

OBTAINING LIPID COMPLEX FROM FOLLICULAR CHICKEN EGGS USING THE METHOD OF HEXANE PRECIPITATION

V. Bondareva, V. Mank, A. Miroshnikov
National University of Food Technologies

<p>Key words:</p> <p><i>Lipid complex</i> <i>Phospholipids</i> <i>Total lipids</i> <i>Hexane</i> <i>Chloroform</i> <i>Follicular eggs</i> <i>Thin layer chromatography</i></p> <p>Article history: Received 05.12.2014 Received in revised form 25.01.2015 Accepted 12.02.2015</p> <p>Corresponding author: V. Bondareva E-mail: npnuht@ukr.net</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>The aim of this work was to obtain the lipid extract from follicular eggs of hens using the method of hexane precipitation and to determine the total fats (TF) and phospholipids (PL) in its composition using thin layer chromatography (TLC). The process of obtaining lipid complex includes 3 stages. The first stage is the extraction of follicular eggs of hens in ethanol and receiving lipid suspension. The second step is filtration of the suspension and the resulting filtrate (lipid extract) which is divided into supernatant and precipitate. The third step of the process is the separation of supernatant and evaporation residue and their extraction with hexane. Determination of total lipids and phospholipids in the extracts obtained by flash chromatography was carried out. The findings suggest the usefulness of such biological material as follicular chicken eggs for obtaining the phospholipid complex which contains phosphatidylcholine and fosfatidiletanolamin.</p>
---	--

ОТРИМАННЯ ЛІПІДНОГО КОМПЛЕКСУ З ФОЛІКУЛЯРНИХ ЯЄЦЬ КУРЕЙ МЕТОДОМ ОСАДЖЕННЯ ГЕКСАНОМ

В.Й. Бондарєва, В.В. Манк, О.М. Мірошников
Національний університет харчових технологій

У статті описано процес отримання з фолікулярних яєць курей методом осадження гексаном ліпідного екстракту і визначення методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у його складі загальних ліпідів (ОЛ) і фосфоліпідів (ФЛ). Процес отримання ліпідного комплексу включав три стадії. Першою була стадія екстрагування фолікулярних яєць курей в етанолі й отримання ліпідної суспензії. Другою стадією була фільтрація суспензії й отримання фільтрату — ліпідного екстракту, який поділяли на надосадну рідину і осад. Третьою стадією процесу було роздільне упарювання надосадної рідини і осаду, а також їх екстракція гексаном. Визначення загальних ліпідів і фосфоліпідів в отриманих екстрактах проводилося методом тонкошарової хроматографії.

Отримані дані підтверджують доцільність використання такого біологічного матеріалу, як фолікулярні яйця курей для отримання фосфоліпідного комплексу, що містить фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін.

Ключові слова: ліпідний комплекс, фосфоліпіди, загальні ліпіди, гексан, хлороформ, фолікулярні яйця, тонкошарова хроматографія.

Постановка проблеми. Ліпіди у структурному та функціональному відношенні поділяються на нейтральні (вільні жирні кислоти та їх ефіри, моно-, ді- і триацилгліцерини, стероїди, воски, терпени) та полярні (гліцерофосфоліпіди, сфінго- та гліколіпіди, цереброзиди) [1]. Вони відіграють важливу роль у процесах життєдіяльності організмів, утворюють енергетичний резерв, використовуються організмом для створення різноманітних структур клітин, наприклад, входять до складу мембран клітин та органел [2]. Завдяки своїм властивостям ліпіди не розчиняються у воді, сприяють просторовому розділенню біохімічних процесів, що відбуваються у клітині, тому розташовуються в основному там, де біохімічні реакції мають велику інтенсивність та упорядкованість. Так, у сировотці крові міститься відносно невелика кількість ліпідів (0,6 %), тоді як мозку — 12—15 %. Велика кількість ліпідів міститься в епідермісі. Фосфоліпіди входять до складу внутрішньоклітинних тубулярних мембран, ендоплазматичного ретикулума кератиноцитів. Мітохондрії цих клітин містять близько 30 % ліпідів. Лізосоми також мають фосфоліпідну оболонку [3, 4].

