استخدام الطريقة الانزيمية لتقدير الكولسترول في صفار البيض

قاسم إبراهيم محمد

الملخص

استخدمت الطريقة الأنزيمية المعتمدة في تقدير نسبة الكولسترول في الدم لتكون ملائمة لتقديره في صفار البيض بعد اجراءعملية الصوبنة لعينات صفار البيض دون الحاجة الى استخلاص الدهن, اذ تم مزج 0.2غم من صفار البيض المسلوق مع 5 مل من محلول 0.5 مولاري هيدروكسيد البوتاسيوم الميثانولي في انبوبة اختبار، اغلقت جيدا وسخنت بحمام مائي في درجة حرارة 80م لمدة 15دقيقة مع التحريك المتقطع كل 5 دقائق .وبعد تبريدها بالماء اضيف لها 1مل ماء مقطر و5مل هكسان ومزجت لمدة 10 ثواني . سحب من طبقة الهكسان 0.25 مل وجففت في درجة 37م وأضيف 1مل من المحلول الأنزيمي المكون من أنزيم الكولسترول بيروكسيديز والاوكسيديز والاستريز وبعد الحضن في درجة حرارة 37م لمدة 10 دقائق خففت العينة بأضافة 4 مل من المحلول الملحي تركيز 2%، تلاها نبذ مركزي على 5000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق ، وقدرت التراكيز بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجة قدرها 550 نانوميتر والمقارنة مع قراءة محلول قياسي للكولسترول تركيزه 200 ملغم /100 غم وقد كانت نتائج المتوسط الحسابي لنسبة الكولسترول 1219ملغم/100غم صفار بيض .استخدم نموذج قياسي معلوم التركيز للتاكد من كفاءة ودقة الطريقة، وأشارت نتائج التحليل الإحصائي الى ان معامل التحديد باستخدام هذه الطريقة كان 0.998 والذي يعكس كفاءة ودقة عاليتين لتقدير الكولسترول لذا يمكن اعتبارهذه الطريقة سهلة وسريعة وقليلة الكلفة ولها دقة عالية لذا ينصح باجرائها لتقدير نسب الكولسترول في البيض ومنتجاته .

المقدمة

زاد الاهتمام بالكولسترول لزيادة الوعي الصحي لعلاقة ذلك بكولسترول الدم والاصابة بامراض القلب التاجية،وزاد الاهتمام بالعوامل التي ترفع من مستوى كولسترول الدم مثل الاغذية الحيوانية الغنية بالكولسترول مثل اللحم،البيض والحليب ومنتجاته. ويعد البيض من الاغذية الغنية بالكولسترول اذ تحتوي البيضة الواحدة على 240ملغم من الكولسترول اي ما يعادل 4.32 ملغم لكل غرام واحد من البيضة الكاملة (21) .ولهذا السبب فقد دخل البيض واستخدامه كغذاء في النقاشات الجارية حول علاقة كولسترول البيض بامراض القلب التاجية وامراض تصلب الشرايين التي تصيب الانسان . ويقوم الكولسترول بعدة وظائف فسلجية اذ يدخل في تركيب جدران الخلايا الحيوانية بصورة عامة ، ويدخل في تكوين حوامض الصفراء والتي تلعب دورا مهما في هضم وتمثيل الدهون في داخل الجسم وكذلك يعد وحدة البناء لجميع الهرمونات الجنسية وهرمونات الغدة الكظرية، وكما يتحول الكولسترول في منطقة تحت الجلد الى فيتامين D3 تحت تاثير الاشعة فوق البنفسجية في ضوء الشمس (19).لدى ارتفاع نسبة الكولسترول في مصل الدم عن المعدلات الطبيعية ولمدة زمنية طويلة فأنه يترسب حول بطانة الجدران الداخلية للاوعية الدموية مما يؤدي الى اعاقة مرور الدم في هذه الاوعية فتضيق هذه الاوعية وتتصلب ويزداد احتمال حصول الجلطة الدموية التي قد تؤدي الى الموت او الى امراض في القلب (7) ولهذا فقد دعت المنظمات الصحية الى ضرورة الاقلال من استهلاك المواد الغذائية

كلية الزراعة – جامعة بغداد – بغداد ، العراق.

تاريخ تسلم البحث:آيار/2010.

تاريخ قبول البحث:ك1 /2010.

