



УДК 543.544.5.068.7:547.92

Хроматографический контроль качества яичной продукции: определение холестерина в желтке

Гостищев И.А., Вострикова С.М., Шапошников А.А.,
Дейнека Л.А., Дейнека В.И.

Белгородский государственный университет, Белгород

Поступила в редакцию 10.09.2008 г.

Аннотация

В работе предложен простой, быстрый и надежный метод определения холестерина в желтке куриных яиц, использующий простую экстракцию холестерина из желтка ацетоном и последующее количественное определение с использованием обращено-фазовой ВЭЖХ в неводных подвижных фазах с рефрактометрическим детектированием. Рассмотрены особенности подготовки пробы и хроматографического анализа. Метод использован для определения содержания холестерина в желтке куриных яиц и другой домашней птицы. Установлено, что обычно концентрация холестерина в желтке куриных яиц реализуемых на рынке Белгорода, находится в пределах от 8 до 20 мг на 1 г желтка.

Ключевые слова: холестерол, определение, желток куриных яиц, обращено-фазовая ВЭЖХ

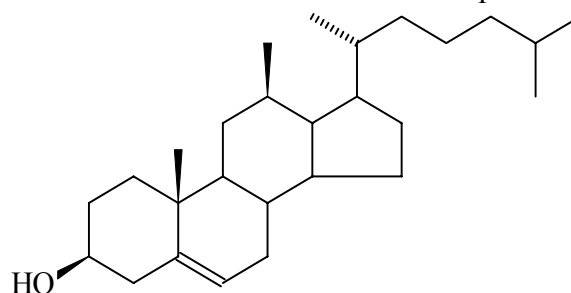
A simple not time consuming as well as reliable method of eggs yolk cholesterol quantification has been proposed. The method includes extraction with acetone and reversed-phase HPLC in non-water mobile phases with refractive index detection. Particularities of sample handling and chromatographic determination were discussed. The method was applied for eggs yolk cholesterol determination; the latter being as high as 8 – 20 mg per 1 g of the yolk.

Key words: cholesterol, determination, hen's egg yolk, RP HPLC

Введение

Ограничение в суточном рационе человека на пищу, богатую холестерином, связано с ростом его концентрации и концентрации липопротеинов низкой плотности в крови, что усиливает риск заболевания сердечно-сосудистой системы [1]. К числу наиболее богатых холестерином продуктов относится желток куриных яиц, содержащий от 122 до 408 мг на одно яйцо со средним показателем около 220 мг [2]. Поскольку для лиц, склонных к коронарному заболеванию сердца, необходимо ограничение суточного потребления холестерина на уровне 150-300 мг, то желателен использование яичной продукции из которой удалено более 85 % холестерина [3]. Следовательно, разработка быстрых и надежных аналитических методов контроля содержания холестерина в продуктах питания весьма актуальна.

С начала прошлого века основными способами определения холестерина были варианты спектрофотометрических (фотометрических) методов. Но они предполагали предварительное химическое превращение холестерина, не имеющего характеристических полос в УФ- и видимой областях электромагнитного спектра.



Холестерол

Колориметрические методы включали обработку образцов концентрированной серной кислотой, уксусным ангидридом, трихлоруксусной кислотой, трихлоридом мышьяка, хлоридом железа и комбинациями этих реагентов [4, 5]. В дальнейшем с развитием теории и материальной базы хроматографии удалось добиться более высокой селективности и эффективности анализа [6 - 12]. Метод ВЭЖХ позволяет определять содержание как самого холестерина, так и его эфиров [11]. В большинстве работ по использованию метода ВЭЖХ при анализе липидных фракций используют омыление исходного материала, но по данным работы [12] омыление не приводило к статистически значимому различию результатов определения холестерина в желтке куриных яиц с данными, полученными без этой обработки.

Данная работа посвящена разработке простого и быстрого способа определения содержания холестерина в желтке куриных яиц и использованию разработанного метода для исследования продукции птицефабрик, частных хозяйств, а также полученной в результате эксперимента по целенаправленному увеличению накопления ксантофиллов в результате применения специальных кормовых добавок.

Эксперимент

В работе использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Beckman 110B, крана дозатора Rheodyne 7215 с петлей объемом 20 мкл, рефрактометрического детектора R-401 (Waters Millipore). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Подвижные фазы готовили смешиванием ацетонитрила и ацетона (ч.д.а.) в нужном соотношении; разделение и детектирование проводили при комнатной температуре.

