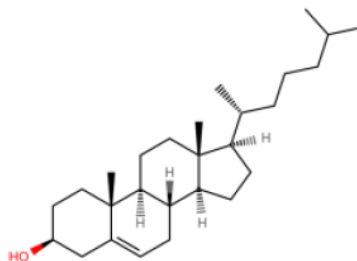


Ćwiczenie nr 1 (Maja Węlna)

Oznaczanie cholesterolu

CHOLESTEROL (Rys.1), $C_{27}H_{46}O$, organiczny związek, **lipid** z grupy **steroidów** (tj. związków posiadających układ cyklopentano-perhydrofenantrenu).



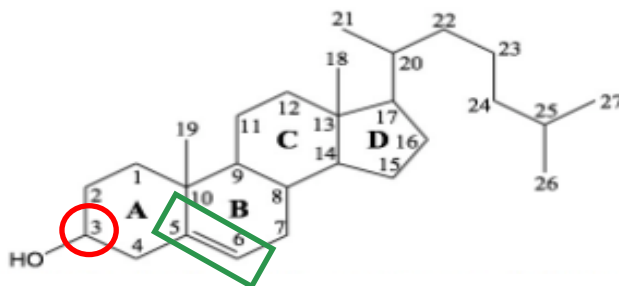
Rys.1. Częsteczka cholesterolu

Przedrostek *chole-* pochodzi od słowa *kholé* (z greckiego) oznaczającego żółć, natomiast *-stereós* (z greckiego) oznacza ciało stałe; przyrostek *-ol* wskazuje na klasę alkoholi (cholesterol to jeden z najważniejszych i najlepiej poznanych **steroli**, czyli alkoholi z grupy steroidów). Cholesterol w czystej postaci jest ciałem stałym (w temperaturze pokojowej) o wyglądzie białego lub prawie białego krystalicznego proszku (Rys. 2). Jest nierozpuszczalny w wodzie. Rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, m.in. w benzenie, chloroformie, eterze dietylowym, heksanie.



Rys.2. Wygląd/postać cholesterolu

Pod względem chemicznym cholesterol jest alkoholem i może tworzyć estry z kwasami tłuszczowymi. Cholesterol ulega reakcjom charakterystycznym dla posiadanych grup funkcyjnych (Rys. 3). Stąd będzie reagował jak alkohole (grupa hydroksylowa **-OH** przy trzecim atomie węgla) lub jak alkeny (wiązanie podwójne między piątym i szóstym atomem węgla **-C=C-**). Wykazuje **amfipatyczny** charakter z uwagi na hydrofobowy ogon węglowodorowy i polarną grupę hydroksylową.



Rys.3. Numeracja atomów C wraz z grupami funkcyjnymi w cząsteczce cholesterolu

Z biologicznego punktu widzenia cholesterol jest połączeniem białek i lipidów, tzw. **lipoprotein**, czyli substancji tłuszczowo-białkowych. Wyróżniamy 2 rodzaje lipoprotein, będące formą transportową cholesterolu:

- **LDL**: niskiej gęstości (tzw. „zły” cholesterol) – odpowiada za pobieranie i transport cholesterolu oraz jego estrów z wątroby do wielu tkanek
- **HDL**: wysokiej gęstości (tzw. „dobry” cholesterol) – usuwa wolny cholesterol z tkanek i transportuje go do wątroby, gdzie jest eliminowany z organizmu w niezmienionej formie lub w postaci kwasów żółciowych

Cholesterol występuje w organizmie człowieka i pochodzi częściowo z pokarmu, w większości jednak jest syntetyzowany we własnych komórkach. Cholesterol jest niezbędny do produkcji licznych hormonów, kwasów

żółciowych oraz witaminy D. Jest to substancja ważna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, jednak tylko niewielka jego część zaspokaja zapotrzebowanie. Nadmiar cholesterolu przyczynia się do rozwoju miażdżycy oraz tworzenia się kamieni żółciowych (złogów w drogach żółciowych zbudowanych głównie z cholesterolu); przyjmuje się, że podwyższony poziom cholesterolu całkowitego, a przede wszystkim frakcji LDL powoduje nie tylko miażdżycę, ale też zwiększa ryzyko wystąpienia innych chorób układu krążenia.