Фосфоліпіди — складні ліпіди, які є фосфатзамісними ефірами різних органічних спиртів (гліцерину, сфінгозинів, діолів). Усі фосфоліпіди є полярними ліпідами та містяться у клітинних мембранах. У жирових зонах їх небагато. Вони розчинні в органічних розчинниках, але вибірково: наприклад, перші — у діетиловому ефірі, другі — в етанолі, треті — у бензолі. Більшість фосфоліпідів розчинна в ацетоні, що дозволяє відокремити їх від інших ліпідів.

Основні фракції фосфоліпідів містять фосфатидилхолін (власне, лецитин), фосфатидилетаноламін, який називають також цефаліном, фосфатидилсерин і фосфатидилінозит. У медицині [5], харчовій [6] і косметичній промисловості [7, 8] використовують соєві та ячні фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін. Високий попит має соєвий лецитин [9] завдяки низькій комерційній ціні. Однак його біологічні властивості значно нижчі, ніж у лецитині, отриманому з курячих яєць, який має високі біологічно-активні властивості, але є дорогим продуктом через джерело свого отримання. Крім того, відділення білкової оболонки, що безпосередньо оточує жовток курячих яєць, технологічно ускладнює обробку біологічного матеріалу.

У літературних джерелах [10, 11] наведено приклади отримання фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну зі сформованих курячих яєць.

До того ж, відсутність білкової оболонки у фолікулярних яйцях значно полегшує процес попередньої підготовки сировини при проведенні процесу екстракції для отримання фосфоліпідів.

Таким чином, якісний склад фосфоліпідів, низька комерційна ціна та відсутність білкової оболонки у фолікулярних яйцях підтверджують доцільність використання цього біологічного матеріалу у різних галузях. Згідно з літера-

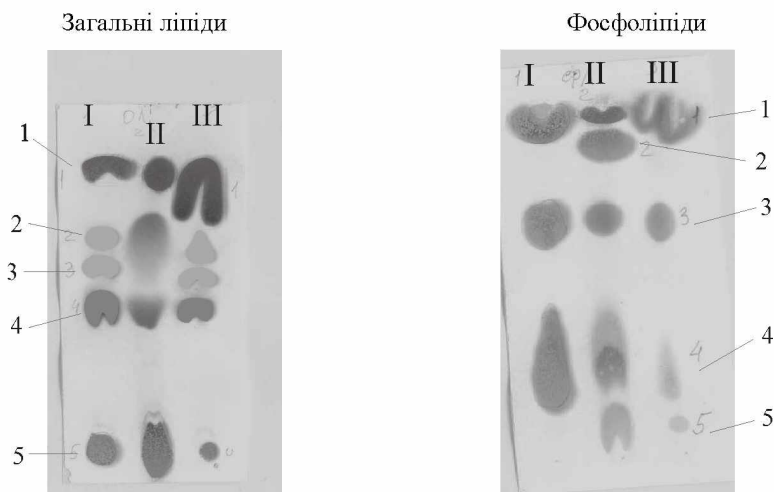
турними даними, до цього часу фолікулярні яйця курей не використовувались як джерело отримання комплексу фосфоліпідів.

Мета дослідження полягала в тому, щоб отримати фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін з фолікулярних яєць курей і підтвердити, що цей комплекс фосфоліпідів отримується як з фолікулярних, так і зі сформованих курячих яєць.

Виклад основного матеріалу. Для отримання фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну проводили екстракцію спиртового розчину фолікулярних яєць курей гексаном і визначали наявність цих фосфоліпідів методом тонкошарової хроматографії [12].

Весь процес отримання ліпідного комплексу поділяється на три стадії. Першою є екстрагування фолікулярних яєць курей в етанолі (1:10). Термін екстракції триває три години, внаслідок чого отримано суспензію жовтків у спирті.

