

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА В ЖЕЛТКЕ КУРИНЫХ ЯИЦ

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

Белгородский государственный университет, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85
deineka@bsu.edu.ru

В работе предложена методика определения холестерина в желтке куриных яиц с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ в неводных подвижных фазах с рефрактометрическим детектированием. Предложена простая подготовка пробы, состоящая в однократной экстракции липидов из желтка ацетоном. При этом определения ксантофиллов и триацилглицеролового комплекса могут быть выполнены из одной и той же пробы на той же хроматографической колонке и при использовании того же состава подвижной фазы (10 об. % ацетонитрила в ацетоне). Приводятся результаты определения концентрации холестерина в желтке куриных яиц различных производителей, а также в желтке перепелиных и утиных яиц.

Ключевые слова: ВЭЖХ, холестерол, триацилглицерол, каротиноиды, желток куриных яиц, определение.

Холестерол является ключевым стероидом в организме животных и человека. Из него синтезируются кортикостероиды, половые гормоны, желчные кислоты и витамин D₃, холестерол является незаменимым структурным компонентом мембран и наружного слоя липопротеинов плазмы крови. Таким образом, холестерол – это типичное соединение для метаболизма животных и человека [1, 2]. Холестерол содержится в значительных количествах в продуктах питания животного происхождения: в мясе, печени, мозге и т.д. Куриные яйца всегда рассматривались как превосходный продукт питания: они, действительно, являются прекрасными источниками белка, железа, фосфора; они богаты витаминами B₂, PP, B₁₂, D и E, рибофлавином и др. Кроме всего прочего это - низкокалорийная пища (70 калорий на яйцо). Но в 1960-е годы была установлена прямая связь между уровнем потребления холестерина и частотой коронарных заболеваний сердца, и не следует забывать также, что это соединение является одним из основных компонентов желчных камней. А поскольку в желтке массовая доля холестерина выше, чем в любом другом пищевом продукте, то было рекомендовано употреблять не более одного яйца в неделю. Этот предел был впоследствии увеличен до трех яиц, а в конце 1980-х – до четырех яиц в неделю. Но в 1991 году была опубликована странная работа о том, что 88-летний человек, съдавший 25 яиц ежедневно, имел нормальный уровень холестерина и не имел никаких признаков сердечных заболеваний. Поэтому в заголовках газет появилось: «Любители могут съесть две дюжины яиц, оставаясь здоровыми». Наконец, относительно недавно были опубликованы результаты исследования, выполненного в Гарвардском университете с участием 40000 мужчин и 80000 женщин в возрасте от восьми до сорока лет. Было установлено, что те, кто съедал одно яйцо в день (и даже более), не отличались большей вероятностью заболеваний сердца по сравнению с теми, кто съедал лишь одно яйцо в неделю [3].

Из приведенных данных видно, что холестерол – незаменимая составляющая организма, и различные нарушения обмена веществ ведут к нарушениям его метаболизма и к патологиям. Поэтому определение его содержания представляет собой важную задачу, и не удивительно, что к настоящему времени предложено много методов анализа холестерина в различных объектах. В середине прошлого века основными были спектрофотометрические методы, которые требовали некоторого химического превращения хо-

лестерола, не имеющего характеристических полос в УФ- и видимой областях электромагнитного спектра. Колориметрические методы включали обработку образцов концентрированной серной кислотой, уксусным ангидридом, трихлоруксусной кислотой, трихлоридом мышьяка, хлоридом железа и комбинациями этих реагентов [4, 5]. Для выделения холестерина из сложных смесей использовали его соосаждение с дигитонином [6, 7], с томатином [8] и др. Однако с теоретическим и инструментальным развитием хроматографических методов удалось добиться более высокой селективности и эффективности анализа [2, 9 - 12]. При этом метод ВЭЖХ позволяет определять содержание как самого холестерина, так и его эфиров [13]. Но по данным работы [14] процедура омыления, используемая для снятия ацильных групп с эфиров холестерина, не приводила к статистически значимому различию результатов определения без омыления и с омылением.

