

Determination of Cholesterol in Milk using the GC-FID Method with a Short Saponification Stage

O. M. Lysenko*, N. I. Davydenko

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 Volodymyrska, Kyiv, 01601, Ukraine;

*e-mail: olenalysenko@knu.ua

Received: September 17, 2025; Accepted: July 30, 2026

DOI: 10.17721/moca.2026.23-31

Cholesterol was determined in dry skimmed milk (<0.5%). The method includes a shortened saponification stage of the sample, extraction of cholesterol, its derivatization to ether, and GC-FID determination. The duration of one determination was reduced by shortening the sample saponification stage. A smaller amount of hexane was used for cholesterol extraction. The limit of detection is 0.21 mg per 1 g of milk; the limit of quantification is 0.7 mg per 1 g of milk. This technique can be used to determine cholesterol with a cholesterol content of more than 0.2 mg/g.

Keywords: cholesterol, milk, saponification, extraction, derivatization, gas chromatography, flame ionization detector

Визначення вмісту холестерину у молоці методом ГХ-ПІД зі скороченою стадією омилення

О. М. Лисенко*, Н. І. Давиденко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01601, Україна;

*e-mail: olenalysenko@knu.ua

Надійшла: 17 вересня 2025 р.; Прийнята: 30 липня 2026 р.

DOI: 10.17721/moca.2026.23-31

Розроблено послідовність пробопідготовки сухого молока для вивільнення та вилучення холестерину. Холестерин визначали у сухому знежиреному молоці (< 0,5 %). Методика містить стадію омилення зразка, екстрагування холестерину, його дериватизацію до етеру та визначення методом ГХ-ПІД. Тривалість одного визначення зменшено завдяки скороченню стадії омилення зразка. Для екстракції холестерину застосовано меншу кількість гексану. Межа виявлення становить 0,21 мг на 1 г молока, межа кількісного визначення – 0,7 мг на 1 г молока. Цю методику можна застосовувати для визначення холестерину із його вмістом понад 0,2 мг/г.

Keywords: холестерин, молоко, омилення, екстракція, дериватизація, газова хроматографія, полуменевіо-іонізаційний детектор

Вступ

Холестерол (ХС) $C_{27}H_{46}O$ – спиртоподібний стероїд, життєво важливий для організму людини ліпід, який міститься в клітинах та їхніх мембранах, підтримує цілісність і проникність мембран [1]. В організмі ХС бере участь у біосинтезі жовчних кислот [2], які розщеплюють харчові жири на дрібні краплі та сприяють перетравленню їжі, є прекурсором статевих гормонів, як-от тестостерон, естроген [3], є основним компонентом ліпопротеїнів, які транспортують гідрофобні молекули (жири) у такому гідрофільному середовищі як кров [4], бере участь у всмоктуванні та виробленні вітаміну D [5]. Нестача ХС у крові може спричинити анемію та синдром втоми [6].

З іншого боку надмір ХС призводить до розвитку хвороби – атеросклерозу, тому вкрай важливим є підтримання природно обумовленого балансу між його надходженням (або синтезом) і виведенням з організму [7]. Надмірна кількість холестеролу відкладається в артеріях у вигляді холестеринових бляшок, що призводить до зниження прохідності цих судин, а в найгіршому випадку – до повної непрохідності.

Оскільки ХС є гідрофобною сполукою, то для його транспортування кров'ю у печінці виробляються ліпопротеїни, які поділяють на два типи – ліпопротеїни низької щільності (ЛНЩ) та ліпопротеїни високої щільності (ЛВЩ). ХС у складі ЛНЩ вважають шкідливим холестерином, а ХС

у складі ЛВЩ – корисним холестериним. Саме ЛНЩ призводять до затвердіння та непрохідності артерій, а ЛВЩ допомагають видаляти ЛНЩ, переносять поганий холестерин назад у печінку, де він розщеплюється і виводиться з організму [8].

Для підтримання нормального балансу надходження та виведення ХС з організму необхідно, щоб близько 70 % ХС перебувало у складі ЛНЩ, а 30 % – у складі ЛВЩ [7].

У публікації [9] загальний рівень ХС у крові класифікують так: < 200 мг/дл – нормальний рівень, у межах 200-239 мг/дл – граничний, $\geq$ 240 мг/дл – високий рівень.

Три чверті всього ХС, що є в організмі людини, виробляється у печінці, надниркових залозах, кишечнику та у статевих залозах, решта – надходить з їжею тваринного походження [8, 10], тому людям, які перебувають у групі ризику, варто дотримуватися певної фізичної активності та вживати продукти з низьким рівнем ХС. Тому важливо контролювати вміст ХС у продуктах харчування. Найбільше його міститься у мозку, жовтках яєць, маслі, яйцях, свинячому м'ясі, салі, субпродуктах, телятині, найменше – в йогурті, знежиреному молоці, авокадо, ягодах, білій рибі, зеленій садовині, насінні гарбуза та соняшника [6]. У молоці та молочних продуктах доцільно визначати холестерин, оскільки ці продукти входять до складу багатьох харчових виробів для дорослого та дитячого харчування.

Визначають вміст ХС у харчових продуктах хімічними й інструментальними методами як-от фотометричний, флуориметричний, хемілюмінесцентний, вольтамперометричний, хроматографічний, ферментативний, а також за допомогою ферментних, неферментних та електрохімічних сенсорів [6].

