CH 12.23.
Stanovenie sterolov metódou GC/FID

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa saponifikuje hydroxidom draselným v metanole a nezmydliteľná časť sa extrahuje dietyléterom. Steroly sa transformujú na trimetyl-silylové étery a analyzujú sa metódou GC/FID s použitím vnútorného štandardu betulínu.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie sterolov – sitosterolu (predstavuje súčet β-sitosterolu a 22 dihydro-β-sitosterolu), stigmasterolu v masle a v mliečnych výrobkoch a cholesterolu v olejoch a tukoch.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Redestilovaná voda
3.1.2 Síran sodný –Na_2SO_4 bezvodý, p.a
3.1.3 Metanol gradient grade p.a.
3.1.4 Hydroxid draselný p.a.
3.1.5 Dietyléter p.a.
3.1.6 Betulín, min 98%
3.1.7 Sitosterol, min 95%
3.1.8 Stigmasterol, min 95%
3.1.9 TRI-SIL
3.2.0 Cholesterol

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 60% roztok KOH v metanole

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok vnútorného štandardu betulín (1000mg/l v dietyléteri) - **RB**
Navážiť 10mg štandardu betulín do 10ml odmernej banky a doplniť po rysku dietyléterom. Uchovávať ho v chladničke.

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu stigmasterol (1000mg/l v dietyléteri) - **ST**
Navážiť 10mg štandardu stigmasterol do 10ml odmernej banky a doplniť po rysku dietyléterom. Uchovávať ho v chladničke.

3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu sitosterol (1000mg/l v dietyléteri) - **SI**
Navážiť 5mg štandardu sitosterol do 5ml odmernej banky a doplniť dietyléterom. Uchovávať ho v chladničke.

3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu cholesterol (1000mg/l v dietyléteri) – **CH**
Navážiť 10mg štandardu stigmasterol do 10ml odmernej banky a doplniť po rysku dietyléterom. Uchovávať ho v chladničke.

3.3.2 Pracovný roztok štandardu sterolov

Zo zásobných roztokov štandardov **RB, ST, SI, CH** pripraviť pracovný roztok sterolov podľa tabuľky 1.1, odfúkať N_2 do sucha. Potom pokračovať podľa procedúry 5.3.1.3.

Tabuľka 1.1 Pracovný roztok štandardu sterolov

Koncentrácia stigmasterolu (mg/l)	Prídavok roztoku ST (µl)	Koncentrácia sitosterolu (mg/l)	Prídavok roztoku SI (µl)	Koncentrácia cholesterolu (mg/l)	Prídavok roztoku CH (µl)	Koncentrácia betulínu (mg/l)	Prídavok roztoku RB (µl)
200	200	500	500	200	200	400	400

3.3.3 Kalibračné roztoky štandardov sterolov

Zo zásobných roztokov štandardov **RB, ST, SI, CH** pripraviť kalibračné roztoky podľa tabuľky 1.2.

Tabuľka 1.2 Kalibračné roztoky štandardov

Koncentrácia stigmasterolu (mg/l)	Prídavok roztoku ST (µl)	Koncentrácia sitosterolu (mg/l)	Prídavok roztoku SI (µl)	Koncentrácia cholesterolu (mg/l)	Prídavok roztoku CH (µl)	Koncentrácia betulínu (mg/l)	Prídavok roztoku RB (µl)
0	0	0	0	0	0	400	400
100	100	250	250	100	100	400	400
200	200	500	500	200	200	400	400
300	300	750	750	300	300	400	400
400	400	1000	1000	400	400	400	400

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 analytické váhy
4.2 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.3 plynový chromatograf SHIMADZU GC-17A s FID detektorom

4.4 chromatografická kapilárna kolóna DB5-MS –0,25µm, 30m x 0,25mm
4.5 laboratórne sklo
4.6 vodík 5.0
4.7 hélium 6.0
4.8 dusík 3.0

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorku masla roztopiť pri teplote 35°C a dôkladne premiešať.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Vzorky sa fortifikujú na úrovni MRL.
Pripraviť vzorku podľa procedúry 5.3.1.1, potom pridať roztoky štandardov podľa tabuľky 1.3 a pokračovať podľa procedúry 5.3.1.2.