Podwyższony poziom cholesterolu w surowicy krwi (**hipercholesterolemia**) to jeden z podstawowych czynników ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego. Aby ocenić negatywny wpływ cholesterolu na zdrowie, należy wykonać oznaczenie cholesterolu z podziałem na poszczególne frakcje. Badanie – **lipidogram** obejmuje oznaczenie stężenia:

- cholesterolu całkowitego (TC)
- cholesterolu HDL
- cholesterolu LDL
- trójglicerydów

Obecnie na rynku dostępne są testy domowe do oznaczenia poziomu cholesterolu we krwi (Rys. 4).



Rys.4. Domowe testy do oznaczania cholesterolu

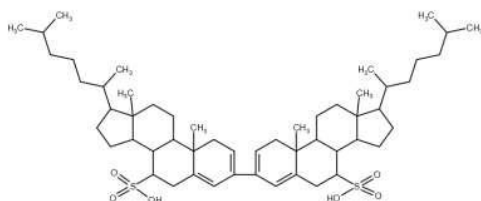
Większość **metody oznaczenia cholesterolu** opracowano pod kątem próbek biologicznych – krwi i jej surowicy, co wiąże się ze znaczenia parametru jakim jest poziomu cholesterolu we krwi pod kątem leczenia i profilaktyki. Wyróżniamy metody:

- **jakościowe** (umożliwiają identyfikację cholesterolu)
- **barwne**: podstawą jest charakterystyczna reakcja, w wyniku której powstaje barwny produkt
- **grawimetryczne**: związane z wytrącaniem osadu
- **ilościowe** (umożliwiają oznaczenie zawartości (stężenia) cholesterolu – metody instrumentalne)
- **spektrofotometryczne**, związane z pomiarem absorbancji przy określonej długości fali
- **chromatograficzne** (głównie), m.in. wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detekcją UV-Vis

Opracowane metody dotyczą oznaczeń zarówno cholesterolu całkowitego, jak i estrów cholesterolu lub wolnego cholesterolu.

Metody oznaczenia cholesterolu całkowitego:

1. **Reakcja/odczyn Salkowskiego**: pod wpływem stężonego kwasu siarkowego tworzą się intensywnie zabarwione produkty kondensacji, dehydratacji i sulfonowania cholesterolu; zmiana barwy jest spowodowana reakcją eliminacji dwóch cząsteczek wody w wyniku czego powstaje kwas disulfonowy bicholestadienu (Rys. 5) o **czerwonym** zabarwieniu ($\lambda_{\max}=610$ nm) (Rys. 6)

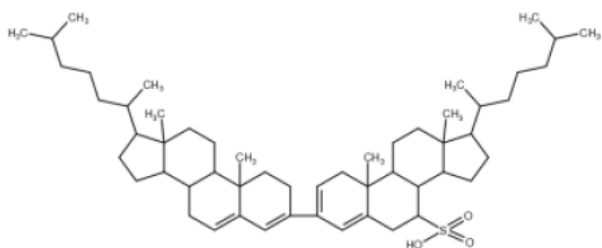


Rys. 5. Wzór strukturalny cząsteczki kwasu disulfonowego bicholestadienu.



Rys. 6. Odczyn Salkowskiego (reakcja chloroformowego ekstraktu cholesterolu (z żółtka jajka kurzego) ze stężonym H_2SO_4)

2. **Metoda Kingsleva-Schaffeta** (na podstawie barwnej reakcji/odczynu Liebermanna-Burcharda): pod wpływem mieszaniny stężonego kwasu i bezwodnika kwasu octowego, działającej odwadniająco na cholesterol, tworzy się kwas monosulfonowy bicholestadienu (Rys. 7) o **zielonym** zabarwieniu ($\lambda_{\max}=610$ nm) (Rys. 8) (początkowo pojawia się czerwone zabarwienie, które przechodzi w zielone)



Rys. 7. Wzór strukturalny cząsteczki kwasu monosulfonowego bicholestadienu



Rys. 8. Odczyn Liebermanna-Burcharda (reakcja chloroformowego ekstraktu cholesterolu (z żółtka jajka kurzego) z bezwodnikiem kwasu octowego i H_2SO_4)

3. **Metoda Pearsona, Steina i McGaracka:** w obecności kwasu p-toluenosulfonowego, bezwodnika kwasu octowego i kwasu siarkowego cholesterol daje **zielone** zabarwienie ($\lambda_{max}=550$ nm).
4. **Metoda Zlatkisa, Zaka i Boyle'a:** w obecności chlorku żelaza(III) cholesterol tworzy z kompleks o barwie **zielonej** ($\lambda_{max}=490$ nm) (według modyfikacji Searcy i Berquista reakcję przeprowadza się nie z $FeCl_3$ tylko $FeSO_4$).

