

JOANNA LESZCZYŃSKA

MODYFIKACJA ENZYMATYCZNEJ METODY OZNACZANIA CHOLESTEROLU

MODIFICATION OF ENZYMATIC METHOD OF CHOLESTEROL DETERMINATION

Zespół Chemii Bionieorganicznej i Analitycznej
Instytut Podstaw Chemii Żywności Politechniki Łódzkiej
90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10,
Kierownik: prof. dr hab. J. Mastowska

W pracy zastosowano enzymatyczną metodę oznaczania cholesterolu. Do określania aktywności peroksydazy użyto substraty, które w wyniku reakcji dają fluoryzujące produkty. Opracowaną metodę zastosowano do oznaczania cholesterolu w przetworach mięsnych. Oznaczona zawartość cholesterolu wynosiła od 40,2 do 150,0 i nie odbiegała od wartości otrzymanych przez innych autorów. Współczynnik korelacji użytej metody oraz metody enzymatycznej – kolorymetrycznej wynosił 0,998.

WSTĘP

Najczęstszymi przyczynami zgonów w Polsce obecnie są choroba niedokrwienna serca i zawały oraz udary mózgu. Przyczyną tych chorób jest nieprawidłowy metabolizm lipidów, często spowodowany nadmiernym spożyciem tłuszczów, zwłaszcza zwierzęcych.

Wskaźnikiem prawidłowego metabolizmu lipidów jest zawartość cholesterolu, którego poziom jest często skorelowany z poziomem lipidów. Cholesterol jest niezbędny do właściwego funkcjonowania organizmu. Szkodzi dopiero jego nadmiar.

Związek ten, jako składnik żółci, uczestniczy w procesie trawienia, jest potrzebny do produkcji hormonów, zwłaszcza płciowych, ale również antystresowych. Umożliwia przyswajanie witaminy D. Bierze także udział w budowaniu komórek mózgu w czasie intensywnego rozwoju w okresie wczesnego dzieciństwa.

Występowanie cholesterolu i jego rola

Cholesterol jest prekursorem wszystkich innych steroidów w organizmie takich jak: kortykosteroidy, hormony płciowe, kwasy żółciowe i witamina D. Jest typowym produktem metabolizmu zwierzęcego, a więc znajduje się w pokarmach pochodzenia zwierzęcego takich jak: żółtka jaja, mięso, wątroba, mózg. W ustroju człowieka znajduje się on w ilości około 250 g, głównie w mózgu i nadnerczach. W osoczu krwi cholesterolu jest 150 – 200 mg/100 cm³, a jego ilość wzrasta przy niektórych schorzeniach. W warunkach patologicznych związek ten może osadzać się w narządach i tkankach

np. w postaci kamieni w przewodach żółciowych oraz w ścianach naczyń krwionośnych przy miażdżycy.

Zawartość cholesterolu we krwi nie powinna przekraczać 200 mg/dl. Około połowa cholesterolu w organizmie człowieka pochodzi z syntezy, a pozostała ilość jest dostarczana z pożywieniem. Około 50% zsyntetyzowanego cholesterolu pochodzi z wątroby, 15% z jelit, a znaczna część ze skóry.

W ciągu jednego dnia z organizmu wydalana się około 1 g cholesterolu. Prawie połowa, po przekształceniu w kwasy żółciowe, jest wydalana z kałem, pozostała część – w postaci obojętnych steroidów. Znaczna część cholesterolu wydalana z żółcią jest ponownie wchłaniana w jelitach, a następnie wychwytywana przez wątrobę i ponownie wydalana z żółcią. Zjawisko to jest znane jako krążenie jelitowo – wątrobowe.

W celu obniżenia zbyt wysokiego poziomu cholesterolu powinna być stosowana dieta niskocholesterolowa, która zawiera możliwie jak najwięcej produktów bogatych w błonnik – pieczywa razowego, grubych kasz, roślin strączkowych, warzyw i owoców. Należy również unikać stresów, a przynajmniej starać się go rozładowywać, regularnie uprawiać sport.

Metody wykrywania i oznaczania cholesterolu

Chemiczne metody wykrywania i oznaczania cholesterolu opierają się zasadniczo na dwóch reakcjach. Pod wpływem stężonego kwasu siarkowego dochodzi do odciągnięcia cząsteczek wody. Tworzy się czerwony kwas disulfonowy bicholestiadenu (odczyn *Salkowskiego*).

W obecności kwasu siarkowego i bezwodnika kwasu octowego tworzy się zielono zabarwiony kwas monosulfonowy bicholestiadenu (odczyn *Liebermanna-Burcharda*). Ślady wody uniemożliwiają reakcję [11].

Znane są także metody enzymatyczne z zastosowaniem esterazy cholesterolowej, oksydazy i peroksydazy [4, 9]. Cholesterol oznaczano także za pomocą czujników enzymatycznych, skonstruowanych w oparciu o elektrodę tlenową [5]. W ostatnich latach stosowane są również metody chromatografii gazowej [1, 6, 8, 10], w tym także kapilarnej [7] oraz HPLC [2, 7]. Chociaż metody chromatograficzne, jako dokładniejsze i prostsze, są najbardziej polecane do oznaczania cholesterolu, to również metody enzymatyczne są czułe, precyzyjne i nie wymagają drogiej aparatury.