В настоящей работе исследована возможность упрощения процедуры пробоподготовки образцов желтка яиц и замены традиционно используемого УФ-детектирования холестерина на рефрактометрическое с использованием обращено-фазовой ВЭЖХ в неводных подвижных фазах.

Экспериментальная часть

В работе использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Beckman 110B, крана дозатора Rheodyne 7100 с петлей объемом 20 мкл, рефрактометрического детектора R-401 (Waters Millipore). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Хроматографические условия: колонка №1: 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм; колонка №2: 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 7 мкм; подвижные фазы готовили смешиванием ацетонитрила и ацетона в нужном соотношении, расход элюента: 1 мл/мин.

Методика определения холестерина в желтке яиц

Хроматографические условия: колонка 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм; подвижная фаза: 10 об. % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор рефрактометрический.

Градуировка отклика детектора: готовят серию (3 – 5) стандартных растворов холестерина в ацетоне в диапазоне 0.2 – 1.0 мг/мл; записывают хроматограммы (по два параллельных наблюдения) и градуировочную зависимость определяют по уравнению:

$$c = a + b \cdot S,$$

где a и b – эмпирические коэффициенты, при этом, как правило, параметр a статистически незначим, т.е. градуировочное уравнение должно иметь вид:

$$c = b \cdot S,$$

где S – площадь пика на хроматограмме, c – концентрация холестерина в стандартном растворе, г/мл.

Определение содержания холестерина: навеску желтка массой, $m = 0.5 \pm 1$ г, растворяют под слоем ацетона (15 - 20 мл) стеклянной палочкой в течение 5 – 10 мин. Раствор отделяют от осадка фильтрованием, осадок на фильтре отжимают от раствора и промывают небольшим количеством ацетона. Раствор доводят до метки в колбе объемом 25 мл ацетоном. Полученный раствор вводят в хроматограф при помощи крана дозатора с петлей 20 мкл. Определяют площадь пика холестерина и рассчитывают его содержание по формуле:

$$x = 1000 \cdot \frac{b \cdot S \cdot 25}{m}, \text{ мг холестерина в 1 г желтка,}$$

b – градуировочный коэффициент, S – площадь пика.

Результаты и обсуждение

В известных хроматографических методах определения холестерина используют спектрофотометрическое детектирование при коротких длинах волн (порядка 205 нм [1, 10 - 13]), соответствующих остаточному поглощению хромофоров молекулы. К сожалению, на этой длине волны электромагнитное излучение поглощают большинство веществ, которые могут присутствовать в сложных экстрактах биологического происхождения. Понятно, что в таком случае желательно очистить образец, например, через омыление, избавившись при этом от ряда омыляемых липидов. Но в желтке яиц содержание холестерина очень велико, что может позволить использовать для детектирования этого вещества рефрактометрический детектор, менее чувствительный по сравнению со спектрофотометрическим. Остается только найти условия отделения холестерина от других доминантных веществ. Прежде всего, следует остановиться на способе экстракции холестерина из желтка.

По нашему многолетнему опыту исследования липидов различного происхождения, как и для анализа компонентов желтка, очень удобным экстрагентом является ацетон. Этот растворитель позволяет, например, легко и количественно экстрагировать ксантофиллы - без повторной экстракции, - достаточно размять желток (в течение 5-10 мин) под слоем ацетона при соотношении 0.75 ± 0.25 г желтка на 10 мл ацетона [14].

Полученный ацетоновый экстракт может быть напрямую использован для спектрофотометрического определения суммы лютеина и зеаксантина. Он удобен и для исследования каротиноидного комплекса желтка методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, рис.1: вся дальнейшая пробоподготовка перед вводом в хроматограф будет состоять, в крайнем случае, в небольшом разбавлении образца ацетонитрилом. Правда, следует учесть, что при добавлении к экстракту более 25 об. % ацетонитрила может выпасть осадок липидов, поэтому этот метод может быть применен для обнаружения относительно липофильных каротиноидов, типа эфиров ксантофиллов.