Tabuľka 1.3 Príprava fortifikovaných vzoriek potravín

Koncentrácia stigmasterolu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku ST (µl)	Koncentrácia Sitosterolu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku SI (µl)	Koncentrácia cholesterolu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku CH (µl)	Koncentrácia vnútorného štandardu betulínu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku RB (µl)
0	0	0	0	0	0	400	400
200	200	500	500	300	300	400	400

5.3 Príprava vzorky k analýze

5.3.1 Potraviny

5.3.1.1 Do varnej banky s okrúhlym dnom navážiť 5 g vzorky s presnosťou 0,1mg. Pridať 20ml metanolu a 20ml roztoku 60% KOH v metanole (3.2.1). Pripevniť na kondenzátor so spätným tokom a nechať kondenzovať pri teplote 75°C po dobu 15 minút. Varnú banku nechať ochladiť na izbovú teplotu.

5.3.1.2 Obsah banky preliať do 500ml deliaceho lievika, banku premyť 50ml destilovanej vody a 50ml dietyléteru. Dôkladne pretrepávať po dobu 5 minút, aby sa odseparovali vrstvy. Spodnú vrstvu zliať a vrchnú éterovú vrstvu pretrepávať 2x po sebe so 100ml destilovanej vody.
Čistú éterovú vrstvu preliať cez kolónu, ktorá obsahuje 25g anhydrického síranu sodného. Éter zachytávať do 150ml banky. Potom obsah banky odpariť na RVO.

5.3.1.3 Pridať 2 ml dietyléteru a éter odstrániť prúdom dusíka. Potom pridať 1 ml silanizačného činidla TRI-SIL, silne pretrepať a obsah rozpustiť.

5.4 Chromatografická analýza

GC podmienky:
Plynový chromatograf SHIMADZU GC-17A s FID detektorom uvedieme do chodu podľa návodu na obsluhu.
chromatografická kapilárna kolóna: DB5-MS –0,25µm, 30m x 0,25mm
Tlaky plynov: vodík – 50kPa
hélium – 50kPa
vzduch – 50kPa
Teplota detektora - 260°C

Teplota injektora - 260°C
Teplota kolóny - 280°C
Teplotný program kolóny: 18 min pri 280°C
Nástrek – 1 µl

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.

C sample concentration (mg/kg)

$$C = [c_1] \cdot \frac{sample\,area \cdot SI\ Sd\,[c_1]\ area}{SI\ sample\,area \cdot Sd\,[c_1]\ area}$$

7 ZOZNAM SKRATIEK

GC – plynová chromatografia
FID – plameňovoionizačný detektor
RVO – vákuová rotačná odparka
CFLV – prietok nosného plynu kolónou v ml/min
VEL – priemerná lineárna rýchlosť nosného plynu kolónou v cm/s
SPL-R – splitovací pomer
FID-R – nastavenie rozsahu lineárneho rozšírenia
LOD – limit detekcie
LOQ – limit kvantifikácie

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

8.1 Commission Regulation (EEC) No 3942/92 of 22 December 1992 establishing a reference method for the determination of sitosterol and stigmasterol in butteroil

8.2 Nariadenie Komisie (ES) č.213/2001 z 9. januára 2001, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá pre aplikáciu nariadenia Rady (ES) č.1255/1999 týkajúce sa metód analýzy a hodnotenia kvality mlieka a mliečnych výrobkov a ktorým sa menia a dopĺňajú nariadenia (ES) č.2771/1999 a (ES) č. 2799/1999 – Príloha XIV – Stanovenie obsahu sitosterolu alebo stigmasterolu v masle alebo koncentrovanom masle kapilárnou plynovou chromatografiou

CH 12.23.

Stanovenie sterolov v masle, mliečnych výrobkoch a tukoch metódou GC-FID

1. URČENIE METÓDY

Metóda popisuje proces kvantitatívneho stanovenia sterolov v masle. Je tiež vhodná pre stanovenie sterolov v masle, mliečnych produktoch (extrakcia podľa Röse-Gottlieba) a v tukoch (extrakcia podľa Weibulla, ŠPP FCH 3/2).

2. PRINCÍP METÓDY

Tuk zo syrov, zmrzlín, mliečnych produktov sa extrahuje Röse-Gottliebovou metódou podľa ŠPP NRLM 13, z ostatných požívatín metódou podľa Weibulla – ŠPP Tuk je saponifikovaný hydroxidom draselným v etanolickom roztoku a nesaponifikovateľné zložky sú extrahované dietyléterom. Steroly sú transformované na trimetylsilylétery a sú analyzované kapilárnou plynovou chromatografiou s použitím interného štandardu (betulín).

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- 150 ml saponifikačná fľaša zakončená refluxným kondenzátorom so sklenenými zábrusmi
- 250 ml deliace lieviky
- rotačná vákuová odparka
- vodný kúpeľ
- plynový chromatograf vhodný na použitie kapilárnych kolón, opatrený deliacim split systémom
- kapilárna kolóna DB – 17, dĺžky 30m, vnútorného priemeru 0,25 mm a potiahnutá filmom o hrúbke 0,15 µm.