الغنية بالكولسترول مثل البيض والحليب والزبد والكبد . اشار Lee وGriffin (16) ان استهلاك بيضة يوميا لا تاثير لها في رفع مستوى كولسترول الدم، فقد اشارت الدراسات المتعلقة بعلم الاوبئة وامراض القلب بعدم وجود اي علاقة واضحة او مستقلة بين الكولسترول الغذائي او استهلاك البيض وخطر الاصابة بامراض القلب (18). كما وجد ان تناول الحوامض الدهنية المشبعة يكون مؤثراً في زيادة مستوى Low density lipoprotein(LDL) بدرجة اعلى مما يحصل لدى استهلاك الكولسترول الغذائي الموجود في البيض (16) وهذا الدليل ادى الى تراجع منظمة الصحة لبريطاني وجمعية القلب الامريكية الى عدم تحديد كمية البيض التي يستهلكها الفرد لان البيض وان كان غني بالكولسترول فانه فقير بالحوامض الدهنية المشبعة، اذ اشارت الى ان البحوث اهملت تأثيرالحوامض الدهنية المشبعة عند اجراء تجاربهاكما اشار اليه Gray ، Griffin(11)، Kromhout وجماعته (15)، في حين وجد Zock وجماعته (28) ان الحوامض الدهنية المشبعة تزيد من مستوى (LDL) وتقلل من High density lipoprotein (HDL) اما Demeke وجماعته (8) فقد اشار ان دهون الاسماك تقلل من لزوجة الدم وكذلك مستوى (LDL)وتزيد مستوى (HDL) في حين اشار Abdullah (1) الى ان استهلاك حامض اللينولينيك (linoleinic acid) بكميات كافية والتي مصدرها الزيوت النباتية مثل فول الصويا وزيت الذرة وزيت زهرة الشمس تغني عن استهلاك دهون الاسماك لان الجسم قادر على تحويلها الى دهون متعددة عدم التشبع وهذا بدوره يعطي نفس نتائج دهون الاسماك وهذا ما اكده Jules (14) ، Kromhout وجماعته (15) ، Uiberth وRfich (26) .

تقسم الطرائق المتبعة لتقدير الكولسترول إلى نوعين، يشمل النوع الأول اعتماد التفاعلات اللانزيمية والنوع الثاني اعتماد التفاعلات الإنزيمية المتضمنة تفاعل الكولسترول مع Cholesterol oxidase لتكوين بيرو كسيد الهيدروجين والتي تتناسب كميته طردياً مع كمية الكولسترول (27). تعتمد الطرائق القديمة المستخدمة في تقدير الكولسترول إتباع خطوات طويلة تشمل استخلاص المادة الدهنية واجراء الصوبنة واستخلاص المادة غير المتصبنة وتبخير المذيبات واستعمال كواشف خطرة ومذيبات عضوية بكميات كبيرة وذات كلفة عالية وتستغرق وقتا طويلا بالتحليل فمنها من يستخدم كلوريد الحديديك وحامض الكبريتيك وحامض الخليك (29) ففي طريقة الاتحاد العالمي للالبان FID (13) يجرى تحضير النموذج ووزنه ثم إجراء الصوبنة ثم استخلاص المواد غير المتصبنة بالايثر لثلاث مرات بعدها يجفف بعد ترشيحه ومن ثم تفصل المواد غير المصوبنة على صفائح الطبقة الرقيقة (TLC) اذ يتم تعيين الكولسترول ومن ثم يقشط ويذاب بمذيبات عضوية ويرشح بعدها يجرى تبخير المذيبات العضوية ومن ثم يعين الكولسترول بإحدى الطرائق الكروماتوكرافية الحديثة (6، 9، 24، 25، 27). لذلك اتجهت الدراسات الحديثة الى استعمال الطرائق الكروماتوكرافية المختلفة وهي ايضاً تحتاج كميات كبيرة من النموذج واستخلاص المادة الدهنية أولا ومنً ثم عمل المشتقات (2، 3، 10، 17، 22) وهذه تتطلب خطوات صعبة ووقتا طويلا وتستهلك كميات كبيرة من المذيبات العضوية والكواشف الخطرة ، اما الطرائق الانزيمية فهي متخصصة في عملها على الكولسترول ولا توجد تداخلات مع المواد الاخرى ولا تستهلك مواد كيميائية ولا تستغرق وقتا طويلا ولا تحتاج الى اجهزة معقدة عند التقدير عدا استخدام المطياف الضوئي لذا أصبحت الطرائق الإنزيمية مهمة جدا في تقدير الكولسترول لسرعتها ودقتها العالية وفضلاً عن تخصصها (4، 5). لذا هدفت الدراسة الحالية لحواستخدام طريقة تقدير الكولسترول في الدم لتكون مناسبة لتقدير كولسترول الاغذية بالطرائق الإنزيمية مع الحرص على اختصار الزمن ودقة النتائج وقلة الكلفة.