Аналізу подвергали продукцию ряда белгородских специализированных и частных хозяйств, приобретенную на рынке, а также полученную в результате эксперимента по использованию кормовых добавок обогащенных ксантофиллами (в рациионе кур-несушек) [13].

Методика определения холестерина в желтке яиц

Хроматографические условия: колонка 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; подвижная фаза: 12 об. % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Температура 18 – 25°С. Детектор рефрактометрический. Для градуировки отклика детектора использовали

серию (3 – 5) стандартных растворов холестерина в ацетоне в диапазоне $0,2 \div 1,5$ мг/мл.

Определение содержания холестерина: навеску желтка массой, $m = 1,25 \div 2,50$ г, разминали под слоем ацетона (20 мл) стеклянной палочкой в течение 5 – 10 мин. Раствор отделяли от осадка фильтрованием, осадок на фильтре отжимали от раствора, и промывали небольшим количеством ацетона; фильтрат довели до метки в колбе объемом 25 мл ацетоном. Полученный раствор вводили в хроматограф при помощи крана дозатора с петлей 20 мкл, содержание холестерина определяли по площади соответствующего пика на хроматограмме.

Результаты и обсуждение

Предварительный анализ хроматограмм экстрактов яичного желтка показал, что пик, соответствующий холестеролу сопоставим по величине с пиками экстрагируемых вместе с ним триацилглицеролов при использовании не отличающегося высокой чувствительностью рефрактометрического метода детектирования, рис.1.

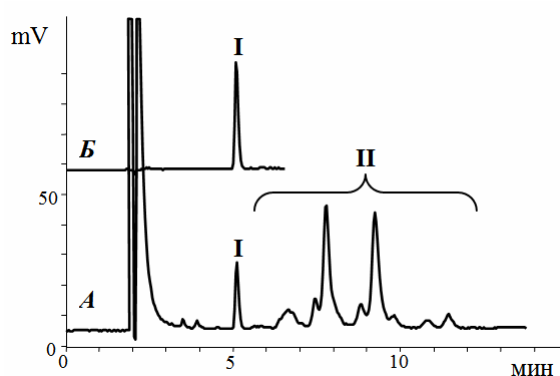
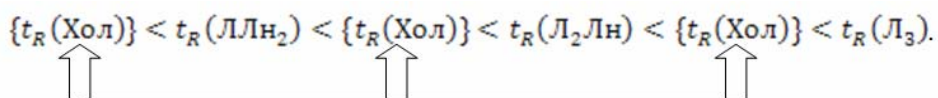


Рис.1. Разделение компонентов экстракта желтка куриных яиц
А – ацетоновый экстракт желтка; Б – стандартный раствор холестерина.
I – холестерол; II – триацилглицеролы

Поэтому нет необходимости в дополнительной обработке экстрактов для выделения и концентрирования или дериватизации холестерина. Единственная задача в таком случае состоит в выборе условий, при которых пик холестерина не накладывается на пики триацилглицеролов. Эта задача вполне разрешима, поскольку, как показывает анализ карты разделения [14], удерживание холестерина при изменении составов подвижной фазы изменяется медленнее по сравнению с удерживанием триацилглицеролов, рис.2, и могут быть выбраны условия разделения пика холестерина и пика триацилглицерола любой степени ненасыщенности. В частности, в соответствии с данными, представленными на рис.2, возможно изменение места элюирования холестерина в ряду с постоянным порядком элюирования триацилглицеролов, образованных линолевой (Л) и α -линоленовой (Лн) кислотами:



Следует отметить, что по нашим данным положение элюирования пика холестерина зависит от активности остаточных силанольных групп сорбента используемой колонки и может изменяться по мере «старения» или замены стационарной фазы, но возможность коррекции состава подвижной фазы для полного разделения соответствующих пиков всегда существует. Кроме того,

содержание триацилглицеролов с эквивалентными углеродными числами менее 42 (т.е. с удерживанием меньшим по сравнению с удерживанием трилинолеата, L_3) незначительно, что позволяет использовать достаточно широкий диапазон подвижных фаз – от порядка 10 – 12 об. % до больших концентраций ацетонитрила в ацетоне; ограничение при этом связано только с увеличением длительности хроматографирования и уменьшением растворимости жира желтка в подвижной фазе с ростом концентрации ацетонитрила.