Класичні хімічні методи – відносно недорогі та прості, але потребують багатоетапної пробопідготовки. Ферментні методи – досить дорогі через високу вартість ферментів, але при цьому мають низьку межу виявлення. Через складність матриці найпридатнішими методами визначення ХС у продуктах є газова (ГХ), а також обернено-фазова вискоефективна рідинна хроматографія (ОФ ВЕРХ) з різними детекторами (УФ, флуоресцентним, ІЧ, світлорозсіювання, випаровування, електрохімічним). Капілярна ГХ і ВЕРХ є надійними, чутливими і точними методами. Додаткова селективність досягається за рахунок відокремлення ХС від інших стеролів на селективних хроматографічних колонках [6, 10]. Крім цього для аналізу потрібні малі аліквоти (1 мкл). Уперше визначили ХС у сироватці методом ГХ з полуменево-іонізаційним детектором (ПІД) у 1964 р. Метод ОФ ВЕРХ з УФ-детектором при 260 нм вперше застосували для визначення вільного, етерифікованого та загального ХС у сироватці крові 1979 р. З того часу розроблено

багато аналітичних методів для аналізу ХС: ферментних, електрохімічних, хроматографічних із рутинними детекторами. Менше з тим, для виконання певних складних аналітичних і клінічних завдань дослідники продовжували розробляти такі дорогі гібридні методи як-от мас-селективне пряме визначення в реальному часі (DART MS), матрична лазерна десорбційно-іонізаційна мас-спектрометрична візуалізація (MALDI-MSI) та десорбційна електророзпилювально-іонізаційна мас-спектрометрична візуалізація (DESI-MSI), наприклад, для потреб візуалізації просторового розподілу холестерину та його похідних у зрізах тканин [10]. У будь-якому методі визначення така складна проба як харчові продукти потребує попередньої підготовки.

Методики із застосуванням мас-селективних детекторів дорогі і їхнє використання виправдане лише в деяких випадках. Визначення за допомогою ГХ-ПІД є рутинним і доступним для багатьох лабораторій. В цій роботі прагнули скоротити тривалість пробопідготовки молока для визначення ХС і кількість використаного екстрагенту для пришвидшення аналізу та покращення його екологічної безпечності.

Для хроматографічного визначення ХС вилучали з проби шляхом рідинної екстракції сумішшю розчинників (зокрема, хлороформ-метанолом), омиленням екстракту й подальшою екстракцією неомиленого ХС. В деяких дослідженнях для визначення ХС кінцеві екстракти дериватизували силанізаційними реагентами до етеру холестерину, в деяких обходилися без дериватизації [11, 12]. Відповідно до цього етапу пробопідготовки далі обирали оптимальний температурний режим хроматографічної колонки.

Метод AOAC (Official Method 994.10) [13] використовують для оцінювання багатокомпонентних харчових продуктів, метод IDF – в основному для кількісного визначення холестерину в очищеному молочному жирі [14].

Надалі розроблено методи, в яких для скорочення тривалості підготовки не екстрагували жир перед омиленням. В такому випадку етап підготовки називали «прямим омиленням» проби, а підготовлену пробу аналізували за допомогою капілярної ГХ.

Ліпопротеїни містять етерифікований і вільний ХС, білки, фосфоліпіди та тригліцериди, причому вміст гліцеридів значно переважає вміст ХС, тому вони діють як перешкоди під час попереднього оброблення проби для визначення неомилених речовин, таких як холестерин. Процес омилення проводять для перетворення гліцеридів на гліцерини та солі жирних кислот, які є амфіфільними молекулами, що їх легко видалити промиванням водою.

Розроблено кілька методів з «прямим омиленням» для вимірювання рівня холестерину

в молочних продуктах і рослинних жирах за допомогою ВЕРХ і ГХ. Результати, отримані у роботі [15] обома методами, були однаковими. Однак, визначення методом ВЕРХ є досить працеємистими, порівняно з ГХ, потребує багатоетапної тривалої підготовки проби, високого рівня кваліфікації виконавця аналізу.

Принцип методу АОАС 994.10 полягає в перетворенні гліцеридів на гліцероли і солі жирних кислот шляхом омилення проби розчином КОН в етиловому спирті впродовж 70–80 хв при нагріванні, обробленні етиловим спиртом з охолодженням до кімнатної температури, екстрагуванні неомиленого холестерину толуолом, дериватизації та ГХ-ПІД визначенні. Тривалість усього аналізу однієї проби становить близько 4 год [13].

В роботі [16] запропоновано простий, на думку авторів, спосіб омилення, який значно скорочує тривалість пробопідготовки. ХС визначали у молочних емульгованих продуктах (дитячих сумішах, дитячому харчуванні та сирах), уникаючи стадії нагрівання й очищення методом твердофазної екстракції. 1 г проби розчиняли у 10 мл дистилату на водяній бані, екстрагували ізопропанолом (10 мл), далі відділяли ізопропанол висолюванням, 5 хв центрифугували суміш при 4 °С. Для омилення до 4 мл верхнього ліпідного шару додавали 25 мг КОН, 1,6 г NaCl, 100 мг DSC-NH₂, енергійно перемішували, відстоювали, центрифугували. Аліквоту верхнього шару фільтрували крізь PVDF-фільтр із розміром пор 0,45 мкм. Підготовлені таким способом зразки аналізували методом ВЕРХ, але, як стверджують автори, їх можна аналізувати й методом ГХ.

