

Bestimmung von Cholesterin mittels Fotometrie

1. Aufgabe

- Erstellen sie mit Hilfe einer Cholesterin-Stammlösung eine Kalibrierkurve. Berechnen sie den Achsenabschnitt, die Steigung und das Bestimmtheitsmass (R^2).
- Bestimmen und berechnen sie den Gehalt an Cholesterin in der abgegebenen Butterfett-Probe (Dreifachbestimmung). Zudem werden die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient verlangt.
Einzel- und Mittelwerte werden ohne Kommastelle in mg/kg angeben.
- Ein sauberes und übersichtliches Protokoll wird verlangt. Zusätzlich ist die Kalibrierkurve auf Millimeterpapier aufzuzeichnen.

2. Prinzip

Nach Verseifung des Fettes in alkoholischer Kalilauge wird das Cholesterin mit n-Hexan extrahiert. Ein aliquoter Teil des Lösungsmittels wird abgedampft. Der Rückstand wird mit Phthaldialdehydlösung und konz. Schwefelsäure versetzt. Die Intensität des violetten Komplexes wird fotometrisch bei 550 nm gemessen.

3. Probe

- Butterfett liegt auf / KandidatIn

4. Reagenzien

- Cholesterinstandardlösung: 150 mg / L in Ethanol 96% liegt auf / KandidatIn
- Entmineralisiertes Wasser (im folgenden Wasser genannt) liegt auf / Labor
- Kaliumhydroxidlösung: 50 g KOH-Plättchen 85% / 100 mL in Wasser liegt auf / Labor
- Ethanol 96% liegt auf / Labor
- n-Hexan reinst liegt auf / Labor
- Schwefelsäure 95 - 97% (in Dispenser) liegt auf / Labor
- Phthaldialdehyd für die Fluoreszenzanalyse liegt auf / Labor
- Phthaldialdehydlösung:
25 mg Phthaldialdehyd / 50 mL in Essigsäure 100% herstellen / KandidatIn
⇒ diese Lösung ist täglich frisch herzustellen

5. Geräte / Hilfsmittel

- Fotometer inkl. 1 cm Halbmikroküvetten
- Analysenwaage
- verschiedene Voll- und Messpipetten
- Messkolben 50 mL
- Spitz- oder Rundkolben 25 bzw. 50 mL
- Reagenzgläser 50 mL mit Schraubverschluss
- Reagenzienmischer
- Rotavap 50 °C
- Wasserbad 60 °C
- Kunststoffpasteurpipetten

6. Sicherheit / Ökologie

Es sind die geeigneten Sicherheitsmassnahmen zu treffen.

7. Ausführung

7.1 Herstellung der Probelösungen

- Die Butterfett-Probe wird mit heissem Leitungswasser flüssig gemacht.
- 40 ± 10 mg flüssige Butterfett-Probe werden auf 0.1 mg genau in ein 50 mL Reagenzglas eingewogen.
- 3 mL Ethanol 96% werden zugegeben.

7.2 Herstellung der Kalibrierlösungen

- Es werden drei Kalibrierlösungen aus der Cholesterinstandardlösung durch geeignetes Verdünnen mit Ethanol 96% in 50 mL Messkolben hergestellt.
Bereich: 15 - 60 mg/L Cholesterin.
- Je 3.0 mL werden in ein 50 mL Reagenzglas pipettiert.

7.3 Verseifung, Extraktion und Farbreaktion

- Zu den unter 7.1 bzw. 7.2 hergestellten Lösungen werden 2 mL Kaliumhydroxidlösung zugegeben. Die Reagenzgläser werden verschlossen. Auf dem Reagenzienmischer wird gut gemischt. Die Reagenzgläser werden für 15 min. im Wasserbad bei 60 °C gehalten.
- Nach dem Abkühlen werden 10.0 mL n-Hexan zugegeben und gut gemixt. 3 mL Wasser werden zu pipettiert und erneut wird gut gemixt. 5.0 mL der n-Hexanphase werden in einen Spitz- oder Rundkolben pipettiert und am Rotavap bei 50 °C zur Trockne eingedampft.
- Der Rückstand wird in 4.0 mL Phthaldialdehydlösung aufgenommen und gelöst. Nach 10 min. werden sorgfältig 2.0 mL Schwefelsäure 95 - 97% (mit Dispenser) zugegeben, starke exotherme Reaktion. Durch vorsichtiges Umschwenken wird gemischt, nicht schütteln (\Rightarrow vermeiden von Luftblasen).
- Innerhalb von 10 – 90 min. wird die Extinktion bei 550 nm gegen einen Reagenzienblindwert (Phthaldialdehydlösung und Schwefelsäure) gemessen.
 \Rightarrow Um Luftblasen zu vermeiden werden die Lösungen langsam mit Kunststoffpasteurpipetten in die Halbmikroküvetten überführt.
Hinweis: Bei der Verwendung von Glaspasteurpipetten können Luftblasen entstehen.

8. Entsorgung

Die Probe- sowie Kalibrierlösungen sind in die dafür vorgesehenen Behältnisse zu entsorgen.