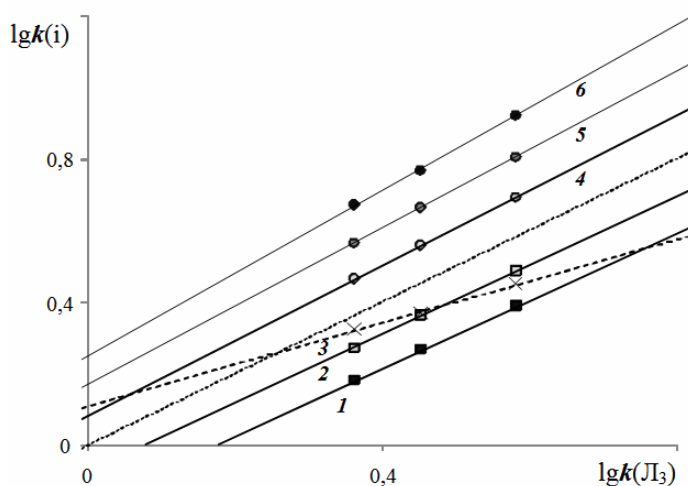


Рис.2. Карта разделения холестерина и некоторых триацилглицеролов
1 – α -Дилиноленат-линолеат, $L_{n_2}L_1$; 2 – L_nL_2 ; 3 – холестерол;
4 – дилинолеат-олеат, L_2O ; 5 – LO_2 ; 6 – O_3 .

Особенность метода анализа, предлагаемого в данной работе, связана с тем, что при подготовке образца к хроматографированию используется экстракция холестерина ацетоном из липофильной матрицы, образованной рядом веществ, в том числе нерастворимым в ацетоне лецитином. На рис.3 показано изменение концентрации холестерина в исследуемом образце экстракта при изменении соотношения желток – ацетон. При увеличении соотношения (R) массы желтка к объему экстрагента (ацетона) более 0,1 концентрация холестерина в экстракте оказывается уменьшенной. При этом повторная экстракция из остатка на фильтре при $R = 0,1$ показала отсутствие остаточного холестерина в образце, что свидетельствовало о полной экстракции холестерина в первом объеме экстрагента.

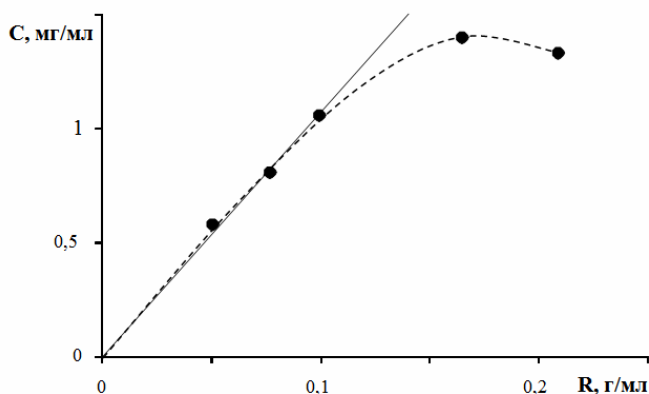


Рис.3. Концентрация холестерина в экстракте желтка при различных R - соотношениях желток/экстрагент

Появление максимума сопровождается еще более существенным изменением концентрации триацилглицеролов в экстракте, что свидетельствует о замене экстракции перераспределением веществ между двумя фазами при больших соотношениях желток / экстрагент.

Градуировочный коэффициент оставался постоянным, по крайней мере, в диапазоне 0,2 – 1,5 мг/мл; однако следует учесть, что для приготовления растворов холестерина в ацетоне желательно использовать небольшое нагревание на водяной бане (30 - 40°C). Кроме того в холодное время возможно выпадение из экстрактов желтка осадка, который также легко растворяется при нагревании на водяной бане. В целом, максимально допустимая относительная погрешность определения холестерина по предлагаемой методике не превышала 4.5 % ($P = 0,95$) при использовании в качестве результата среднего значения двух параллельных определений (для двух параллельных экстрактов образца яичного желтка), каждое из которых является средним значением двух параллельных результатов хроматографирования каждого экстракта. При этом основная погрешность определялась, по-видимому, неоднородностью гомогенизации желтка без использования механических устройств. Важно, что навески желтка необходимо брать в течение не более 5 мин после гомогенизации, вследствие испарения влаги с поверхности желтка. Изменение исходного образца можно частично предотвратить, закрывая поверхность полиэтиленовой пленкой.