У наведеному далі дослідженні ставили за мету зменшити тривалість визначення ХС в молоці за методом АОАС 994.10 [13], скоротивши стадію омилення й виконуючи ГХ визначення без дериватизації ХС, також прагнули зменшити об'єм використаних розчинників під час екстракції ХС.

Матеріали та методики досліджень

Стандартний розчин холестерину (500 мкг/мл) готували розчиненням сухого холестерину Sigma-Aldrich масою 10,0 мг у 20,0 мл комбінованого розчинника. Комбінований розчинник отримували, змішуючи 26,0 мл гексану, 8,0 мл хлороформу та 6,0 мл розчину 95% етилового спирту. Розчин КОН концентрацією 50 % готували розчиненням сухого гідроксиду калію масою 20,0 г у 20,0 мл дистильованої води. Розчин КОН 1 М готували розчиненням сухого гідроксиду калію масою 11,0 г у 200,0 мл дистильованої води. Розчин C₂H₅OH із вихідною концентрацією 95 % (об/об). В роботі використовували: гексан, хімічно чистий, ґатунку для газової хроматографії, хлороформ х.ч., лактозу C₁₂H₂₂O₁₁ х.ч., пальмітинову кислоту CH₃(CH₂)₁₄COOH х.ч. Реагенти для дериватизації: (CH₃)₃Si – триметилхлорсилан

(ТМХС), [(CH₃)₃Si]₂NH – гексаметилдисилазан (ГМДС). Мікрошприц 10 мм³. Колонка Agilent HP-5, 30 м×0,32 мм×0,25 мкм, нерухома фаза – 5% фенілметилсилоксан. Газовий хроматограф Agilent 6890N з полуменево-іонізаційним детектором.

Приготування стандартного розчину холестеролу. Для розчинення порошку холестеролу, спираючись на [17, 18], приготували комбінований розчинник – суміш гексану й етанолу (як споріднені до холестеролу за наявністю – ОН груп), та хлороформу (як компонент, що сприяє змішуванню гексану й етанолу). Склад комбінованого розчинника підбирали емпірично, з метою додати мінімальну кількість етанолу, через наявність у ньому води. Обрали об'ємне співвідношення гексан:етанол:хлороформ 13:4:3, при якому тривалий час суміш залишалася прозорою, а емульсії (у разі її утворення) легко позбувалися енергійним струшуванням суміші.

Приготування модельних розчинів та пробопідготовка. Для моделювання складу сухого молока з відомою кількістю ХС приготували модельні розчини, обравши найбільш вірогідні супутні компоненти. Модельні наважки сухого молока складалися з 0,5 г лактози, 0,3 г пальмітинової кислоти, як представника нерозчинних у воді жирів, та 0,5 мл вихідного стандартного розчину ХС, тобто загалом містили 250 мкг ХС. Після цього пробопідготовку проводили як для проби сухого молока.

Пробу сухого молока (Україна) 1,0000 г зважували на аналітичних вагах, поміщали у плоскодонну термостійку колбу з притертим горлом. До колби додавали 10,0 мл 95% етилового спирту та 2,0 мл 50% розчину КОН. Закривали колбу дефлегматором і кип'ятили на електричній плитці 20 хв із періодичним перемішуванням. Відтак колбу знімали з плити, охолоджували до кімнатної температури, знімали дефлегматор, додавали 10,0 мл гексану, закривали пробкою та енергійно струшували протягом 30 с. Потім вміст колби переливали у ділильну лійку, додавали 10 мл 1 М розчину КОН та енергійно струшували в горизонтальному положенні протягом 30 с. Після розшарування органічної й водної фаз водну фазу відкидали, а гексановий екстракт промивали двічі 5 мл дистильованої води. Екстракт переливали у пробірку, з верхнього шару відбирали 1,00 мл, переносили у віалу та залишали випаруватись за кімнатної температури або у сушильній шафі за температури не більше 50 °С.

Дериватизація ХС. Як дериватизаційні реагенти застосовували гексаметилдисилазан (ГМДС) та триметилхлорсилан (ТМХС), як у роботі [19]. Дослідили два способи дериватизації сухого залишку у віалі.

Спосіб 1. Діяли, як описано в АОАС 994.10 [13]): обраний об'єм стандартного або досліджуваного

розчину ХС випарювали у пробірці (місткістю понад 10 мл), розчиняли в 1,00 мл гексану, додавали 0,2 мл ГМДС і 0,1 мл ТМХС, енергійно перемішували отриману суміш протягом 30 с, відстоювали 15 хв, додавали 10 мл дистильованої води, ще раз перемішували та відстоювали ще 10 хв.

Спосіб 2. Діяли, як зазначено у роботі [20], тут суміш дериватизаційних реагентів із невеликою кількістю розчинника використовували як кінцеву матрицю для розведення сухого залишку. Дериватизували сухий залишок так: обраний об'єм стандартного або досліджуваного розчину ХС випарювали у віалі, до сухого залишку додавали 0,2 мл ГМДС, 0,1 мл ТМХС та 0,3 мл гексану, суміш енергійно перемішували, відстоювали 20–30 хв і центрифугували впродовж 3 хв зі швидкістю 1500 об/хв.