Zasada metody enzymatycznej oznaczania cholesterolu

W metodzie enzymatycznej procedura oznaczania cholesterolu opiera się na następujących reakcjach [3]:

esteraza cholesterolowa

cholesterol zestryfikowany → cholesterol + kwasy tłuszczowe (1)

oksydaza cholesterolowa

cholesterol + O₂ → 4 – cholesten – 3 – on + H₂O₂ (2)

peroksydaza

2 H₂O₂ + fenol + 4 – aminoantypiryna → barwna pochodna chinonomoiminy
+ 4 H₂O (3)

Intensywność czerwonego zabarwienia otrzymanej pochodnej jest proporcjonalna do stężenia cholesterolu. Do pomiarów fluorymetrycznych używano spektrofluorymetr firmy Hitachi.

Zastosowana modyfikacja metody niniejszej pracy polega na użyciu fluoryzujących substratów dla peroksydazy.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki i roztwory

Część odczynników pochodziła z zestawu do oznaczania cholesterolu firmy Aqua-med (Łódź), który zawiera: odczynnik R₁ (0,1 mol/dm³ bufor fosforanowy pH 6,8; cholan sodu 1 g/dm³), odczynnik R₂ (liofilizat: esterazy cholesterolowej, oksydazy cholesterolowej, peroksydazy) oraz wzorzec cholesterolu 200 mg/100 cm³. Pozostałe odczynniki: kwas fenylloctowy, lumionol, kwas homowalinowy, kwas p-hydroksyfenylomlekowy zostały zakupione w firmie Sigma.

Przygotowanie próbeki

1 g zhomogenizowanej próbki wyrobu mięsnego (np. pasztetu) ekstrahowano trzykrotnie porcjami izopropanolu po 5 cm³, zbierając ekstrakty w kolbce pojemności 25 cm³. Następnie dodawano 5 cm³ HCl o stężeniu 8 mol/dm³, uzupełniano izopropanolem do kreski i wstawiano do lodówki na okres 20 min. w celu oddzielenia tłuszczu. Próbkę przesączało przez bibułę filtracyjną. W ten sposób oznaczano cholesterol wolny.

W celu oznaczenia cholesterolu całkowitego najpierw przeprowadzano hydrolizę estrów cholesterolu. W tym celu stosowano metanolowy roztwór KOH o stężeniu 1,0 mol/dm³. 5 cm³ tego roztworu dodawano do odważonej próbki i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w ciągu 25 min. stosując mieszanie za pomocą mieszadła magnetycznego. Następnie przeprowadzano ekstrakcję za pomocą kilku porcji 5 cm³ izopropanolu na gorąco, po ostudzeniu filtrowano i uzupełniano w kolbie miarowej do kreski izopropanolem.

Sposób wykonania oznaczenia cholesterolu

Odczynnik roboczy przygotowano w ten sposób, że zawartość buteleczki z odczynnikiem R₂ rozpuszczano w odczynniku R₁ i mieszano. W celu wykonania oznaczenia przygotowano następujące próbki wg schematu.

Schemat przygotowania mieszanin inkubacyjnych (cm³)

	Próba ślepa	Próba wzorcowa	Próba badana
Odczynnik roboczy	1,0	1,0	1,0
Woda dest.	0,05	-	-
Wzorzec	-	0,05	-
Materiał badany	-	-	0,05

W celu wykonania oznaczenia zawartości cholesterolu, do przygotowanej w oparciu o powyższy schemat mieszaniny inkubacyjnej, w kuwecie kwarcowej dodawano 0,5 cm³ roztworu kwasu p-hydroksyfenylloctowego i mierzono intensywność świecenia po 15 minutach.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I zestawiono długości fal: wzbudzającej i emisji dla poszczególnych substratów peroksydazy. Ponieważ okazało się, że kwas p-hydroksyfenylloctowy ma naj-

wyższy wskaźnik molowej emisji ($2,93 \times 10^6$), ten związek wykorzystano w dalszych oznaczeniach. Odchylenie standardowe i współczynnik zmienności w metodzie spektrofotometrycznej z wykorzystaniem fenolu i 4-aminoantypiryny oraz w metodzie fluorymetrycznej kształtowały się na podobnym poziomie. Jednakże ostatnia metoda charakteryzowała się znacznie niższą granicą oznaczalności. Wynosiła ona $0,4 \mu\text{g/ml}$ w porównaniu do $5 \mu\text{g/ml}$ w metodzie spektrofotometrycznej.