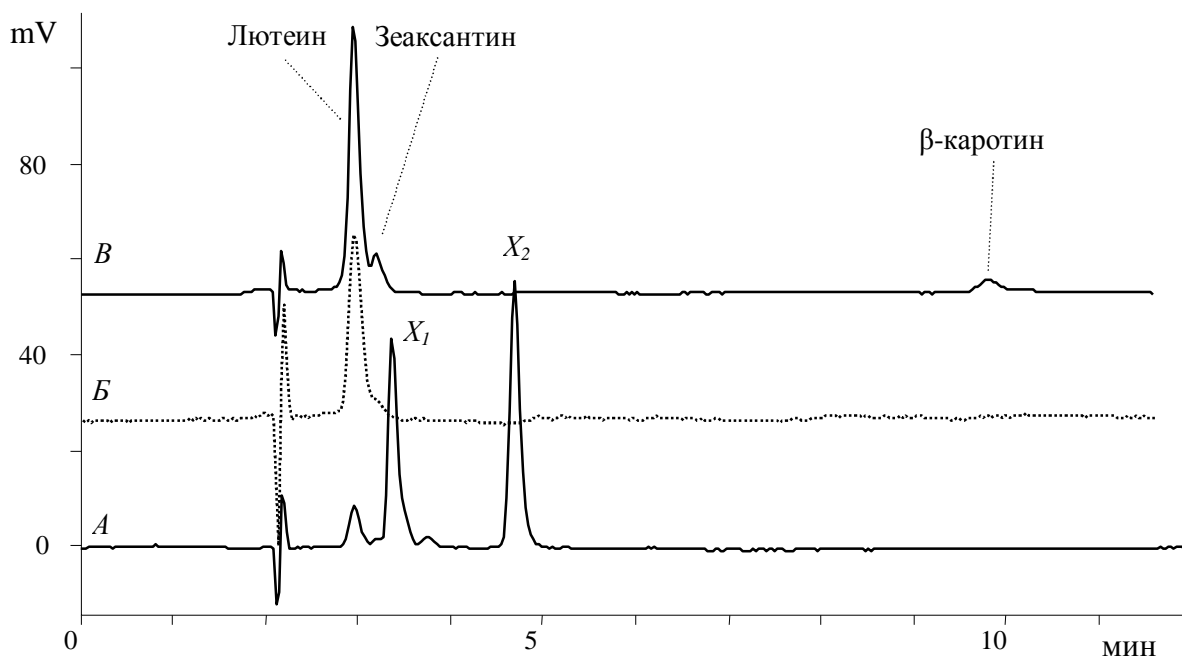


Рис.1. Разделение ксантофиллов желтка: А – куриный желток с красителями X_1 и X_2 ; Б – обычный комплекс желтка куриных яиц; В – каротиноиды желтка утиных яиц. Колонка: 250×4 мм Диасфер-110-С18, 5 мкм. Элюент 20 об. % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор: 445 нм.

Исследуя хроматограммы, представленные на рис.1, можно сделать несколько выводов. Во-первых, вывод о том, что при кормлении кур в некоторых хозяйствах используют некоторые красители (вероятно, типа апо-каротиналей, пики X_1 и X_2), накопление лютеина и зеаксантина в них незначительно, т.е. такой продукт (А, рис.1) не имеет профилактического эффекта относительно возрастной потери зрения [15]. Во-вторых, желток утиного яйца содержит заметное количество β -каротина (содержание этого каротиноида в желтке традиционных куриных яиц обычно очень не велико). Все-таки, для получения самой важной информации – разделения и количественного определения разделения пары лютеин – зеаксантин – удобнее использовать нормально-фазовую хроматографию в элюенте ацетон – *n*-гексан 30:70 по объему [16].

Получение ацетонового экстракта является обычным способом пробоподготовки при анализе триацилглицеролов растительных масел [17]. В случае желтка яиц тот же экстракт, что был использован для определения каротиноидов, может быть записан на той же хроматографической обращенно-фазовой колонке, но с рефрактометрическим детектированием, рис.2.