Таблица 1. Концентрация холестерина в желтке куриных яиц, мг·г⁻¹

Месяц года	Источник продукции	Содержание холестерина	Среднее значение, число образцов
Декабрь (2007 г.)	Спец.хозяйства	8.3 – 12.2	9.9 (n = 4)
Январь (2008 г.)	Спец.хозяйства	10.1 – 17.1	12.7 (n = 5)
Февраль	Спец. хозяйство*	12.4 – 24.6	17.2 (n = 21)
	Частн.	14.2 – 20.3	17.6 (n = 5)
Март	Частн.	9.4 – 10.2	9.9 (n = 3)
Апрель	Спец.хозяйства	8.1 – 9.3	8.6 (n = 5)
Май	Спец.хозяйства	7.2 – 11.2	8.9 (n = 5)
	Частн.	10.6 – 11.1	10.8 (n = 3)
Июнь	Спец.хозяйства	7.9 – 10.5	9.3 (n = 3)
	Частн.	9.0 – 11.4	n = 2
Июль	Спец.хозяйства	8.0 – 12.5	9.8 (n = 5)
Август	Спец.хозяйства	6.9 – 9.8	8.1 (n = 3)
Сентябрь	Спец.хозяйства	9.3 – 14.6	12.6 (n = 3)
	Частн.	16.7 – 20.4	18.9 (n = 3)

* - хозяйство, специализирующееся на производстве племенной птицы

Результаты применения предложенной в работе методики определения холестерина представлены в табл.1 и табл.2. Для анализа приобретали на рынке образцы яиц специализированных и частных хозяйств; анализ образцов выполняли партиями примерно с интервалом в один месяц. Содержание холестерина в желтке куриных яиц составляло 8 – 20 мг на 1 г с заметным разбросом показаний (до 50 % и даже более) внутри партии, что связано, вероятно, с особенностью организма каждой курицы. Однако наблюдение в течение года проявило тенденцию к росту концентрации холестерол в зимний период, к заметному снижению этого показателя

в летний период, и с последующим ростом с наступлением осени. Наибольшее содержание холестерина было найдено в хозяйстве, специализирующемся на выращивании племенной птицы. В эксперименте, выполненном нами для получения продукции, обогащенной ксантофиллами, при 2-х – 3-х кратном росте концентрации суммы лютеина и зеаксантина заметных различий по накоплению холестерина не было обнаружено (среднее содержание 14,1 мг на 1 г желтка).

Таблица 2. Концентрация холестерина в желтке яиц домашних птиц, мг·г⁻¹

Птица	Месяц года	Содержание холестерина	Среднее значение, количество образцов
Голубь	Апрель	15.0 – 18.0	n = 2
Гусь	Апрель	12.9 – 18.0	14.6 (n = 4)
Индюк	Март	13.6 – 14.7	14.2 (n = 5)
Павлин	Апрель	14.2	n = 1
Перепел	Февраль	14.6 – 19.1	16.9 (n = 5)
Утка	Октябрь	12.0	n = 1
Фазан	Декабрь	11.8	n = 1
Цесарка	Декабрь	13.9	n = 1
	Май	9.0 – 10.4	9.6 (n = 3)

Высокое содержание холестерина, по-видимому, является необходимым для развития зародыша (основное назначение яиц в природе) и вряд ли может быть сильно уменьшено изменением диеты; экспериментально установлено, что даже введение ловастатина (гиполипидемическое средство, нарушающее ранние стадии синтеза холестерина в печени) не сильно сказывается на накоплении холестерина [15, 16]. Не удивительно, что наивысшее накопление холестерина было найдено именно в желтке яиц, предназначенных для выращивания племенной птицы. На это указывает и то, что примерно такой же уровень содержания холестерина характерен и для других (кроме кур) домашних птиц (табл.2), яйца которых не входят в обычную диету человека. В таком случае действительно эффективным методом улучшения качества яичной продукции может быть прямое удаление холестерина из желтка [17].

Заключение

Разработан простой и быстрый метод определения холестерина в желтке яиц с использованием экстракции липофильной фракции ацетоном с последующим использованием обращено-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием в неводных подвижных фазах. Использование разработанного метода позволило определить уровень накопления холестерина в желтке нескольких десятков куриных яиц и яиц других домашних птиц и установить закономерности изменения этого показателя при смене времен года.

Список литературы

1. Chen Z.-Y., Jiao R., Ma K.Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods // J. Agric. Food Chem. - 2008. - V.56. - P. 8761–8773.