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky chemikálie musia byť známej analytickej čistoty. Použitá voda musí byť destilovaná alebo aspoň ekvivalentnej čistoty.

3.2.1. Etanol, minimálne 95 % -nej čistoty
3.2.2. Hydroxid draselný, 60 %-ný vodný roztok
3.2.3. Betulín, 98 %-nej čistoty – vnútorný štandard
3.2.3.1. Roztok betulínu v dietyléteri, koncentrácia 1,0mg/ml, pripraví sa vždy čerstvý.
3.2.4. Lanosterol
3.2.5. Sitosterol, známej čistoty nie menšej ako 90%
3.2.5.1. Štandardný roztok sitosterolu - pripraví sa vždy čerstvý roztok o koncentrácii 0,5 mg/ml v dietyléteri
3.2.6. Stigmasterol, známej čistoty, nie menšej ako 90 %
3.2.6.1. Štandardný roztok stigmasterolu – pripraví sa vždy čerstvý roztok o koncentrácii 0,2 mg/ml v diethyléteri
3.2.7. Rozhodčia testovacia zmes. Pripraví sa roztok obsahujúci 0,05 mg/ml lanosterolu a 0,5 mg/ml sitosterolu v dietyléteri.
3.2.8. Cholesterol, 99 % čistoty

3.2.8.1. Štandardný roztok cholesterolu - pripraví sa vždy čerstvý roztok o koncentrácii 1,0 mg/ml v dietyléteri
3.2.9. Dietyléter, analytickej čistoty (bez peroxidov alebo rezíduí)
3.2.10. Síran sodný, bezvodý, predsušený 2 hodiny pri 102 ºC .
3.2.11. Silylačné činidlo, Tri-Sil (Pierce Chemical Co) alebo jeho ekvivalent. Pracuje sa s ním zásadne v digestore! (**Tri-Sil je nehorľavý, jedovatý, korozívny a potenciálne karcinogénny!)**

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Nakoľko pri práci sa používajú horľaviny, jedy a karcinogénne látky, je potrebné prísne dodržiavať Zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORIEK

Príprava nezmydelnených zložiek
Naváži sa 0,5 g homogenizovanej vzorky do 150 ml saponifikačnej fľaše. Pridá sa 25 ml etanolu a 5 ml roztoku 60 % hydroxidu draselného. Uzatvorí sa refluxný chladič a varí sa vo vodnom kúpeli približne 60 minút. Chladič sa odpojí a saponifikačná fľaša sa nechá vychladnúť na laboratórnu teplotu.

Do fľaše sa pridá 1 ml interného štandardného roztoku betulínu o koncentrácii 1mg/ml. Dôkladne sa premieša. Obsahy fľašiek sa kvantitatívne prenesú do 250 ml deliacich lievikov pomocou 25 ml vody a 2 x 65 ml dietyléteru, ktorými sa fľaša opláchne. Deliaci lievik sa intenzívne pretrepáva 2 minúty a nechajú sa oddeliť fázy približne 1 hodinu. Vypustí sa spodná vodná vrstva a éterová vrstva sa prepláchne postupne 4 krát trepaním s 50 ml vody .

1. premytie: 10 jemných inverzií, oddeliť fázy
2. premytie: 10 jemných inverzií, oddeliť fázy
3. premytie: 10 inverzií + 5 sekundové trepanie, oddeliť fázy
4. premytie: intenzívne trepanie 30 sekúnd, oddeliť fázy

Po každom premytí sa vypustí vodná vrstva. Ak sa vytvorí emulzia, odstráni sa pridaním 5 – 10 ml etanolu a prípadnými ďalšími dvoma premytiami vodou.
Čistá éterová vrstva zbavená mydiel sa prenesie do banky, obsahujúcej minimálne 30 g bezvodého síranu sodného, premieša sa a nechá sa 30 až 60 minút stáť. Prefiltruje sa cez filtračný papier do zábrusovej fľaše rotačnej vákuovej odparky. Pridá sa sklená gulička a éter sa odparí na rotačnej vákuovej odparke skoro do sucha.