Умови хроматографування. Визначення проводили на газовому хроматографі Agilent 6890N з полуменево-іонізаційним детектором. Швидкість потоку в колонку становила 2,5 мл/хв при сталому тискові. Розділення проводили при трьох температурних режимах хроматографічної колонки: I – ізотермічний 260 °С, 10 хв; II – ізотермічний 290 °С, 10 хв; III – градієнт температури 200 °С, (10 °С/хв) – 300 °С. Температура капілярного інжектора дорівнювала 300 °С; застосовували два коефіцієнти розділення потоку: 50 і 5; час увімкнення продувки лайнера 2 хв; режим економії газу 20 мл/хв. Температура детектора 300 °С; швидкість потоку повітря 300 мл/хв; швидкість потоку водню становила 40 мл/хв; швидкість потоку допоміжного газу гелію – 45 мл/хв.

Статистичне оброблення результатів кількісного визначення ХС методом градувального графіка та методом добавок [21]. Для отриманого градувального графіка, побудованого в координатах “площа хроматографічного піка – вміст ХС (мкг)”, розраховували коефіцієнти a і b рівняння лінійної регресії ($S = a + b \cdot m$), їхні похибки (довірчі інтервали), коефіцієнт кореляції R , а також межу виявлення і межу кількісного визначення за 3s та 10s критерієм, відповідно, у мікрограмах сухого ХС у віалі.

Результати та обговорення

Ступінь розділення потоку та температура хроматографічної колонки. Вивчали вплив температури хроматографічної колонки та ступеня розділення потоку в капілярному інжекторі на час утримування і на повноту розділення ХС зі сторонніми компонентами. Ці дослідження проводили з недериватизованим ХС. Без розділення потоку в інжекторі пік ХС погано розділявся із широким піком розчинника. Для коефіцієнта розділення потоку 50 площа хроматографічного піка аналіта була занадто малою для кількісного визначення. Тому для подальшого визначення обрали коефіцієнт розділення 5, що забезпечувало отримання

достатньо вузького піка розчинника для повного розділення з ним піка ХС.

У всіх варіантах температурного режиму та розділення потоку досяглось повне розділення піка холестерину з піками домішок. При температурі колонки 260 °С час утримування ХС становив 5,94 хв, при температурі 290 °С – 2,64 хв; при градієнті температури 200 °С, (10 °С/хв) – 300 °С – 8,50 хв. Хроматограми для зазначених температурних режимів зображено на рис. 1. За отриманими результатами для подальших дослідів обрали ізотермічний режим – 290 °С (4 хв), при якому час утримування ХС був найменшим, а роздільна здатність зберігалася достатньою.

Передколонкова дериватизація холестерину. Оскільки метою роботи було визначення ХС із найменшою тривалістю та меншою кількістю етапів пробопідготовки, то спочатку досліджували хроматографічну поведінку недериватизованого ХС. За результатами хроматографувань розчину ХС із вмістом 500 мг/л часи утримування ХС добре збігалися $t_{\text{Рсеп}} = 2,726$ хв, RSD часу утримування = 0,61 % при $n = 6$, $P = 0,95$ (рис. 1), а от площі піків збігалися дуже погано $S_{\text{сеп}} = 413$ пА×с, RSD = 41 %, $n = 6$, $P = 0,95$. Припустили, що погана збіжність площ піків холестеролу на хроматограмах може бути наслідком взаємодії полярних молекул ХС із силанольними групами, що призводило до адсорбції більш полярних недериватизованих молекул ХС речовини на поверхні кварцового капіляра [11]. Надалі вивчали хроматограми розчину ХС із його попередньою дериватизацією.

Для порівняння результатів дериватизації у два способи, які описано в [22], записали хроматограми розчинів, які приготували після випарювання вихідного стандартного розчину ХС об'ємом 0,5 мл з розрахунку на те, що маса ХС у сухому залишку становитиме 250 мкг. На рис. 2 зображено хроматограми розчину недериватизованого ХС, а також дериватизованого ХС способами 1 і 2 (дериватизація ХС). З рис. 2 видно: для першого способу дериватизації пік ХС значно розмитий, а також розщеплений надвоє, що може бути результатом неповної дериватизації ХС; для другого способу пік ХС має значно більшу висоту та площу, кращу симетрію та збіжність за площею піка ($S_{\text{сеп}} = 803$ пА×с, RSD = 6,1 %, $n = 6$, $P = 0,95$). Також другий спосіб дериватизації простіший для виконання. Зважаючи на ці чинники, для побудови градувального графіка та кількісного визначення холестерину обрано другий спосіб дериватизації.

Градувальний графік для хроматографічного визначення вмісту холестерину. Для побудови градувального графіка у хроматографічні віали додавали 0,2 і 0,5 мл розчину ХС із концентрацією 50 мкг/мл та 0,10, 0,20, 0,50, 1,00 мл стандартного розчину ХС з концентрацією 500 мкг/мл. Отже, після випарювання у віалах було 10, 25, 50, 100, 250 та 500 мкг сухого ХС, відповідно. У табл. 1 наведено