المواد وطرائق البحث

استخدمت المواد الآتية: الهكسان، الميثانول، وهيدروكسيد البوتاسيوم وكلوريد الصوديوم المجهزة من شركة (Merk (Darmsdt,Germany وذات النقاوة العالية، إما المحاليل الإنزيمية التي احتوت على Cholesterol esterase (CE) 300 u/l, Cholesterol Oxidase (COD) 300 u/l, Peroxidase (POD) 1250 u/l) جهزت من شركة (Spinreact) الاسبانية وقد كان تركيز الكولسترول القياسي 200 ملغم/100 مل.حضر محلول الصوبنة بإذابة 14 غم هيدروكسيد البوتاسيوم في 500 مل ميثانول للحصول على (0.5M) واستعمل جهاز المطياف الضوئي طراز (ELL 1102) صيني المنشأ لقياس الامتصاصية (optical density) على طول موجة 550 نانوميتر. استعملت نماذج البيض من السوق المحلية وأجري السلق في درجة الغليان ولمدة 10 دقائق .وزن 0.2غرام من الصفار وأجريت عليها عملية الصوبنة المباشرة كما ذكرها Fletouris وجماعته (12). وضعت في انبوبة اختبار حجم 15-20 مل وأضيف لها هيدروكسيد البوتاسيوم الميثانولي (5 مل) وغلقت الأنابيب بإحكام ثم وضعت في حمام مائي في درجة حرارة 80 م لمدة 15 دقيقة تخللها عملية مزج لثلاثة مرات بعدها بردت الأنابيب بماء الحنفية وأضيف إليها 1 مل ماء مقطر و5 مل من الهكسان مع المزج لمدة 10 ثواني , ثم تركت لتركد بعدها ثم سحب 0.25 مل من طبقة الهكسان وجففت في درجة حرارة 37م وأضيف إليها 1 مل من خليط المحلول الإنزيمي وحضنت في درجة حرارة 37م لمدة 10 دقائق حتى ظهور اللون الوردي وحسب التعليمات الشركة المجهزة للانزيم SPINREACT (23) , بعدها خففت النماذج باضافة 4 مل من محلول ملحي (كلوريد الصوديوم) تركيز 2%. ثم جرى لها نبذ مركزي على 5000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق ،ثم قيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجة 550 نانوميتر، وتمت تصفير الجهاز باستعمال الماء المقطر واستعملت المعادلة الآتية لحساب تركيز الكولسترول كما موضحة أدناه.

$$\text{ملغم كولسترول / 100 غم عينة} = \frac{\text{الامتصاصية للعينة} \times \text{وزن العينمة (غم)}}{\text{الامتصاصية للمحلو القياسي} \times 0.2} \times 200$$

وبعد قياس الامتصاصية للعينة ضربت النتائج بالرقم 5 لكوننا بسبب تخفيف النموذج 5 مرات. اما المحلول القياسي للكولسترول فقد أخذ 10ميكروليتر من الكولسترول القياسي وأضيف اليه 1 مل من الخليط الانزيمي وعومل بنفس معاملة العينة اعلاه.

النتائج والمناقشة

تم اجراء تجربتين لتقدير كفاءة الطريقة المقترحة، استخدم في الطريقة الأولى محلول قياسي للكولسترول بتركيز 200 ملغم/100مل والذي عومل كمعاملة العينات اذ قدرت كمية الكولسترول لعشرين مكرر وكانت النتائج كما في الجدول (1). وبين الجدول (1) نسب الكولسترول المقدرة في نماذج الكولسترول القياسي المحضر الذي تركيزه (200ملغم/00مل) وتبين النتائج إن المتوسط الحسابي للنسب المقاسة كانت(198.9) وان قيمة اقل فرق معنوي كانت (0.56±) وتحت احتمال خطأ 5% . وفي تجربة أخرى اضيف فيها الكولسترول القياسي بالتراكيز 0، 100 ، 200، 300، 400 و 500 ملغم/100غم إلى عشرة عينات مختلفة من صفار البيض وقدرت نسبة الكولسترول فيها

،وحللت احصائياوقدر معامل التحديد (R^2) بما يساوي **0.9989** وهذا يعني إن طريقة الاستخلاص والتقدير كانتا من الكفاءة والدقة العاليتين كما يظهر ذلك الجدول(**2**).