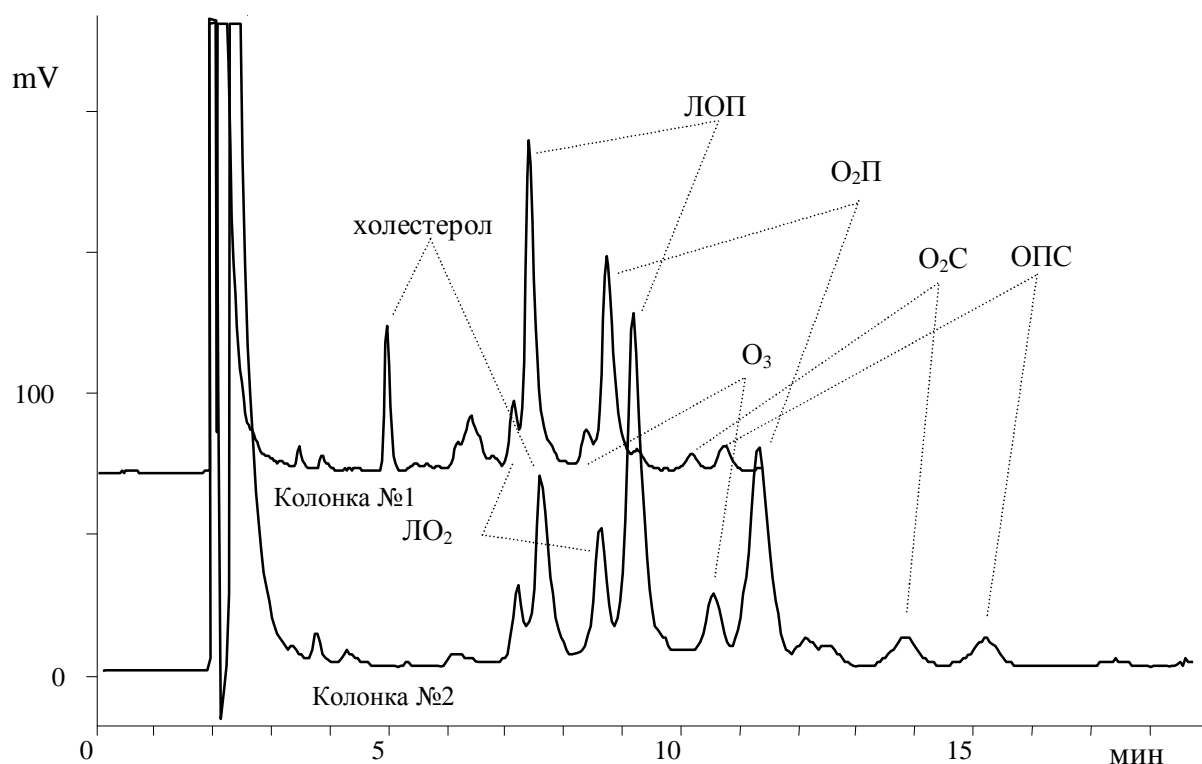


Рис.2. Хроматограмма ацетонового экстракта желтка с рефрактометрическим детектированием:
Колонка: 250×4 мм Диасфер-110-С18, 5 мкм. Элюент 10 об. % ацетонитрила в ацетоне,
1 мл/мин. Детектор: рефрактометрический. Триацилглицерол: ЛО₂ – линолеат-диолеат;
ЛОП – линолеат-олеат-пальмитат; О₃ – триолеат; О₂П – диолеат-пальмитат;
О₂С – диолеат-стеарат; ОПС – олеат-пальмитат-стеарат

Наконец, на хроматограмме, записанной на колонке №1, кроме относительно насыщенных триацилглицеролов обнаруживается пик, отсутствовавший во всех случаях анализа растительных масел, удерживание которого совпадало с удерживанием холестерина. Но на колонке №2 пик холестерина попал в область удерживания триацилглицеролов с эквивалентным числом атомов углерода, равным 44.