Bestimmung von Cholesterin mittels Fotometrie (Expertenblatt)

Bewertungskriterien

Nicht erfüllte Punkte hervorheben oder spezielle Beobachtungen unter Bemerkung festhalten. Die Bewertung und Notengebung muss in jedem Falle nachvollziehbar (Notizen) sein.

Kriterium	Note	Bemerkungen
Aufarbeitung / Verseifung	6	<ul style="list-style-type: none"> • Probe verflüssigt (heisses Leitungswasser) • Sauberes Einwiegen, keine Fettspuren oben an der RG Wand • 15 min. im Wasserbad (+/- 2 min.)
	5	Ein Punkt von 6 nicht erfüllt
	4	Zwei Punkte von 6 nicht erfüllt
	3	Mehr als zwei Punkte von 6 nicht erfüllt.
	2 / 1	Arbeitsweise unbrauchbar / Nicht durchgeführt
Kalibration	6	<ul style="list-style-type: none"> • Korrektes Einstellen zur Marke beim Pipettieren • Pipetten werden mit Tela abgestreift • Korrektes Einstellen zur Marke bei Messkolben
	5	Ein Punkt von 6 nicht erfüllt
	4	Zwei Punkte von 6 nicht erfüllt
	3	Mehr als zwei Punkte von 6 nicht erfüllt.
	2 / 1	Arbeitsweise unbrauchbar / Nicht durchgeführt
Extraktion / Farbreaktion	6	<ul style="list-style-type: none"> • Korrekte Entnahme von 5 mL Hexan • Vorsichtige Zugabe der Schwefelsäure, durch Umschwenken mischen
	4	Ein Punkt von 6 nicht erfüllt
	3	Zwei Punkte von 6 nicht erfüllt
	2 / 1	Arbeitsweise unbrauchbar / Nicht durchgeführt
Messung	6	<ul style="list-style-type: none"> • bei Absorptionsmaximum gemessen (550 nm) • Küvetten sauber (keine Blasen, Fingerabdrücke) • Jede Lösung mindestens 2x messen
	5	Ein Punkt von 6 nicht erfüllt
	4	Zwei Punkte von 6 nicht erfüllt
	3	Mehr als zwei Punkte von 6 nicht erfüllt.
	2 / 1	Arbeitsweise unbrauchbar / Nicht durchgeführt
Sicherheit & Methodik	6	<ul style="list-style-type: none"> • Einhaltung von Sicherheitsvorschriften, inkl. Verwendung PSA (Brille, Schurz, ev. Handschuhe) • Ordnung & Sauberkeit, inkl. korrekte Beschriftung • Arbeitsdisposition, Absprache sowie Koordination • laufende Protokollierung (keine Notizzettel)
	5	Ein Punkt von 6 nicht erfüllt
	4	Zwei Punkte von 6 nicht erfüllt
	3	Mehr als zwei Punkte von 6 nicht erfüllt oder Nichteinhaltung von Sicherheitsvorschriften
	2 / 1	Arbeitsweise unbrauchbar / Nicht durchgeführt
	2 / 1	Arbeitsweise unbrauchbar / Nicht durchgeführt
Material- nachbezug	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Der Notenabzug erfolgt erst durch das für die Aufgabe zuständige Expertenteam

Gesamteindruck / Notizen	

Notengewichtung

Arbeitstechnik	: 30 %
Resultat	: 50 %
Protokoll	: 20 %

Weitere Informationen

- Wird handelsübliche Butter verwendet, muss diese bei ca. 60 °C durch ein hydrophobes Filter filtriert werden
- Kalibrierlösungen: ideale Volumen 5, 10 (oder 15), 20 mL der Stammlösung
- Es kann immer die gleiche Küvette verwendet werden, oder immer eine neue Küvette

Materialliste

Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Materialien für 20 Kandidatinnen und Kandidaten.

Beschreibung	Menge	Bemerkung
Halbmikroküvetten 1 cm, Kunststoff	mind. 280	
Messkolben 50 mL	60	je 3
Stabpipette 10 mL	40	je 2
Vollpipette 3 mL	60	je 3
Vollpipette 5 mL	140	je 7
Vollpipette 10 mL	40	je 2
Vollpipette 15 mL	20	je 1
Vollpipette 20 mL	20	je 1
Vollpipette 4 mL	20	je 1
Reagenzgläser mit Schraubverschluss 50 mL	120	je 6
Spitz- oder Rundkolben 25 mL oder 50 mL	120	
Wasserbäder		
Reagenzienmixer		
Rotavap		
Cholesterin-Standardlösung 0.15 mg/mL	2 L	50 mL pro Kandidat
Kaliumhydroxidlösung (50 g KOH-Plätzchen 85% / 100 mL in Wasser)	4 x 100 mL	
Ethanol 96%	5 x 1 L	
n-Hexan reinst	2 x 1 L	
Essigsäure 100%	2 x 1 L	
Schwefelsäure 95 - 97%	1 x 1 L	
Phthaldialdehyd	2 x 5 g	
Flasche mit Dispenser 2 mL	2 x 500 mL	