جدول 1 :كفاءة الاستخلاص والتقدير للطريقة المطورة باستخدام الكولسترول القياسي (200ملغم/100مل).

كمية الكولسترول المقدرة (ملغم /100مل)	195 ، 196، 197 ، 197 ، 197 ، 197،197، 197 ، 197،197، 198 ، 200 ، 200 ، 201 ، 201، 202 ، 202 ، 202 ، 202 ، 203
المعدل الحسابي ($\bar{X}$)	198.9
كفاءة التقدير والاستخلاص	%99.45
الخطأ المعياري SD	±.56

جدول 2. دقة الاستخلاص والتقدير ولعشرة تراكيز مضافة من الكولسترول القياسي في صفار البيض.

نسبة الكولسترول ملغم/100غم					
صفارالبيض + صفر ملغم كولسترول	صفارالبيض +100ملغم كولسترول	صفارالبيض +200ملغم كولسترول	صفارالبيض +300ملغم كولسترول	صفارالبيض +400ملغم كولسترول	صفارالبيض +500ملغم كولسترول
1212	1315	1410	1517	1607	1715
1162	1260	1367	1460	1558	1645
1287	1389	1488	1580	1684	1780
1175	1272	1360	1480	1572	1684
1200	1395	1402	1501	1605	1703
1225	1323	1447	1533	1629	1717
1250	1348	1433	1545	1655	1775
1225	1323	1422	1523	1655	1795
1250	1348	1446	1545	1645	1756
1200	1299	1402	1505	1610	1715
*1219	*1318	*1417	*1518	*1622	*1728

* المعدل لكل عشرة مكررات وتم اجراء التحليل الاحصائي حسب المصدر(**20**) .

يستدل من كل ماتقدم ان الطريقة قيد الدراسة فيها عدد من الايجابيات مثل عدم الحاجة الى استخلاص الدهن من العينة وانما تجرى على صفار البيض مباشرة وهذا ينعكس على وقت التقدير وكمية المواد الكيميائية المستخدمة،و المدة اللازمة لاجراءها لذلك يمكن فحص عدد كبير من النماذج بسهولة مع امكانية استخدامها مع النماذج المرتفعة بنسب الكولسترول، وايضا نستنتج مما سبق ان هذه الطريقة ليس فيها تداخلات اوتفاعلات جانبية عند الاستخلاص والتقدير مقارنة الطرق القديمة فهي متخصصة في عملها على الكولسترول. وهذا يستدل عليه من نتائج التحليل الإحصائي المتمثلة بقيم ($\bar{X}$)± الانحراف القياسي (جدول**1**) وهذا يشير إلى دقة وكفاءة الطريقة المطورة قيد الدراسة وفيما يخص حجم العينة المستعمل في التحليل صغير مقارنة بالطرق الاخرى التي ذكرت.

المصادر

1- **Abdullah, Y.A. (2002). Influences of olive oil and ghee (samen balady) on serum cholesterol of Jordanians. Pakistan Journal of Nutrition ,1 (6): 270-275.**

2- **Abisake, F. (2006). Determination of cholesterol In foods by flow Injection Analysis With Peroxyoxalate Chemiluminescence . M.Sc. Thesis, University of East Tennessee State University U.S.A., p.27-34.**

3- **Al-Hasani, S.M; J. Hlavac and M.W. Carpenter (1993). Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. J. AOAC Int., 76:902–906.**

4- **Allain, C.; L.S. Poon; S.G. Chan and W. Richmond(1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin. Chem., 20(4): 470-475.**

5- **Amundson, D.M. and N.Z. Mingjie (1999). Fluorometric Method for the enzyme determination of cholesterol. J. Biochem. Biophys. Methods, 38: 43 -52.**

6- **Association of Official Analytical Chemists (1990). Cholesterol in Multicomponent Foods. Gas Chromatographic Method. Sec.,976.26 in Official Methods of Analysis. Vol. II. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.**

7- **Chamis-Pasha (2005). Cholesterol how low should we go. Saudi Med. J., 26 (1):11-18.**

8- **Demke, D.M.; G.R Peter and L.C.M. Metzler (1988). Effect of A fish oil concentrate in patients with Hypercholesterolemia. Atherosclerosis, 70:73-80.**

9- **Emkan, E.A. (1989). Soy omega-3 Converts to fish oil omega-3 in humans. Cardiovasc Rev and Reports, 10:37.**