Изменение состава подвижных фаз для колонки №1 показало, что других веществ, например, триацилглицероловой природы, в этом пике нет. Хроматографическое поведение холестерина (и некоторых триацилглицеролов) относительно трилинолеата, представлено на рис.3. Меньший тангенс угла наклона прямой относительного удерживания [18-20] резко отличает холестерол от триацилглицеролов. При этом наклон линии тренда для сквалена, предшественника стероидов, подобен наклону, найденному для холестерина. Это может быть использовано для хроматографического детектирования стероидов в сложных смесях липофильных веществ экстрактов растительного или животного происхождения. Расположение линий на рис.3 позволяет сделать вывод о том, что пик холестерина для колонки №1 может попасть в зону триацилглицеролов с эквивалентным углеродным числом, *ECN*, равным 42 (область удерживания трилинолеата, см. [17]), только в достаточно быстрых подвижных фазах. Поэтому положение пика на хроматограмме для колонки №2 может быть связано только с тем, что эта колонка в ходе предыдущих исследований была лишена части привитой C18 фазы, что привело к ярко выраженному эффекту влияния на удерживание остаточных силанольных групп. Следовательно, для надежного разделения триацилглицеролов и холестерина необходимо использовать хроматографические колонки, заполненные обращенными фазами с эндкеппингом.

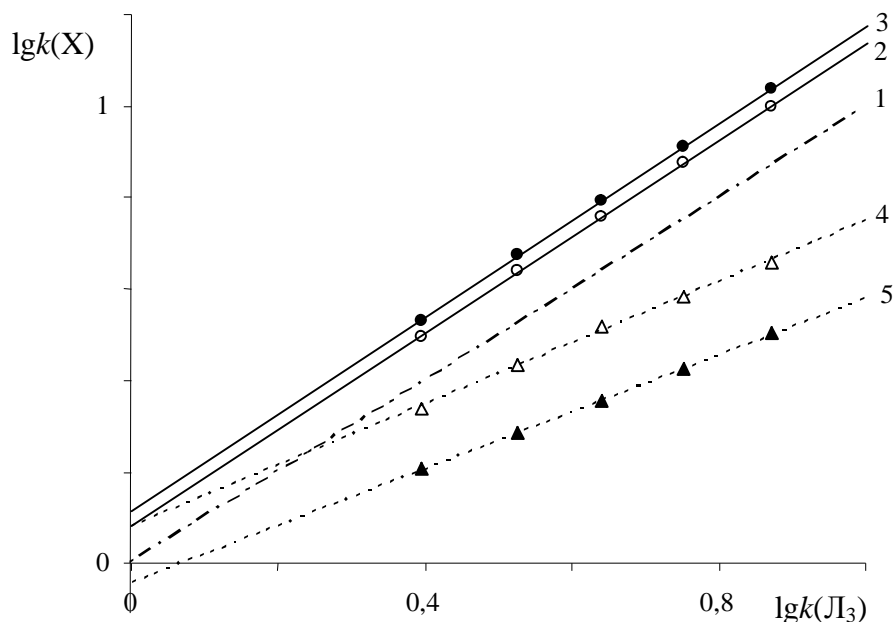


Рис.3. Удерживание холестерина и некоторых других веществ относительно трилинолеата: Колонка №1. Элюенты системы ацетонитрил – ацетон. Линии трендов для удерживания: 1 – трилинолеата (L_3) – координатная биссектриса, 2 – L_2O ; 3 – $L_2П$; 4 – холестерина; 5 – сквалена