Metody oznaczania estrów cholesterolu lub wolnego cholesterolu:

Metody te związane są z uprzednim:

- **rozdzieleniem estrów cholesterolu od cholesterolu wolnego za pomocą digitoniny:**

z uwagi na grupę $-OH$ przy C3 cholesterol może tworzyć nierozpuszczalny, dający się odwirować osad z digitoniną (saponina sterydowa); estry, z uwagi na brak wolnej grupy $-OH$, nie wchodzi w reakcję z digitoniną i pozostają w roztworze

- **rozdzieleniu cholesterolu wolnego i estrów cholesterolu na kolumnie z wypełnieniem Al_2O_3**

możliwość rozdzielania cholesterolu i jego estrów z uwagi na adsorpcję obu związków na kolumnie z tlenku glinowego oraz różnic w powinowactwie z kolumną, tj. estry – słabsza adsorpcja, mogą być wyeluowane w pierwszej kolejności za pomocą CCl_4 lub eteru naftowego; wolny cholesterol – silniejsze związanie z kolumną, elucja chloroformem lub benzenem

1. Metoda Kingsleya-Schaffeta:

analizy ilościowa:

pomiar abs. przy $\lambda=610$ nm

- *oznaczanie estrów cholesterolu poprzedzone wytrąceniem i oddzieleniem wolnego cholesterolu w reakcji z digitoniną;* barwę estrów wywołuje się analogicznie jak przy oznaczeniu cholesterolu całkowitego; różnica pomiędzy cholesterolem całkowitym a jego estrami oznacza ilość cholesterolu wolnego
- *oznaczanie cholesterolu wolnego i estrów cholesterolu po uprzednim rozdzieleniu na kolumnie z Al_2O_3 ;* barwę wywołuje się analogicznie jak przy oznaczeniu cholesterolu całkowitego; pomiar zawartości form cholesterolu oddzielnie w obu frakcjach

2. Metoda Zlatkisa i współpracowników:

analizy ilościowa:

pomiar abs. przy $\lambda=490$ nm

- *oznaczanie wolnego cholesterolu po uprzednim wytrąceniu digitoniną;* barwę wywołuje się analogicznie jak przy oznaczeniu cholesterolu całkowitego po uprzednim rozpuszczeniu osadu wolnego cholesterolu w odczynniku żelazowym; różnica między cholesterolem całkowitym a wolnym oznacza ilość cholesterolu zestryfikowanego
- *oznaczanie cholesterolu wolnego i estrów cholesterolu po uprzednim rozdzieleniu na kolumnie z Al_2O_3 ;* barwę wywołuje się analogicznie jak przy oznaczeniu cholesterolu całkowitego (z odczynnikiem żelazowym); pomiar zawartości form cholesterolu oddzielnie w obu frakcjach

Celem ćwiczenia jest spektrofotometryczne oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego w próbkach żywności **metodą Pearsona, Steina i McGaracka** stosując kalibrację metodą porównania z pojedynczym wzorcem.

Istnieje możliwość zbadania przyniesionych próbek żywności– patrz tabela 1 nt. zawartości cholesterolu w produktach spożywczych.

Odczynniki:

- bezwodnik kwasu octowego
- 12% kwas p-toluenosulfonowy w lodowatym kwasie octowym
- wzorzec cholesterolu 200 mg/100 cm³ lodowatego kwasu octowego
- stężony kwas siarkowy
- kwas octowy lodowaty
- alkohol etylowy

1. Wykonanie oznaczenia:

1.1. Przygotowanie badanej próbki

Badaną próbkę (0,5 g) rozpuścić bądź wyekstrahować etanolem (5,0 cm³). Roztwór przesączyć przez bibułę filtracyjną.