10- **Fenton, M. (1992). Chromatographic separation of cholesterol infoods. J. Chromatogr., 624:369–388.**

11- **Gray, J. and B. Griffin (2009).Eggs and dietary cholesterol – dispelling the myth. Nutrition Bulletin, 34: 66-70.**

12- **Fletouris, D.J. ; N.A. Botsoglou; I.E. Psomas and A.I. Mantis. (1998). Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography. J. Dairy Sci., 81:2833–2840**

13- **International Dairy Federation (1992). Milk fat and milk fat products. determination of cholesterol content. IDF stand. 159. Int. Dairy fed., brussels, Belgium.**

14- **Jules, C. (2004). The role of egg, margarines and fish oils. Keio J. Med., 53(3):131-136.**

15- **Kromhout. D; E.B. Bosschieter and C.C de Lezenne (1985). The inverse relation between Consumption and 20 years mortality from Coronary heart disease. J. Med., 312:1205-1209.**

16- **Lee, A. and B. Griffin (2006). Dietary Cholesterol, Eggs and Coronary Heart disease risk in perspective. Nutrition Bulletin, 31: 21–27.**

17- **Marshall, M.W.; B.A. Clevidence; R.H. Thompson and J.T. Judd (1989). Problems in estimating amounts of food cholesterol. J. Food Compos. Anal. ,2:228–237.**

18- **McNamara, D.J. (2000). Dietary cholesterol and atherosclerosis. Biochimica and Biophysica Acta, 1529: 310-320.**

19- Nelson, D. and M.M. Cox. (2000). Lehninger Lehninger's Principle of Biochemistry, 3rd Edition, pp. 79

20- SAS version, (1986). Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC 27512- 8000, USA.

21- Sheridan, A.K.; S.M. Hamphris and P.J. Nicholis (1982). The cholesterol content of Eggs Produced by Australian egg Laying Strain. British Poult.Sci.23:569-575.

22- Shin, H.I.; T.S. Oh and E. J. Chang (2001). Determination of cholesterol in milk and dairy products by High-Performance liquid Chromatography. Asian. Aust. J. Anim. Sci., 14(10):1465-1469

23- SPINREACT (2007). S.A.U. Citra. Santa Colona,7E-17176 SANT ESTEVE DE (GI)PAIN E- mail;Spinreact@Spinreact.Com.

24- Thompson, R.H. and G.V. Merola (1993). A simplified Alternative to the AOAC Official Method for Cholesterol in Multicomponent Foods. J. AOAC., Int., 76:1057–1068.

25- Tsui, I. C. (1989). Rapid determination of total cholesterol inhomogenized milk. J. AOAC, 72:421–424.

26- Ulberth, F.; and H. Reich. (1992).Gas-Chromatographic determination of cholesterol in processed foods. Food Chem., 43:387–39

27- Zak,B.(1977).Cholesterol methodologies review.Clin.Chem.,23:1201-1212.

28- Zock, P.L. and M.B. Katan (1997). Butter: Margarine and Serum lipoproteins .Atherosclerosis. 1(131):7-16.

29- Zlakis, A.; B. Zak and A.J. Boyle (1953). A new method for the direct determination of serum cholesterol. J. Lab. Clin. Med.,41:486-489.

Iraqi J. Agric. Res. Vol.16 No.1 pp.147-153 July./2011

ENZYMATIC METHOD FOR DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN EGG YOLK

K. I. Mohamed

ABSTRACT

The enzymatic method for determination of cholesterol in blood serum was modified to be suitable for determination of Egg yolk cholesterol.EggYolk samples (0.2 g) are saponified directly (with out extraction of fat) in capped tubes with 5ml (0.5 *M)*methanolic KOH solution by heating for 15 min at 80C. After cooling with tap water,1ml of distilled water and 5ml On f hexane was added to the mixtures shaked well for 10 seconds, and the unsaponifiable fractions were extracted with 5ml hexane.The reaction was carried out by using 0.25ml of hexane layer after evaporating the hexane at 37C,mixed for 10 minute with 1ml of enzymatic kit. [cholesterol esterase(CE), cholesterol peroxidase, cholesterol oxidase(COD)] ، the concentration was determined by using spectrophotometer at 550nm after dilution 5 times with salt solution 2% and compare with standard solution at concentration 200mg/100ml. The arithmetic mean of cholesterol content for yolk were found 1219 mgm/100 ml. The precision was 0.998. The method has been successfully applied to quantitate cholesterol in a variety of yolk and its products.

College of Agric. - Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.