Ацетон, как очень сильный растворитель, отличающийся к тому же и небольшой вязкостью, способен десорбировать с поверхности сорбентов довольно гидрофильные соединения. Поэтому основное ограничение при экстракции может быть связано с растворимостью холестерина. При комнатной температуре холестерол довольно медленно растворяется в ацетоне, а по нашему опыту, при стоянии (при охлаждении) экстрактов яиц относительно высокой концентрации наблюдается его выпадение в осадок (который может быть вновь растворен небольшим нагреванием образца на теплой водяной бане при 30 – 50 °С). Поэтому для оценки полноты экстракции мы использовали сопоставление результатов определения холестерина при различной массе навески желтка. При этом оказалось, что в диапазоне навесок 0.25 – 1.0 г было получено одно и то же значе-

ние концентрации холестерина в желтке, но при увеличении навески до 2.0 г результат оказывался заниженным примерно на 30%. При этом расхождение между параллельными наблюдениями не превышало 2 относительных %.

Анализ желтков яиц, выполненный по предложенной выше методике, показал, что содержание холестерина (в мг на 1 г желтка) составило 10.6 ± 0.4 ; 13.5 ± 0.5 ; 14.0 ± 0.5 и 13.0 ± 0.4 для продукции некоторых местных птицефабрик. Эти данные находятся в диапазоне обычной для мировой практики концентрации холестерина. Для желтка утиноного и перепелиного яиц были получены результаты 13.2 ± 0.4 и 10.0 ± 0.4 мг на 1 г, соответственно.

Наконец, напомним, что особенность предложенного метода состоит в том, что одновременно с определением холестерина можно проанализировать и триацилглицероловый состав жира желтка по одной и той же хроматограмме. На рис.4 представлено распределение триацилглицеролов (в моль %), сгруппированных по одинаковым эквивалентным углеродным числам, для ряда исследованных желтков яиц. Как следует из хроматограммы на рис.2, основные триацилглицеролы жира желтка – линолеат-олеат-пальмитат и диолеат-пальмитат. Содержание триацилглицеролов с ECN = 42 – основного для подсолнечного масла триацилглицерола – оказалось незначительным. Соотношение доли основных триацилглицеролов в жирах различных образцов яиц колебалось заметно вплоть до смены доминантного триацилглицерола, см. рис.4.

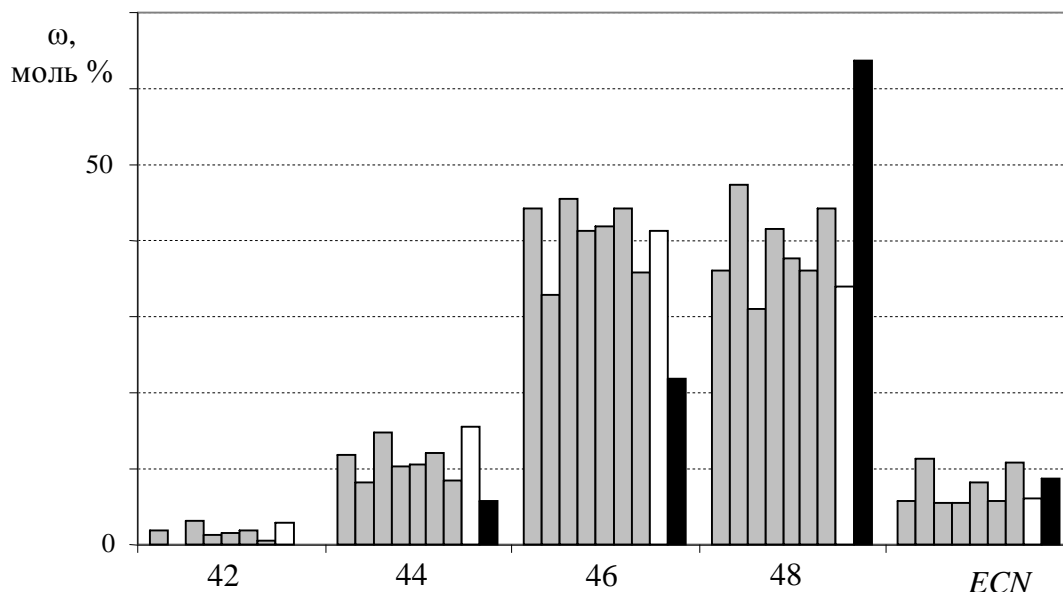


Рис.4. Распределение триацилглицеролов в жире желтка яиц:

- – желток куриных яиц различных производителей; ■ – желток перепелиного яйца;
 ▒ – желток утиноного яйца.

