



Sterol Analizi

Prof. Dr. Aziz TEKİN
Dr. Öğr. Üyesi Cansu Ekin GÜMÜŞ
Arş. Gör. Merve Silanur YILMAZ

Genel Bilgi

- Steroller steroid alkoller olarak da tarif edilirler.
- Sabunlaşmayan alkollerdir.
- Steroller, steroid iskeletine bağılı olarak 8-10 karbonlu bir yan zincir ve bir alkol grubu içeren bileşiklerdir.
- Hem hayvansal katı yağlarda hem de bitkisel sıvı yağlarda bulunmaktadırlar. Ancak aralarında önemli biyolojik farklar vardır.
- Hayvansal sterollere örnek kolesterol, bitkisel sterollere örnek sitosterol ve stigma sterol verilebilir.
- Sterol tayini zeytinyağının saflığını belirlenmesinde ve tağışın saptanmasında en önemli yöntemdir. Zeytinyağına başka bitkisel yağların karışıp karışmadığının belirlenmesi için toplam sterol miktarı ve sterol kompozisyonu belirlenmelidir. Zeytinyağına çok düşük oranlarda bitkisel yağ ve prina yağ katılsa bile sterol analiziyle bu durum tespit edilebilmektedir.

ilke

- İnternal standart olarak kolesterol eklenen yağ, etanollü potasyum hidroksitle sabunlaştırılır, sabunlaşmayan madde dietil eterle ekstrakte edilir. Steroller sabunlaşmayan maddeden ince tabaka kromatografiyle ayrılıp, trimetilsilil esterlerine dönüştürülüp, gaz kromatografide analiz edilir.

Kimyasallar

- İnternal standart (kolesterol), 2N etanollü KOH (130 g KOH 200 mL'lik destile suda çözülür, soğuduktan sonra etanolle 1L'ye tamamlanır), Dietil eter, Etanol, Sodyum sülfat anhidrat, 0.2 N etanollü KOH (13g KOH 20 mL'lik destile suda çözülür, etanolle 1L'ye tamamlanır), Hekzan, Aseton, Kloroform, 2,7-dichlorofluoresceinin %0.2'lik etanollü çözeltisi, Piridin, BSTFA (bistrimethylsilyl trifluor acetamide+%1 trimethyl chlorosilane), Referans çözelti; β -sitosterolün kloroformdaki % 5'lik çözeltisi

Gereçler

- 500 ml'lik cam balon, Geri soğutucu, Isıtıcı, Ayırma hunisi, Erlen (250 mL), Turnusol kağıdı, Cam balon (250 mL), Mikroşırınga, Spatül, UV lamba, Nüçe erleni, Filtre, Whatson filtre kağıdı, 50 mL'lik rotary balonu, Filtre kağıdı, Vial, Vakum pompası, İnce tabaka plakaları (20×20 cm) (0.25 mm silika jelle kaplanmış plakalar, 0.2 N etanollu KOH çözeltisine daldırılıp 10 sn bekletilir, çeker ocakta 2 saat bekletildikten sonra, 100°C'lik etüvde 1 saat kurutulur)

İşlem

1. aşama: Sabunlaşmayan maddenin ayrılması

Vakum pompasına bağlı nüçe erlenine filtre takılır, yağ örneği (içindeki nemi uzaklaştırmak amacıyla) susuz sodyum sülfattan geçirilir



Fitre edilmiş yaklaşık 5 g örnek, 500 mL'lik balona alınır



50 mL etanollü KOH ilave edilir



4.5-5 mg kolesterol ilave edilir



Geri soğutucuya takılarak sabunlaşma gerçekleşinceye kadar (çözelti berraklaşır) beklenir

Sabunlaşma 20 dk daha sürdürülür



Geri soğutucuya 50 mL su verilerek, balon soğutucudan çıkarılır.



Balon 30 °C'ye soğutulur.



Balonun içeriği 500 mL'lik ayırma hunisine alınır



Balon birkaç defa destile suyla çalkalanır, su ayırma hunisine ilave edilir



Ayırma hunisine 80 mL dietil eter eklenir, hafifçe çalkalanır, ayırma beklenir



Alt faz ikinci bir ayırma hunisine alınır, 60-70 mL dietil eter eklenir, tekrar çalkalanır, ayırma beklenir

Alt faz üçüncü bir ayırma hunisine alınır, 60-70 mL dietil eter eklenir, tekrar çalkalanır, ayırma beklenir



Alt faz uzaklaştırılır, üst faz olarak ayrılan sabunlaşmayan maddeler tek bir ayırma hunisinde toplanır



Sabunlaşmayan madde destile suyla nötr reaksiyon verene kadar yıkanır



Yıkama suyu uzaklaştığında sabunlaşmayan madde bir erlene alınır, ayırma hunisi birkaç kere eterle çalkalanır ve erlene eklenir



Erlene sodyum sülfat eklenir



Sodyum sülfat bir filtre kağıdıyla filtre edilir, sabunlaşmayan madde darası alınmış 250 mL'lik balona alınır



Örnekteki dietil eter rotary evaporatörde uçurular, örnek azottan geçirilir.