1.2. Przygotowanie roztworów do analizy

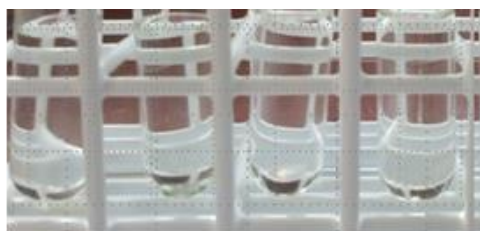
Przygotować cztery próbki i oznaczyć je jako:

- (1) ślepa próba,
- (2) wzorzec,
- (3) i (4) próbka (oznaczenie wykonać w dwóch powtórzeniach, n=2).

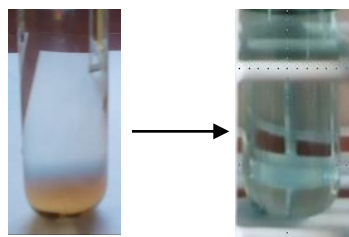
Do probówek odmierzyć następujące odczynniki:

próbka (próbówka) odczynnik	ślepa próba (1)	wzorzec (2)	próbka (3)	próbka (4)
H ₂ O	0,200 cm ³	0,200 cm ³		
CH ₃ COOH	0,200 cm ³	0,200 cm ³	0,200 cm ³	0,200 cm ³
wzorzec cholesterolu		0,200 cm ³		
ekstrakt			0,200 cm ³	0,200 cm ³
<u>efekt</u>				

Do wszystkich probówek dodać po 1 cm³ kwasu p-toluenosulfonowego i po 3 cm³ bezwodnika kwasu octowego (**UWAGA na reakcję egzotermiczną!**). Zawartość probówek delikatnie zamieszać, pozostawić do ochłodzenia do temperatury pokojowej.



Następnie do wszystkich probówek dodać (ostrożnie) 0,5 cm³ stężonego kwasu siarkowego. Zawartości probówek delikatnie zamieszać i odstawić na około 20 minut



1.3. Wykonanie oznaczeń spektrofotometrycznych

Zmierzyć absorbancję roztworów przy długości 550 nm względem ślepej próby. Wykorzystując metodę porównania z pojedynczym wzorcem obliczyć zawartość cholesterolu w analizowanej próbce. W obliczeniach przyjąć addytywność objętości. Wynik proszę podać w mg/100 g produktu i wyrazić jako wartość średnia wraz z wartością odchylenia standardowego. Policzyć precyzję oznaczenia (%RSD). Ocenąć krytycznie zastosowany w oznaczeniu sposób kalibracji.

Zagadnienia do kartkówki

- cholesterol: rola i źródła w ludzkiej diecie, rodzaje cholesterolu, budowa, reakcje chemiczne, metody oznaczenia
- tłuszcze: podział, budowa, reakcje
- sposoby kalibracji w metodach instrumentalnych

Literatura:

1. „Wybrane metody z chemii klinicznej” pod red. W. Ostrowskiego. Wyd. PZWL, Warszawa 1968.
2. „Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu” pod red. J. Gawęckiego i L. Hryniewieckiego. Wyd. PWN. Warszawa 2003.

Tabela 1. Orientacyjna zawartość cholesterolu w produktach spożywczych

Produkt spożywczy	mg/100g produktu	Produkt spożywczy	mg/100g produktu
Smalec	92	Mózg barani gotowany	2200
Łój wołowy	109	Nerki baranie	610
Bekon surowy	57	Nerki wieprzowe	700
Indyki surowe	81	Nerki wołowe	690
Indyki pieczone	100	Ozory wieprzowe gotowe do spożycia	101
Kurczaki	160	Ozory cielęce gotowe do spożycia	100
Kurczaki surowe	110	Ozory wołowe gotowe do spożycia	180
Kurczaki pieczone	120	Płuca surowe	>2000
Masło śmietankowe	220	Serca wołowe i cielęce gotowe do spożycia	150
Mięso baranie surowe	79	Serca wieprzowe gotowe do spożycia	150
Mięso baranie gotowane	110	Śmietana 12-procentowa	39
Mięso wieprzowe surowe	72	Śmietana 18-procentowa	56
Mięso wieprzowe gotowe do spożycia	110	Wątroba cielęca	370
Mięso wołowe surowe	65	Wątroba barania	430
Mięso wołowe gotowe do spożycia	82	Wątroba wieprzowa	290
Mięso cielęce gotowe do spożycia	71	Wątroba wołowa	270
Mięso zająca gotowe do spożycia	60	Szynka	33
Mleko 2%	8	Salami	79
Mleko pełnotłuste	13	Żółtko jaja (w 1 jajku około 300 mg)	1790