Состав жира желтка яиц перепелки оказался неотличимым от состава жира куриного яйца, в то время, как жир утиноного яйца оказался заметно более насыщенным.

Выводы

В работе предложена методика определения концентрации холестерина в желтке куриных яиц с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ в неводных подвижных фазах с рефрактометрическим детектированием. По предложенному методу используют простейшую процедуру подготовки пробы, состоящую в однократной экстракции липидов из желтка ацетоном. При этом один и тот же экстракт может быть использован для определения и каротиноидов (со сменой рефрактометрического детектора на спектрофотометрический), и триацилглицеролового состава жира. Измерения проводятся на одной и той же хроматографической колонке и при одном и том же составе подвижной фазы.

Список литературы

1. Мари Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. Т.1. – М.: Мир. – 2004. – 382 с.
2. 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
3. Bird P.J. <http://www.hhp.ufl.edu/faculty/pbird/keepingfit/ARTICLE/eggs.HTM>
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. Foldes F.F., Wilson B.C. Determination of cholesterol. Adaptation of Schoenheimer-Serry method to photoelectric instruments // Anal. Chem. - 1950. – V.22, №9. – P.1210-1213
7. Goodman J.R., Jarnagin L.P., Meier R.M., Shonley I.A. Determination of free and esterified cholesterol by a modified digitonin-anthrone method // Anal. Chem. – 1963. – V.35, №6. – P. 760-763
8. Huang T.C., Wefler V., Raftery A. A simplified spectrophotometric method for determination of total and esterified cholesterol with tomatine // Anal. Chem. - 1963. – V.35, №11. – P. 1757-1758
9. Quaife 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
10. 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
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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
15. Владимиров В.Л., Шапошников А.А., Дейнека Д.В., Вострикова С.И., Дейнека В.И. Исследование каротиноидного состава желтка куриных яиц. // Доклады РАСХН. - 2005. - №6. - С.46-48
16. Дейнека Л.А., Шапошников А.А., Вострикова С.М., Дейнека В.И. Пищевой дизайн: Исследование накопления ксантофиллов в желтке куриных яиц // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. 2007 (*В печати*).
17. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Фофанов Г.М., Балятинская Л.Н. Идентификация жирных кислот в составе триглицеридов масел семян растений с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ // Растительные ресурсы. - 2004. - Т.40, №1. - С. 104-112.
18. Дейнека В.И. Экспериментальное обоснование метода относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // Ж. физ. химии. - 2006. - Т.80, №3. - С. 507-510.
19. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // Ж. физ. химии. - 2006. - Т.80, №3. - С. 511-516.
20. Дейнека В.И. Метод относительного анализа удерживания в ВЭЖХ. Сопоставление инкрементных зависимостей // Ж. физ. химии. - 2006. - Т.80, №4. - С. 704-708.



DETERMINATION OF EGG YOLK CHOLESTEROL

**V.I. Deineka, A.A. Shaposhnikov, L.A. Deineka,
S.M. Vostrikova, I.A. Gostyshchev, T.S. Guseva**

Belgorod State University, 85 Pobeda Str., Belgorod, 308015
deineka@bsu.edu.ru

In the paper a method of yolk cholesterol quantification based upon reversed-phase HPLC with refractometric detection is proposed. The simple probe preparation by unitary lipid extraction with acetone is offered. The same probe may be utilized for xanthophylls as well as for triacylglycerols quantification on the same chromatographic column and mobile phase (10 % of CH₃CN in acetone) composition. Results of cholesterol concentration quantification in a yolk of chicken eggs of some Belgorod manufacturers, and in quail and duck yolk eggs are given.

Key words: HPLC, cholesterol, triacylglycerol, carotenoids a yolk of chicken eggs, determination.