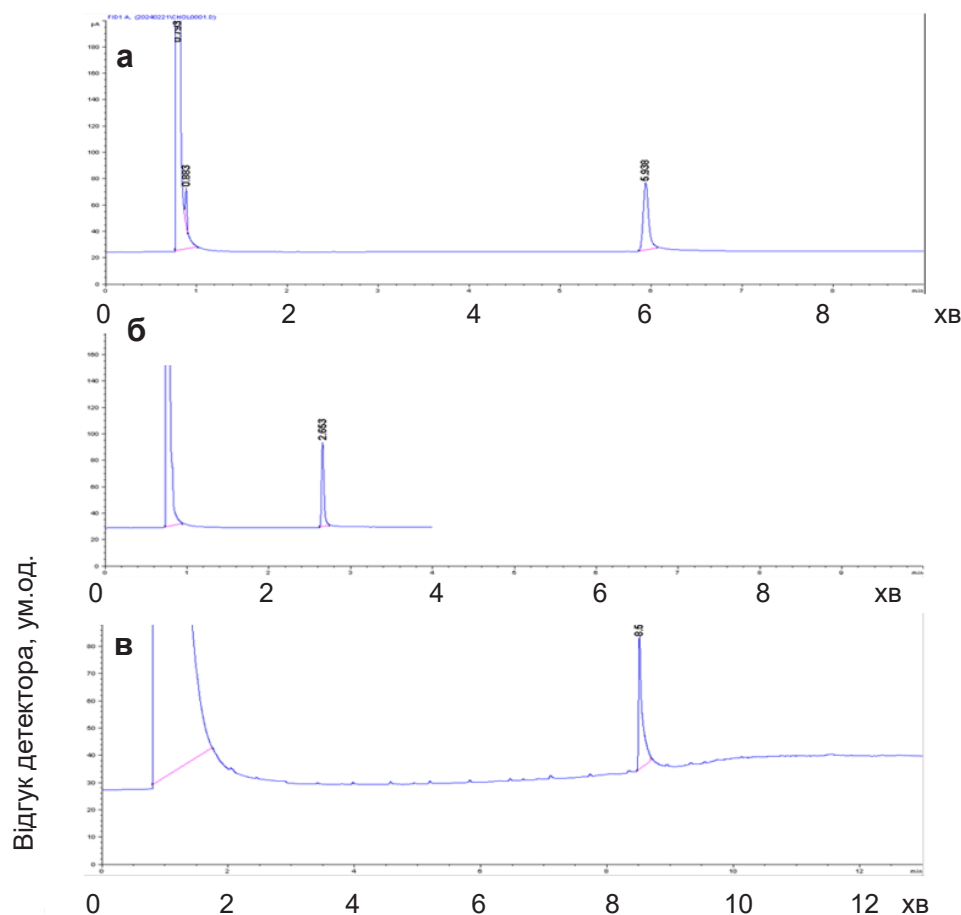


Рис. 1. Хроматограми розчину ХС (без попередньої дериватизації) для трьох температурних режимів хроматографічної колонки: а – 260 °С, 10 хв; б – 290 °С, 10 хв; в – градієнт температури 200 °С, (10°С/хв) – 300°С. Розділення потоку в інжекторі 1:5.

результати статистичної обробки градувальних точок. Отримали рівняння градувального графіка: $S_{\text{піка}}, \text{пА}\cdot\text{с} = (11 \pm 26) + (438 \pm 11) \cdot m_{\text{ХС}}, \text{мг}$, з коефіцієнтом кореляції 0,9998. Межа виявлення становить 0,064 мг/г, межа кількісного визначення 0,21 мг/г. Визначення ХС у зразках молока за градувальним графіком дало такі результати: $(0,297 \pm 0,072) \text{ мг/г}$, RSD = 9,7 %.

Таблиця 1. Результати статистичного оброблення градувальних точок (n = 4, P = 0,95).

Середня площа піка, 10 ²	Довірчий інтервал середньої площі піка, 10 ²	SD	RSD, %
1,15	0,025	1,0	0,9
2,33	0,12	4,7	2,0
4,44	0,44	18	4,0
11,4	1,5	59	5,2
21,9	1,8	67	3,0

Кількісне визначення холестерину методом добавок. Об'єктом дослідження було коров'яче молоко сухе знежирене, виготовлене за ДСТУ 4273, із зазначеним вмістом на 100 г: жирів менше 1,5 г (з них насичених жирів 0,9 г); вуглеводів 55,0 г (з них цукрів 55,0 г); білків 32,0 г; солі 0,42 г.

Для визначення вмісту холестерину методом добавок до проб сухого молока масою 1,000 г додали 0; 0,60; 0,80 та 1,0 мл вихідного 500 мкг/мл стандартного розчину ХС, й отримали добавки 0; 300; 400 та 500 мкг. Рівняння лінійної залежності площі піка від вмісту добавки таке:

$$S_{\text{піка}}, \text{пА}\cdot\text{с} = (127 \pm 42) + (0,44 \pm 0,12) \cdot m_{\text{добавки}}, \text{мкг.}$$

За перетином отриманої прямої з віссю абсцис визначено вміст холестерину в молоці $0,290 \pm 0,042 \text{ мг/г}$, що відповідає середньому вмісту ХС у знежиреному молоці. У табл. 2 наведено результати визначення ХС у пробі сухого молока способом «введено-знайдено». У такий спосіб знайдено вміст ХС у зразку $(0,243 \pm 0,038) \text{ мг/г}$, RSD = 6,2 % (n = 3, P = 0,95).