2. Vorlová L., Siegllová E., Kapříšková R., Kopřiva V. Cholesterol content in eggs during the laying period // *Acta Vet. Brno.* - 2001. - V.70. - P. 387-390.
3. Patent EP 0450769.
4. Lamb F.W., Mueller A., Beach G.W. Quantitative determination of ergosterol, cholesterol, and 7-dehydrocholesterol. // *Ind. Eng. Chem.* - 1946. - v.18, №3. - P.187-190
5. Shin Y.S., Lee J.C. Rapid spectrophotometric determination of total cholesterol in small amounts of blood and cerebrospinal fluid // *Anal. Chem.* - 1961. - v.33, №9. - P.1220-1222
6. Osman H., Yap Kwee Chin. Comparative sensitivities of cholesterol analysis using CG, HPLC and spectrophotometric methods // *Malay. J. Anal. Sci.* - 2006. - v.10, №2. - P. 205-210
7. Quaipe M.L., Geyer R.P., Bolliger H.R. Rapid paper chromatographic microassay of free and ester cholesterol of blood // *Anal. Chem.* - 1959. - v.31, №5. - P. 950-955
8. Du M., Ahn D.U. Simultaneous analysis of tocopherols, cholesterol, and phytosterols using gas chromatography // *J. Food Sci.* - 2002. - v.67, №5. - P.1696-1700
9. Colin H., Guiochon G., Siouffi A. Comparison of various systems for the separation of free sterols by high performance liquid chromatography // *Anal. Chem.* - 1979. - v.51, №11. - P.1661-1666.
10. Manzi P., Panfili G., Pizzoferrato L. Normal and reversed-phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinoids, carotenes and sterols in dairy products // *Chromatographia.* - 1996. - v.43, №1/2. - P. 89-93.
11. Carroll R.M., Rudel L.L. Evaluation of a high-performance liquid chromatography method for isolation and of cholesterol and quantitation of cholesterol and cholesteryl esters // *J. Lipid Res.* - 1981. - v.22. - P.359-363.
12. Zhang R.-Z., Li L., Liu S.-T., Chen R.-M., Rao P.-F. An improved method of cholesterol determination in egg yolk by HPLC // *J. Food Biochem.* - 1999. - v.23. - P. 351-361.
13. Вострикова С.М., Шапошников А.А., Дейнека Л.А. Изучение накопления ксантофиллов в желтке куриных яиц при введении в диету специальных биологически активных добавок / Международная конференция «Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии и зоотехнии» 22-25 сентября 2008 г. Москва, Россия. Сборник тезисов. С. 159. <http://www.mgavm.ru/>
14. В.И. Дейнека. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Ж. физ. химии.* - 2006. - Т.80, №3. - С. 511-516.
15. Rowghani E., Boostani A.D., Mahmoodian Fard H.R., Frouzani R. Efficacy of dietary fish meal on production performance and cholesterol content of laying hens // *Pak. J. Biol. Sci.* - 2007. - V.10. - P. 1747-1750.
16. Elkin R.G., Rogler J.C. Reduction of the cholesterol content of eggs by the oral administration of lovastatin to laying henst // *J. Agric. Food Chem.* - 1990. - V.38. - P. 1635-1641.
17. Awad A.C., Bennink M.R., Smith D.M. Composition and Functional Properties of Cholesterol Reduced Egg Yolk // *Poultry Sci.* - 1997. V.76. - P.649-653.

Гостищев Игорь Александрович – магистрант биолого-химического факультета БелГУ, Белгород, Моб.т. 89038843233

Gostishchev Igor A. – student of Biological-Chemical department of Belgorod State University, E-mail: dzelu@yandex.ru

Вострикова Светлана Михайловна – аспирант кафедры биохимии и фармакологии медицинского факультета БелГУ; Белгород, Моб.тел. 89202097399

Шапошников Андрей Александрович – доктор биологических наук, профессор, зав.кафедрой биохимии и фармакологии медицинского факультета БелГУ, Белгород, т. (4722)301411

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н., доцент кафедры общей химии биолого-химического факультета БелГУ, Белгород, тел. (4722)-301159

Дейнека Людмила Александровна – к.х.н., доцент кафедры ОНАХ биолого-химического факультета БелГУ, Белгород, тел. (4722)-301159

Vostrikova Svetlana M. – post-graduate of Medical Department of Belgorod State University, E-mail: svetavostrikova@yandex.ru

Shaposhnikov Andrei A. – Dr.Sci.(Biology), Professor of Belgorod State University, E-mail: shaposhnikov@bsu.edu.ru

Deineka Viktor I. - Dr.Sci.(Chemistry), Associate professor of Belgorod State University; E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Deineka Ludmila A. – Ph.D.(Chemistry), Associate professor of Belgorod State University; E-mail: deineka@bsu.edu.ru