



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Stanovení celkového cholesterolu v mléce metodou HPLC

1. Princip

Po alkalické hydrolýze (saponifikaci, zmýdelnění) vzorku methanolickým roztokem hydroxidu draselného je cholesterol z reakční směsi extrahován do n-hexanu, extrakt promyt vodou do neutrální reakce. Finální stanovení celkového cholesterolu je provedeno kapalinovou chromatografií na reversní fázi.

2. Rozsah použití

Metoda slouží ke stanovení celkového cholesterolu v matrici živočišného původu; mléku, tuku, masu, vaječném žloutku.

3. Bezpečnostní opatření

Při přípravě roztoku KOH pracujeme v digestoři, směs chladíme ve vodní lázni
Alkalickou hydrolýzu provádíme v digestoři
Při práci s rotační vakuovou odparkou pracujeme s ochrannými brýlemi

4. Materiál

Chemikálie

KOH, p.a.

10 mol.l⁻¹ roztok KOH, připravíme rozpuštěním 56,1 g KOH ve 100 ml vody

methanol, p.a.

methanol pro HPLC

n-hexan, min. čistoty p.a.

síran sodný, bezvodý, vyžíhaný

ethanol, 96%.

fenolftalein, 1% roztok v 96% ethanolu

DIO voda

SRM Whole Egg Powder (NIST, USA)

Laboratorní sklo

baňky 50 ml s plochým dnem a zábrusem, skleněné zátky se zábrusem, zpětný chladič,

odměrný válec 10 ml, separační nástavec, dělicí nálevky 100.ml,

zkumavky, se zábrusem a zátkou

vialky pro HPLC

Pomůcky

membránové filtry nylonová, 45um, injekční stříkačky 2 – 5 ml, automatické pipety

varná deska, laboratorní třepačka, předvážky, analytické váhy, rotační vakuová odparka



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

5. Pracovní postup

5.1 Příprava vzorku

- Do zábrusové baňky 50 ml dáme 1 g vzorku mléka
- 0,3 ml roztoku vnitřního standardu stigmasterolu (0,1%),
- 9 ml methanolu a 1 ml 10M hydroxidu draselného.
- Zahříváme za stálého míchání při teplotě 65 °C pod zpětným chladičem po dobu 30 minut
- Po ochlazení sejmemme baňku z chladiče, přidáme 5 ml deionizované vody a 10 ml n-hexanu.
- Baňku opatříme zátkou, a na laboratorní třepačce intenzivně třepeme 10 minut.
- Pomocí separačního nástavce odebereme hexanový podíl do dělicí nálevky, ve které je asi 10 ml deionizované vody s kapkou roztoku fenolftaleinu pro kontrolu pH.
- Obsah dělicí nálevky protřepeme, po oddělení vrstev odpustíme spodní vodnou vrstvu a hexanový roztok v dělicí baňce opakovaně promyjeme 5 ml vody do neutrální reakce (asi 2x, zmizí fialové zbarvení fenolftaleinu).
- Hexanový podíl vysušíme vyžíhaným bezvodým síranem sodným, přemístíme do zkumavky se zábrusem, přidáme asi 0,5 g síranu, zazátkujeme a necháme 15 minut stát v chladnu a temnu.
- Odebereme hexanový podíl, (asi 5 – 8 ml, podle povahy extraktu) do 50 ml zábrusové baňky a na rotační vakuové odparce odpaříme právě dosucha. Teplota lázně je 60 °C, tlak 360 bar.
- K odparku v baňce přidáme 2 ml methanolu, rozpustíme, zfiltrujeme přes 0,45 µm nylonový filtr do vialky pro HPLC stanovení.

5.2 Podmínky HPLC stanovení

- kapalinový chromatograf, skládající se z čerpadla, zásobníku mobilních fází, UV detektoru nebo detektoru s diodovým polem, autosampleru, kolonového termostatu.
- chromatografická kolon s reverzní fází C8, např. Zorbax Eclipse XDB C8 150x4,6 mm o velikosti částic 5µm (Agilent, USA).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



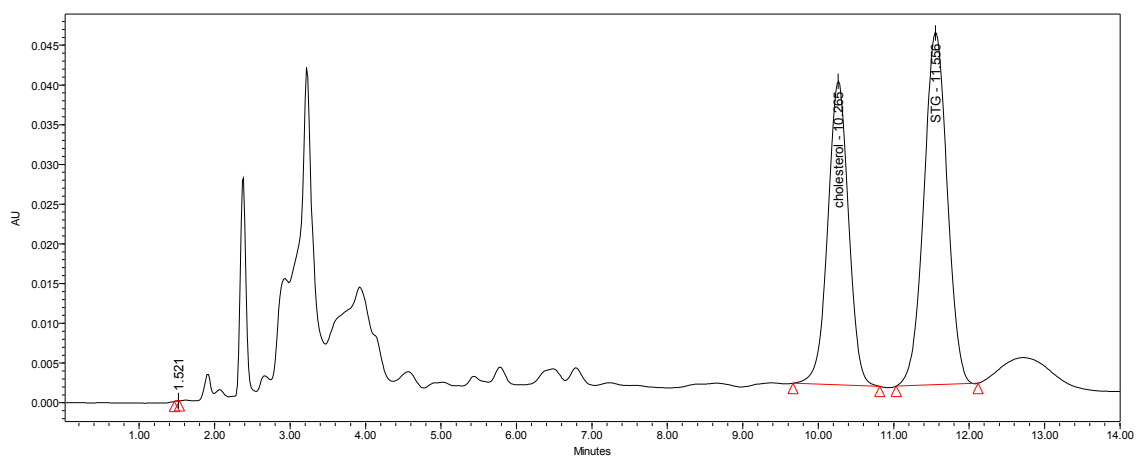
FACULTAS VETERINARIA ET PHARMACEUTICA
BRUNENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- detekce při vlnové délce 205 nm, teplota kolony je 35 °C, velikost nástřiku 20 μ l.
- mobilní fáze je binární směs voda/methanol 5:95, analýza se provádí v izokratickém uspořádání.
- sběr a vyhodnocování dat je provedeno systémem Empower 2 nebo Breeze (Waters).
- pro kvantifikaci bylo použijeme metodu vnitřního standardu.

6. Vyhodnocení výsledků

Analýzou roztoků cholesterolu o koncentracích v rozmezí 1 – 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vytvoříme kalibrační přímku v příslušné procesní metodě, ze které pak stanovíme koncentraci cholesterolu v analyzovaném vzorku ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), kterou pak převedeme na hmotnostní koncentraci.



Chromatogram vzorku kravského mléka s přidávkem vnitřního standardu stigmasterolu .

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

7. Schema pracovního postupu