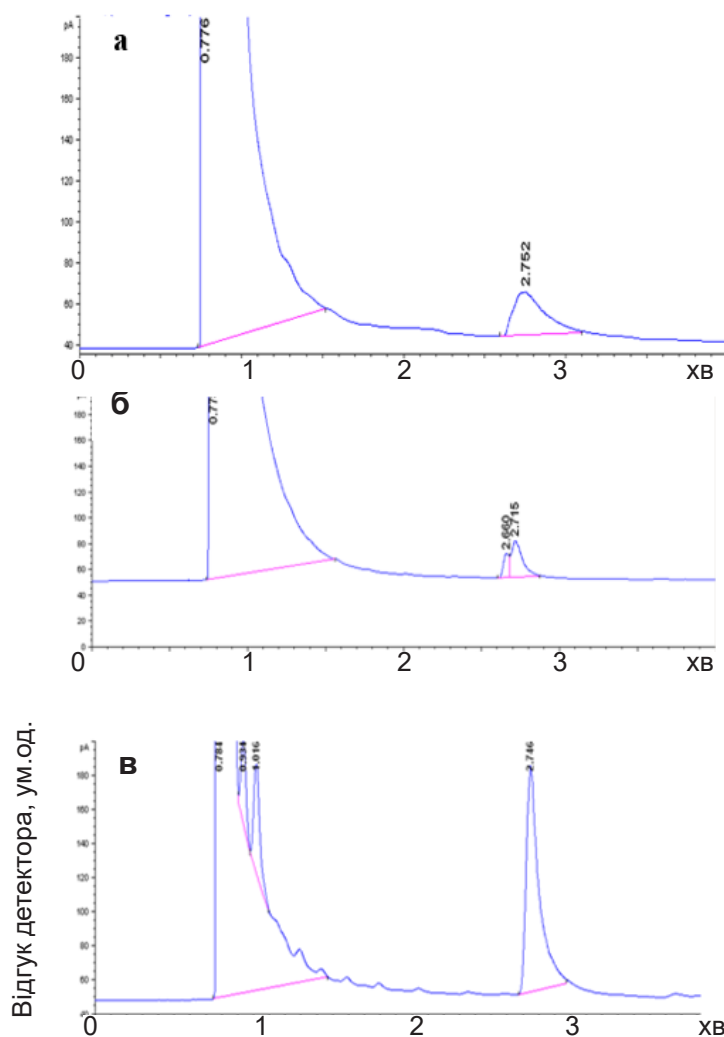


Рис. 2. Хроматограми розчину ХС: а – без дериватизації; б – дериватизація способом 1, в – дериватизація способом 2.

Таблиця 2. Визначення холестерину в пробі сухого молока, $m = 1,000$ г.

Введено, мкг	Знайдено, мкг	Вилучено, %	Знайдено у пробі, мкг
300	530	177	230
400	640	160	240
500	760	152	260

Отже, принцип визначення в цій роботі полягає в перетворенні гліцеридів на гліцеролі і солі жирних кислот шляхом омилення проби 2,0 мл 50% розчину КОН в 10,0 мл 95% етилового спирту впродовж 20 хв за нагрівання з дефлегматором. Далі – охолодження до кімнатної температури і екстрагування неомиленого холестерину 10 мл гексану, струшування 30 с, перенесення в ділильну лійку і додавання 10 мл 1М розчину КОН, струшування. Відокремлення і промивання

органічної фази двічі 5 мл дистильованої води. Аліквоту 1,00 мл переносили у віалу, чекали доки весь розчин випарується, додавали до сухого залишку 0,2 мл ГМДС, 0,1 мл ТМХС та 0,3 мл гексану, суміш енергійно перемішували, відстоювали 20–30 хв і центрифугували впродовж 3 хв зі швидкістю 1500 об/хв. Відтак аліквоту 1 мкл вводили в ГХ-ПІД, застосовували ділення потоку 1:50 і хроматографували на колонці НР-5 (5% фенілметилсілоксан) за температури 290 °С (4 хв).

У табл. 3 наведено етапи пробопідготовки й умови ГХ визначення ХС у молочних продуктах за даними літератури різними авторами і цього дослідження.

Завдяки скороченню тривалості стадій омилення, дериватизації і хроматографування досягли меншого часу всього визначення ХС. Тривалість усього аналізу однієї проби становила близько 4 год.

Таблиця 3. Етапи підготовки проб молока та умови ГХ визначення ХС.