Tabela I. Długości fali wzbudzającej (EX) i emisji (EM) dla poszczególnych substratów

Substrat	EX	EM
Kwas p-hydroksyfenylooctowy	302	404
Luminol	284	432
Kwas p-hydroksyfenylopirogonowy	290	420
Kwas homowaniliowy	298	412

Tabela II. Zestawienie wyników oznaczania cholesterolu uzyskanych metodą fluorymetryczną

Badany produkt	Zawartość cholesterolu wolnego mg/100 g	Całkowita zawartość cholesterolu mg/100 g
Parówka	$40,2 \pm 4,1$	$56,7 \pm 4,3$
Parówka	I $77,6 \pm 6,2$	$92,9 \pm 8,1$
	II $115,7 \pm 6,2$	$132,0 \pm 7,3$
	III $95 \pm 4,6$	$111,3 \pm 7,2$
Paszтет	I $120 \pm 6,0$	n.d.
	II $80,1 \pm 6,0$	$109,1 \pm 8,2$
	III $117,3 \pm 8,9$	$140,2 \pm 9,1$
	IV $148,2 \pm 8,9$	n.d.
	V $137,3 \pm 8,2$	$150,0 \pm 8,3$
Paszteciki	$81,1 \pm 4,4$	n.d.
Boczek	$99 \pm 5,0$	n.d.
Pieczeń rzymska	I $85,5 \pm 5,1$	$120,1 \pm 7,4$
	II $116,4 \pm 8,9$	$141,0 \pm 9,1$
	III $79,7 \pm 4,7$	$100,2 \pm 6,8$
Kurczak faszerowany	$102,0 \pm 7,8$	$147,7 \pm 8,9$
Kaszanka	$55,0 \pm 4,0$	$82,8 \pm 4,7$
Szynka	$70,1 \pm 4,2$	$102,0 \pm 6,7$
Słonina	$98,6 \pm 6,7$	$131,5 \pm 7,8$
Pasta rybna	$56,7 \pm 4,1$	$79,8 \pm 4,8$

W tabeli II przedstawiono wyniki oznaczania całkowitej zawartości cholesterolu otrzymane metodą enzymatyczną z fluorymetrycznym pomiarem aktywności peroksydazy. Mieściły się one w normach przyjętych dla danych produktów i nie odbiegały od wartości podawanych przez innych autorów. Współczynnik korelacji między metodą spektrofotometryczną w oparciu o test enzymatyczny firmy Aquamed a metodą fluorymetryczną wynosił 0,998.

WNIOSKI

1. Zastosowanie fluoryzujących substratów do oznaczania aktywności peroksydazy w metodzie enzymatycznej pozwala na ponad dziesięciokrotne obniżenie granicy oznaczalności tego związku.
2. Peroksydaza jest często stosowana w różnych oznaczeniach enzymatycznych i immunoenzymatycznych. Celowe wydaje się być użycie kwasu p-hydroksyfenylooctowego do oznaczania jej aktywności, gdyż wiąże się to z możliwością wykrywania znacznie mniejszych zawartości danych związków.

J. Leszczyńska

MODIFICATION OF ENZYMATIC METHOD OF CHOLESTEROL DETERMINATION

Summary

Fluorimetric substrates for peroxidase activity determining were described in this work so that to establish cholesterol concentration by enzymatic method. p-hydroxyphenylacetate acid was used, as the most favourable, so that to determine cholesterol content in meat products. Using of this compound enables to diminish cholesterol determining limit more than 10-times. Obtained results of cholesterol content are convergent with results obtained by the other authors.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aguello E., Gelos, B.S.*: Gas – liquid chromatographic determination of the total and free cholesterol in egg pastes, *Food Research Int.* 1996, 29, 77–80.
2. *Arneht W., Al-Ahmad H.*: Cholesterol. Its determination in muscle and adipose tissue and in offal using HPLC, *Fleiwirtschaft* 1995, 75, 1001–1003.
3. *Bergmayer*: *Methods of enzymatic analysis*, Pergamon Press.
4. *Dong-Kuk L., Joung-Jwa A., Hae-Soo K.*: Comparison of gas chromatographic method with enzymatic method for cholesterol determination in milk and cream, *Foods and Biotechnology* 1997, 6, 322–324.
5. *Jung-ho K., Tai-Jin K., Dong-Hee R., Bong-Soo N.*: Simultaneous determination of glucose, lactate and cholesterol using an oxygen electrode with the multiple cathode system, *Food Sci. Biotech.* 1998, 7, 28–34.
6. *King A.J., Paniangvait P., Jones A.D., German J.B.*: Rapid method for quantification of cholesterol in turkey meat and products, *J. Food Sci.* 1998, 63, 382–385.
7. *Moraschiello G., Diaz J., Garcia-Regueiro J.A.*: Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection, *HRC* 1996, 19, 165–168.
8. *Naeemi E.D., Nissar A.A., Sharrah T.K.*: Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food, *Journal of AOAC Int.* 1995, 78, 1522–1525.
9. *Pasin G., Smith G.M., O'Mahony M.*: Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent, *Food Chem.* 1998, 61, 255–259.

10. *Peterson E., Amado R.*: Simplified method for the simultaneous gas chromatographic determination of fatty acid composition and cholesterol in food, *Lebensm.-Wissenschaft und Technologie* 1997, 30, 202–209.
11. *Struszyński M.*: Jakościowa analiza organiczna, PWN 1960.

Otrzymano: 1999.02.08