Другою стадією є фільтрація суспензії й отримання фільтрату — ліпідного екстракту, який залишали на 12 год при температурі +9 °С. У результаті відбувалося розділення екстракту на надосадну рідину й осад концентрованого жовтого кольору та в'язкої консистенції.



1 — ефіри холестерину та метилові ефіри;
2 — жирних кислот;
3 — вільні жирні кислоти;
4 — тригліцериди;
5 — холестерин.

1 — нейтральні ліпіди;
2 — дифосфатидилгліцерин;
3 — фосфатидилетаноламін;
4 — фосфатидилхолін;
5 — суміш фосфатидилсерину, сфінгомієліну, фосфатидилінозитулу, лізофосфатидилхоліну.

Рис. 1. Одномірна ТШХ загальних ліпідів і фосфоліпідів, екстрагованих з ліпідного розчину фолікулярних яєць курей у системах розчинників I та II

Третьою стадією процесу є роздільне упарювання надосадної рідини й осаду, їх екстракція гексаном у співвідношенні 1:3 та отримання чотирьох фракцій: двох гексанових фракцій надосадної рідини (1) й осаду (1a) та двох спиртових фракцій надосадної рідини (2) й осаду (2a). У зв'язку з тим, що всі фосфоліпіди

гексаном переводяться у відповідну фракцію, а у спиртовій частині залишаються такі «мінорні» речовини, як білки, каротиноїди, вільні жирні кислоти тощо подальше дослідження проводилось лише з надосадною рідиною гексанової фракції (1) та з осадом гексанової фракції (2а), які упарювали до сухого стану, внаслідок чого утворювався ліпідний екстракт фолікулярних яєць курей.

Визначення складу загальних ліпідів і фосфоліпідів в отриманому ліпідному екстракті проведено методом тонкошарової хроматографії. Для цього готувався 1-відсотковий розчин у хлороформі з сухих ліпідних екстрактів надосадної рідини й осаду. Отриманий розчин у кількості 20 мкл наносився на тонкий шар силікагелю на поверхні пластин Silufol для визначення фосфоліпідів і загальних ліпідів (точка № I — надосадна рідина, точка № III — осад, точка № II — контрольна речовина кальмофіл) (рис. 1).

Відповідні розчини ліпідного екстракту наносили на пластини, їх розташовували у хроматографічних камерах з відповідними системами I та II. Система I — бензол: етилацетат: оцтова кислота у співвідношенні 85:15:1; система II — хлороформ: метанол: вода у співвідношенні 65:25:4. Після цього починався розгін загальної фракції ліпідів і фосфоліпідів. Фронт розчинників підіймався по пластині під дією капілярних сил, захоплюючи сполуки, які містились в екстракті. Після досягнення розчинниками верхнього краю пластини, їх висушували, а сполуки, які аналізували, проявляли за допомогою суміші сульфатна кислота:метанол (50:50) та ідентифікували речовини, які були наявні у зразку.

Висновки

При визначенні фосфоліпідів методом тонкошарової хроматографії, отриманих після екстракції спиртового розчину фолікулярних яєць курей неполярним розчинником гексаном, встановлено, що в надосадну рідину гексанової фракції (точка 1) були переведені у значній кількості нейтральні ліпіди, фосфатидилетаноламін і фосфатидилхолін. В осаді кількість цих речовин незначна (точка 3).

При проведенні тонкошарової хроматографії на визначення загальних ліпідів у надосадній рідині наявність ефірів холестерину та метилових ефірів жирних кислот (1) значно нижча, ніж у осаді, що свідчить про ефективність запропонованого методу екстракції. Вільні жирні кислоти (2), тригліцериди (3) й холестерин (4) знаходяться у надосадній рідині та в осаді у рівних співвідношеннях.