Етап/параметр	Джерело [13]	Джерело [11]	Джерело [12]	Джерело [23]	Джерело [20]	Цей метод
1	2	3	4	5	6	7
Сапоніфікація	2-3 г проби. + 40 мл C_2H_5OH , 8 мл 50% КОН. Нагрівати з дефлегматором 70 ± 10 хв + 60 мл C_2H_5OH , 15 хв. Охолодити до кімнатної Т	0,2 г проби. + 5 мл 0,5 М КОН у метанолі. Нагрівати з дефлегматором при $80^\circ C$ 15 хв. Охолодити до кімнатної Т	0,1-0,5 г проби. + 8 мл C_2H_5OH . + ВСТ + 0,5 мл 40% КОН. Нагрівати з дефлегматором 15 хв. Охолодити до кімнатної Т	0,3 г проби + 20 мл циклогексану, 20 мл 1 М КОН в етанолі. Витримати ніч без нагрівання	0,2 г проби. + ВСТ. + 5 мл 5М КОН, 5 мл гептану. Струшувати 30 хв при $80^\circ C$ на водяній бані. Охолодити до кімнатної Т	1 г проби 10 мл 95% етанолу, 2 мл 50% КОН. Нагрівати з дефлегматором при $20^\circ C$ 20 хв. Охолодити до кімнатної Т
Екстракція	+ 100 мл толуолу; 110 мл 1М КОН. Струшувати. 40 мл 0,5 М КОН. 4 рази промити 40 мл води. Для зневоднення екстракту – контакт з 22 г Na_2SO_4	+ 1 мл води і 5 мл гексану. Струшувати 2 хв. Центрифугувати	+ 15 мл циклогексану, 12 мл води, гріти 6 хв. Повторити. Висушити, додати 0,25 мл гексану. Центрифугувати двічі по 5 хв	+ 10 мл циклогексану. Центрифугувати 5 хв	+ 4 мл води, 7 мл HCl, перемішувати. Відстояти 2 хв	10 мл 1М розчину КОН, струшувати. Відкремити. Промити 5 мл води
Дериватизація	25 мл випарити досуха, $40 \pm 3^\circ C$. Розчинити в ДМФА. 1,0 мл гексанового розчину + 0,2 мл ГМДС** + 0,1 мл ТМХС***, збовтати. Відстояти 15 хв. 1 мл гептанового розчину ВСТу* і 10 мл води. Центрифугувати 2 хв	Відсутня	Відсутня	10 мл екстракту випарити досуха. Розчинити в 100 мкл БТМТФАА **** + 25 мкл ТМХС в гексані, $80^\circ C$, 45 хв	0,5 мл екстракту у віалі випарити досуха. Розчинити у 300 мкл БТМТФАА **** + 1% ТМХС + 325 мл піридину. Закручену віалу перемішувати, інкубувати 20 хв	1,00 мл екстракту у віалі, + 0,2 мл ГМДС, 0,1 мл ТМХС та 0,3 мл гексану. Відстояти 20-30 хв і центрифугувати впродовж 3 хв
Додавання ВСТ*	Так.	Так	Так.	Так.	Так.	Ні
ГХ колонка	5 α -холестан 15 м $\times$ 0,32 мм $\times$ 1 мкм	15 м $\times$ 0,32 мм $\times$ 1 мкм SPB-1	5 α -холестан 30 м $\times$ 0,25 мм $\times$ 0,25 мкм DB-5	Епікопростанол 30 м $\times$ 0,32 мм $\times$ 0,25 мкм DB-5	5 β -холестан-3 α -ол 25 м $\times$ 0,22 мм $\times$ 0,25 мкм BPX5	30 м $\times$ 0,32 мм $\times$ 0,25 мкм HP5
Т колонки	190 $^\circ C$ (2 хв), 190-230 $^\circ C$, 20 $^\circ C$ /хв, (3 хв), 230-255 $^\circ C$, 40 $^\circ C$ /хв, (25 хв). Загалом 33 хв	Izo 285 $^\circ C$, (15 хв). Загалом 15 хв	260 $^\circ C$ (1 хв), 260-300 $^\circ C$, 4 $^\circ C$ /хв. Загалом 11 хв	75 $^\circ C$ (1 хв), 75-275 $^\circ C$, 25 $^\circ C$ /хв, (10 хв), 275-300 $^\circ C$, 5 $^\circ C$ /хв, (11 хв). Загалом 31 хв	50 $^\circ C$ (0,5 хв), 50-320 $^\circ C$, 20 $^\circ C$ /хв, (10 хв) Загалом 24 хв	290 $^\circ C$ (4 хв) Загалом 4 хв
Тривалість аналізу ХС	~ 4 год	~ 1 год	~ 1 год	~ 13 год	~ 2,5 год	~ 2,5 год
Межа виявлення	-	-	40 мкг/мл	1 мкг/мл	-	0,21 мг/г

ВСТ* – внутрішній стандарт, ГМДС** – гексаметилдісиплазан, ТМХС*** – триметилхлорсилан, БТМТФАА**** – N,O-біс-(триметилсилил)трифтороацетамід.

Висновки

Розроблено послідовність пробопідготовки для вивільнення й екстракції холестерину із сухого молока. Підтверджено необхідність дериватизації холестерину до етеру для подальшого ГХ визначення на колонці HP-5 Agilent (5% phenylmethylsiloxane). Запропоновано метод визначення холестерину в сухому молоці за методом добавок із межею виявлення 0,21 мг/г. Визначено вміст у сухому молоці методом ГГ ($0,297 \pm 0,072$) мг/г з RSD = 9,7 %, методом «введено-знайдено» ($0,243 \pm 0,038$) мг/г з RSD = 6,2 %. Розроблений метод з мінімальними змінами можна застосувати для визначення ХС в інших об'єктах (у молоці) із вмістом холестерину >0,2 мг/г.

Внесок авторів

Н. І. Давиденко – формальний аналіз, методологія, валідація даних, написання (оригінальна чернетка); О. М. Лисенко – концептуалізація, методологія, написання (перегляд і редагування).

Подяка

Автори висловлюють вдячність проф. Тананайко О.Ю. та кафедрі аналітичної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка за надання матеріально-технічної бази (зокрема газового хроматографа Agilent 6890N) і всебічну підтримку під час проведення експериментальних досліджень.

Фінансування

Це дослідження не отримало гранту від установ у публічному, комерційному або некомерційному секторах.