Príprava trimetylsilyléterov
Roztok éteru sa prenesie z fľaše do 2 ml derivatizačných vialiek pomocou 2 ml dietyléteru , ten sa odparí pod prúdom dusíka. Fľaša sa premyje ďalšími 2 dávkami dietyléteru, ktorý sa zakaždým odparí dusíkom.
Vzorka sa silyluje pridaním 1 ml TRI-SIL reagentu. Vialka sa uzatvorí a intenzívne premieša, aby sa obsah rozpustil. Ak sa nerozpustí, vzorka sa zahrieva pri 65 až 70 ºC. Nechá sa stáť najmenej 5 minút pred injektovaním do plynového chromatografu. Štandardy sa silylujú v tom istom čase, tým istým spôsobom ako vzorky.

Prítomnosť etanolu v silylačnom stupni bude interferovať so silyláciou. Toto môže byť výsledkom nedostatočného premytia v extrakčnom stupni. Ak tento problém pretrváva, môže sa zaviesť piate premývanie v extrakčnej fáze, intenzívnym trepaním po dobu 30 sekúnd.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

Príprava štandardných roztokov pre chromatografiu.

Štandardný roztok cholesterolu: 1 ml štandardného roztoku cholesterolu o koncentrácii 1,0 mg/ml sa prenesie do každej z dvoch reakčných nádobiek a dietyléter sa odparí prúdom dusíka. Pridá sa 1 ml interného štandardného roztoku betulínu o koncentrácii 1,0 mg/ml a dietyléter sa odparí prúdom dusíka.

Štandardný chromatografický roztok sitosterolu: 1 ml štandardného roztoku sitosterolu o konc. 0,5 mg/ml sa prenesie do každej z dvoch reakčných nádobiek a dietyléter sa odparí prúdom dusíka. Pridá sa 1 ml interného štandardného roztoku betulínu o konc.1,0 mg/ml a dietyléter sa odparí prúdom dusíka.

Štandardný chromatografický roztok stigmasterolu: 1 ml štandardného roztoku stigmasterolu o koncentrácii 0,2 mg/ml sa prenesie do každej z dvoch reakčných nádobiek a dietyléter sa odparí prúdom dusíka.
V prípade potreby sa obdobne pripraví zmesný štandardný roztok vyššie uvedených sterolov.

Podmienky merania:

- teplota kolóny: 265 ºC
- teplota injektora: 265 ºC
- teplota detektora: 300 ºC
- prietok nosného plynu: 1,0 ml/min
- tlak vodíka: 84 kPa
- delenie vzorky: 50:1
- množstvo nastrekovanej látky: 1 µl

Pred zahájením analýz sa systém nechá ekvilibrovať.

5.3. MERANIE

Nastrekne sa 1 µl silylovaného štandardného roztoku príslušného sterolu a nastavia sa integračné kalibračné parametre.
Nastrekne sa ďalší 1 µl silylovaného štandardného roztoku na stanovenie responzných faktorov v pomere k betulínu.
Nastrekne sa 1 µl silylovaného roztoku vzorky a merajú sa plochy píkov. Každá chromatografická séria musí byť ohraničená nástrekom štandardov.
Odporúča sa maximálne 6 nástrekov vzoriek ohraničiť štandardmi.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Integrácia píku stigmasterolu by mala zahŕňať všetky „chvosty píku“. Pri posudzovaní celkového zastúpeného sitosterolu by integrácia mala zahŕňať plochu píku 22 dihydro-beta-sitosterolu (stigmastanol), ktorý sa eluuje ihneď po sitosterole.
Stanoví sa plocha sterolových píkov a píkov betulínu v oboch štandardoch ohraničujúcich sériu a vypočíta sa responzný faktor R_1:

$$R_1 = \frac{\text{Priemerná plocha sterolového píku v štandarde}}{\text{Priemerná plocha betulínového píku v štandarde}}$$

Stanoví sa plocha sterolového a betulínového píku vo vzorke a vypočíta sa responzný faktor R_2:

$$R_2 = \frac{\text{plocha sterolového píku vo vzorke}}{\text{plocha betulínového píku vo vzorke}}$$

$$\text{Množstvo sterolu v mg/kg} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10$$

W_1 = množstvo sterolu v mg v 1 ml štandardného roztoku
W_2 = hmotnosť vzorky v g
P = čistota štandardu sterolu v %

V prípade extraktov tukov sa konečný výsledok prepočíta cez obsah tuku vo vzorke.

7. LITERATÚRA

7.1. Nariadenie komisie (ES) č. 273/2008, Príloha VIII (Článok 5), Stanovenie sitosterolu alebo stigmasterolu v masle alebo koncentrovanom masle kapilárnou plynovou chromatografiou

7.2. Ing. Ondrej Hegedűs, CSc., Validácia skúšobného postupu v praxi chemického laboratória, Zborník prednášok z XXI. Zhromaždenia KZ SR, Košice, 2004.