		
6	jetra		



## Odgovori na vprašanja:

1. Kakšna je vsebnost holesterola v kokošjih jajcih in govejih jetrih (mg holesterola na 1 g jeter oz. jajc)?
2. Ali si izoliral ves holesterol iz jeter?
3. Dnevna priporočljiva količina holesterola je 300 mg. Koliko jajc je potrebno zaužiti, da vnesemo zadostno količino holesterola? (M holesterola je 368,66 g/mol)