Örnek 100 °C' deki etüvde 15 dk kurutulur ve örnek desikatöre alınarak soğutulur

2.aşama: Sterol Fraksiyonunun Ayrılması

Desikatöre alınan balondaki sabunlaşmayan madde miktarı tespit edilir



Sabunlaşmayan maddenin kloroformda % 5'lik çözeltisi hazırlanır



Elde edilen çözelti mikroşırınga ile ince tabaka plakasına olabildiğince ince sürölür



Sürme yapılan çözeltinin (çizginin) soluna, aynı hizada referans sterol çözeltisi (β -sitosterol) damlatılır



Plaka developpe tankına alınır (Developpe çözeltisi 65:35 oranındaki 100 mL'lik hekzan/dietil eter karışımından oluşur; plaka tanka alınmadan en az yarım saat önce, çözelti filtre kağıdıyla birlikte tanka konulmalıdır)

Çözelti, plakanın üst kısmının 1 cm yakınına geldiği zaman plaka tanktan çıkarılır



Plaka çeker ocakta bir süre bekletilir



Plakaya 2,7-dichlorofluorescein çözeltisi spreyleneir



UV lamba altında, referans çözeltisiyle aynı hizada bulunan bant işaretlenir



İşaretlenen bölgedeki silika jel kazınarak üzerinde filtre bulunan, vakum pompasına bağlı nüçerlerine alınır

Silika jel vakum altında önce 10 mL kloroform, sonra 30 mL dietil eterle yıkanır



Elde edilen çözelti 50 mL'lik rotary balonuna alınır



Çözelti 4-5 mL kalana kadar rotary'de buharlaştırılır



Çözelti, darası alınmış vial alınır



Çözelti azottan geçirilir



Birkaç damla aseton eklenerek, tekrar azottan geçirilir



Vial, etüvde 105 °C'de 10 dk bekletilir



Desikatöre alınarak soğutulur

3.aşama: Trimetilsililleme

Vialdeki sterol miktarı hesaplanır



Her mg sterol için 50 µl BSTFA/piridin karışımı (1:1 oranında hazırlanmış) eklenir



Steroller çözününceye kadar çalkalanır ve 15 dk beklenir



Birkaç dk santrifüj edilir ve çözelti kromatografik analize verilir

Sabunlaşma Sayısı Tayini

- Sabunlaşmayan madde, yağda çözünmüş halde olup sabunlaşmadan sonra suda çözünmeyen fakat tayinde kullanılan çözücüde çözünen maddelerin toplamıdır. Bunlar arasında steroller gibi lipid yapısındaki bileşikler, alkoller hidrokarbonlar ile yağda bulunabilen 105°C'de uçucu olmayan mineral yağlar ve yabancı organik maddeler yer alır.

ilke

Deneyin prensibi, 1 g yağın sabunlaşması için gerekli KOH'in mg olarak ağırlığı olan sabunlaşma sayısını tespit etmektir. Belirli bir miktar yağ numunesi, belirli miktarda ve ayarlı bir alkollü KOH ile kaynatılarak sabunlaştırılır. Sabunlaşma sonunda KOH in fazlası, yine ayarlı bir asit çözeltisi ile titre edilerek, sabunlaşmada kullanılan KOH miktarı belirlenir.

Kimyasallar

Fenol ftalein (% 1 lik Etanolde), 0.5 N Etanollü KOH Çözeltisi, 0.5 N HCl Çözeltisi

Gereçler

Hassas laboratuvar terazisi, Geri soğutucu

İşlem

Yaklaşık 2 g örnek 0.001 g duyarlılıkla balona tartılır. Üzerine bir pipetle tam 25 mL 0.5 N etanollü KOH çözeltisi ilave edilir. Geri soğutucu düzenine bağlanır ve zaman zaman karıştırılmak sureti ile yavaşça kaynatılır. 1 saat geri soğutucuda kaynatılır (sabunlaşması güç olan bazı yağlar için bu süre uzatılabilir). Balon geri soğutucu düzeneğinden alınıp sıcak haldeki sabun çözeltisine, 4-5 damla fenol ftalein ilave edilerek 0.5 N HCl ile fenol ftaleinin kırmızı rengi tamamen kaybolana kadar titre edilir. 25 mL etanollü KOH ile bir de tanık deney yapılır

5. Hesaplama ve deęerlendirme

5. Hesaplama ve deęerlendirme

$$\text{Sabunlaşma Sayısı} = (V_k - V) \times N \times 56.1 / m$$

V_k = Tanık deneyde harcanan HCl miktarı, mL

V = Örnek için harcanan HCl miktarı, mL

m = Örnek miktarı, g

N = HCl'in normalitesi

ÖDEV SORU

- Zeytin yağında yapılan sabunlaşma sayısı analizi sırasında 0,5 N HCl ile yapılan titrasyon işleminde şahit için 21 mL HCl harcanırken, örnek ile yapılan titrasyon işleminde 7,4 mL HCl harcanmıştır. Başlangıçta tartılan örnek 2,0065 g olduğuna göre sabunlaşma sayısını hesaplayınız ve sonucu ilgili tebliğe göre yorumlayınız.