Отже, з фолікулярних яєць курей запропонованим методом екстракції гексаном було отримано комплекс фосфоліпідів: (фосфатидилетаноламін і фосфатидилхолін), що може бути використаний для створення ліпосомальних форм, які застосовуються у косметичній, харчовій промисловості та медицині.

Література

1. Скатков С.А. Фосфолипиды и их значение в организме человека / С.А. Скатков // Фарматека. — 2001. — № 7. — С. 26—30.
2. Антонов В.Ф. Липидные мембраны при фазовых превращениях / В.Ф. Антонов, Е.Ю. Смирнова, Е.В. Шевченко. — М.: Наука, 1992. — 136 с.
3. Якубе Х.Д. Аминокислоты, пептиды и белки / Х.Д. Якубе, Х.М. Ешкайт. — М.: Мир, 1985. — 213с.

4. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснополяская, В.И. Швец. — М.: Наука, 1991. — 158 с.
5. Грегориадис Г. Липосомы как носители лекарств / Г. Грегориадис. — М.: Медицина, 1983. — С. 36—93.
6. Красильников В.Н. Липосомы в пищевой промышленности: перспективы использования / В.Н. Красильников, А.И. Несмелов // Пищевая промышленность. — 1999. — № 12. — С. 46.
7. Применение лецитина в косметике // Lucas Meyer. — 1998. — № 9. — С. 3—15.
8. Швец В.И. От липосом семидесятых к нанобиологии XXI века / В.И. Швец, А.П. Каплун, Ю.М. Краснополяский // Российские нанотехнологии. — 2008. — Т.3, № 11. — С. 6—20.
9. Материалы X Всероссийской научно-практической конференции «Растительные лецитины: производство, использование, стандартизация» // Санкт-Петербург, 2009. — 65 с.
10. Арчинова Т.Ю. Изучение состава и анализ яичного лецитина химическими и физико-химическими методами / Т.Ю. Арчинова, Т.Ю. Манджигладзе // Современные проблемы науки и образования. — 2013. — № 2.
11. Патент 2058787, МПК А61К31/685, А61К35/54 Способ получения лецитина из желтков куриных яиц / Швец В. И. [RU]; Сенникова И.Г. [UA]; Орлова Г.Л. [UA]; Темиров Ю.П. [UA]; Петров В.И. [UA]; Иванова Н.Н. [UA]; Краснополяский Ю.М.[UA]; Харьковское предприятие по производству иммунобиологических и лекарственных препаратов «Биолек». — заявки № 5034766/14; дата подачи заявки 30.03.1992; дата публикации 27.04.1996.
12. Молочкина Е.М. Количественное определение состава фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии / Е.М. Молочкина // Исследование синтетических и природных фосфолипидов *in vitro* и *in vivo*. — М.: Наука, 1992. — С. 100—109.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПИДНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ЯИЦ КУР МЕТОДОМ ОСАЖДЕНИЯ ГЕКСАНОМ

В.И. Бондарева, В.В. Манк, О.Н. Мирошников
Национальный университет пищевых технологий

В статье описан процесс получения из фолликулярных яиц кур методом осаждения гексаном липидного экстракта и определение методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в его составе общих липидов (ОЛ) и фосфолипидов (ФЛ). Процесс получения липидного комплекса включал три стадии. Первой являлась стадия экстрагирования фолликулярных яиц кур в этаноле и получение липидной суспензии. Второй стадией являлась фильтрация суспензии и получение фильтрата — липидного экстракта, который разделяли на надосадочную жидкость и осадок. Третьей стадией процесса являлось раздельное упаривание надосадоч-

ной жидкости и осадка, а также их экстракция гексаном. Определение общих липидов и фосфолипидов в полученных экстрактах проводилось методом тонкослойной хроматографии. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования такого биологического материала, как фолликулярные яйца кур для получения фосфолипидного комплекса, содержащего фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин.

Ключевые слова: липидный комплекс, фосфолипиды, общие липиды, гексан, хлороформ, фолликулярные яйца, тонкослойная хроматография.