Декларація про використання ШІ

Під час підготовки цієї статті автори не використовували інструменти штучного інтелекту.

Етична декларація

Дане дослідження є теоретичним аналізом відкритих джерел і не передбачає безпосередньої взаємодії з людьми чи тваринами. Відповідно, отримання спеціального етичного висновку для такого типу дослідження не потрібно.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

Література

1. Maekawa, M., & Fairn, G. D. Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *Journal of Cell Science*. 2015, 128(7), 1422–1433. <https://doi.org/10.1242/jcs.164715>
2. Boyer, J. L. Bile formation and secretion. In *Comprehensive Physiology*. Wiley. 2013, 1035–1078. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>
3. Mauvais-Jarvis F, ed. Sex and gender factors affecting metabolic homeostasis, diabetes and obesity, vol. 1043. Cham: Springer International Publishing. 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3>.
4. Norum, K. R., Berg, T., Helgerud, P., & Drevon, C. A. Transport of cholesterol. *Physiological Reviews*. 1983, 63(4), 1343–1419. <https://doi.org/10.1152/physrev.1983.63.4.1343>
5. Faridi, K. F., Lupton, J. R., Martin, S. S., Banach, M., Quispe, R., Kulkarni, K., Jones, S. R., & Michos, E. D. Vitamin D deficiency and non-lipid biomarkers of cardiovascular risk. *Archives of Medical Science: AMS*. 2017, 4, 732–737. <https://doi.org/10.5114/aoms.2017.68237>
6. Ndhilala, A. R.; Yüksel, A.K.; Çelebi, N.; & Doğan, H. Ö. A General Review of Methodologies Used in the Determination of Cholesterol ($C_{27}H_{46}O$) Levels in Foods. *Foods*. 2023, 12, 4424. <https://doi.org/10.3390/foods12244424>
7. Kazymyrko, V. K. Cholesterol, as inducers of inflammation in the human body. *Ukrainian Rheumatological Journal*. 2017, 67(1). <https://www.rheumatology.kiev.ua/article/9780/xolesterin-kak-induktor-vospaleniya-v-organizme-cheloveka>
8. How to control your cholesterol. March, 2021. Public Health Center of the Ministry of Health of Ukraine. <https://phc.org.ua/news/yak-kontrolyuvati-sviy-kholesterin>.
9. Goodman, D. S. Report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Archives of Internal Medicine*. 1988, 148(1), 3. <https://doi.org/10.1001/archinte.1988.00380010040006>
10. Li-Hua Li, Ewelina P Dutkiewicz · Ying-Chen Huang, Hsin-Bai Zhou, & Cheng-Chih Hsu. Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food Drug Anal*. 2019. Apr; 27(2):375-386. DOI: 10.1016/j.jfda.2018.09.001
11. Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A., Psomas, I.E., & Mantis, A.I. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 1998, 81(11), 2833–2840. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75842-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75842-4).
12. Ulberth, F., & Reich, H. Gas chromatographic determination of cholesterol in processed foods. *Food Chemistry*. 1992, 43(5), 387–391. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90312-p](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90312-p).
13. AOAC International. Official Method 994.10. Cholesterol in foods, direct saponification-gas chromatographic method. 1994.

14. DSTU ISO 18252/IDF 200:2009. Anhydrous milk fat — Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Routine method) (ISO 18252:2006/IDF 200:2006, IDT).
15. Borkovcova, I., Janouskova, E., Drackova, M., Janstova, B., & Vorlova, L. Determination of sterols in dairy products and vegetable fats by HPLC and GC methods. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, 27, S217–S219.
16. Jang-Hyuk Ahn, In-Seek Jeong, Byung-Man Kwak, Donggil Leem, Taehyung Yoon, Changyong Yoon, Jayoung Jeong, Jung-Min Park, Jin-Man Kim. Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. *Food Chemistry*. 2012, 135(4), 2411–2417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.060>
17. Flynn, G. L., Shah, Y., Prakongpan, S., Kwan, K. H., Higuchi, W. I., & Hofmann, A. F. Cholesterol solubility in organic solvents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1979, 68(9), 1090–1097. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680908>
18. Chen, W., Su, B., Xing, H., Yang, Y., & Ren, Q. Solubilities of cholesterol and desmosterol in binary solvent mixtures of n-hexane+ethanol. *Fluid Phase Equilibria*. 2009, 287(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2009.08.016>
19. Islam, M. A., Hong, W.-H., & Chun, J. Importance of derivatization in cholesterol analysis using GC-FID for bakery products containing plant and animal lipid. In Research Square. 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2480458/v1>
20. Duong, S., Strobel, N., Buddhadasa, S., Stockham, K., Auldist, M., Wales, B., Orbell, J., & Cran, M. Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection. *Food Chemistry*. 2016, 211, 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.104>
21. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, & Stanley R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Ninth Edition. Brooks Cole. 2013.
22. David Saraiva, Rute Semedo, Maria Conceição Castilho, José Manuel Silva, & Fernando Ramos. Selection of the derivatization reagent - The case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC–MS analyses. *Journal of Chromatography B*. 2011, 879(32), 3806–3811.
23. Beggio, M., Cruz-Hernandez, C., Golay, P.-A., Lee, L. Y., & Giuffrida, F. Quantification of total cholesterol in human milk by gas chromatography. *Journal of Separation Science*. 2018, 41(8), 1805–1811. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700833>