

# **Determinazione rapida del colesterolo libero e legato nelle uova dopo separazione della frazione lipidica libera non polare**

D. NAVIGLIO, R. ROMANO, L. SCHIAVO, F. DE GAETANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

A. BATTAGLIA, M. UGLIANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II" - MATER SOC. CONS. A R.L.

In questo lavoro viene proposta una metodica analitica rapida che consente di isolare la frazione lipidica libera non polare del grasso del tuorlo di uovo e di determinarne il contenuto di colesterolo libero e legato. Il metodo ufficiale di analisi prevede, per la determinazione del colesterolo, la saponificazione del grasso con KOH 2N in metanolo e successiva estrazione dell'insaponificabile con etere etilico [1]; dopo la separazione per cromatografia su strato sottile dell'insaponificabile, la frazione sterolica viene isolata per l'analisi successiva che è effettuata o per via gravimetrica, come digitonidi, oppure per via gascromatografica, come silileteri [2,3]. La procedura ufficiale risulta lunga e tediosa ed inoltre non fornisce alcuna indicazione circa il contenuto di colesterolo legato.

Come alternativa viene proposta l'estrazione della frazione lipidica libera apolare del grasso del tuorlo di uovo utilizzando acido tricloroacetico e n-esano. L'analisi del colesterolo libero viene effettuata per via gascromatografica sul grasso estratto tal quale mediante aggiunta di squalene come standard interno. Questa stessa soluzione viene transesterificata con sodio pentossido 2N ed è analizzata nelle stesse condizioni al fine di ottenere la quantità di colesterolo totale presente nell'uovo. Dalla differenza tra la seconda determinazione e la prima è possibile risalire alla quantità di colesterolo legato sotto forma di sterilestere di acidi grassi. La procedura proposta consente di isolare la frazione lipidica libera non polare, costituita prevalentemente da trigliceridi, steroli, esteri degli steroli, cere ed altri componenti liposolubili dalla componente polare del grasso del tuorlo, costituita da fosfolipidi, glicolipidi etc. L'accuratezza della metodica è stata valutata confrontando il valore di colesterolo ottenuto analizzando, per via diretta, il grasso estratto con una miscela cloroformio-metanolo 2:1 [1] con il valore di colesterolo ottenuto dall'analisi della frazione apolare.

Venti uova, acquistate sul mercato locale, di categoria A e di peso compreso tra 55 e 80 grammi, sono state analizzate in termini di contenuto di colesterolo. È stato riscontrato che il quantitativo di colesterolo totale contenuto nelle uova oscilla tra 140 e 210 mg/uovo (valore medio 175 mg/uovo) contro i 250 mg/uovo riportati in letteratura. La differenza tra il contenuto di colesterolo prima e dopo transesterificazione ha evidenziato che il contenuto di colesterolo presente come sterilestere nel grasso è trascurabile. Infine, nelle uova analizzate, è stato evidenziato che il grasso del tuorlo è costituito prevalentemente dalla frazione apolare che raggiunge il 75% in peso.

## **RAPID DETERMINATION OF FREE AND BONDED CHOLESTEROL IN EGGS AFTER SEPARATION OF THE FREE NON-POLAR LIPIDIC FRACTION**

*A rapid method for the separation of free non-polar lipidic fraction and evaluation of bonded and free cholesterol in chicken eggs is shown in this paper. The official method suggests, for the determination of cholesterol, the saponification of fat with methanolic KOH 2N, followed by extraction of unsaponifiable with diethyl ether [1]; after TLC purification of unsaponifiable fraction, sterols are quantified as digitonides in the gravimetric analysis or as silylethers in the gaschromatographic analysis [2,3]. This method is time consuming and tedious and it does not give any information about bonded cholesterol content.*

*As an alternative method, the extraction of free non-polar lipidic fraction of yolk egg with trichloroacetic acid (TCA) and n-hexane is proposed. Cholesterol analysis is performed by using gaschromatography on the lipidic fraction after the addition of squalene as internal standard. This solution is subsequently transesterified with pentanolic sodium pentanoate 2N and analyzed by gaschromatography under the same conditions as already mentioned, in order to obtain total cholesterol content in egg. The difference between the second and the first determination gives the amount of bonded cholesterol as fatty acid steryl ester. The proposed procedure allows the isolation of the free non polar lipidic fraction consisting prevalently of triglycerides, sterols, wax esters, sterol esters and other soluble lipidic components, from the polar component of egg yolk fat, which in turn consists of phospholipides, glycolipides etc.*

*The accuracy of this method was evaluated by comparing the cholesterol values obtained from the proposed method and the cholesterol content obtained by the direct analysis of fat extracted using chloroform-methanol (2:1) [1].*

*The cholesterol content of 20, A category, eggs was determined; the eggs weighed between 55-80 g and were purchased at the local market. Cholesterol content in eggs was found to be between 140 and 210 mg (average value 175 mg/egg) instead of 250 mg/egg reported in literature. The difference between before and after transesterification showed that the cholesterol content as steryl ester in fat egg is negligible. Moreover, we found that in the analyzed eggs, yolk fat is represented mostly by a non polar fraction, which is about 75% of the total.*

## INTRODUZIONE

L'uovo di gallina costituisce uno degli alimenti naturali più completi in quanto in esso sono rappresentate le categorie di nutrienti più importanti per l'alimentazione umana: proteine, prevalentemente nell'albume, grassi prevalentemente nel tuorlo, vitamine e sali minerali. Per avere una idea della produzione, basti considerare che nel 1999 la produzione nazionale è stata di circa 13 miliardi di uova e il consumo pro-capite nello stesso anno ha raggiunto le 224 uova; di queste, solo la terza parte è stata consumata tal quale mentre la parte rimanente è entrata nella dieta degli italiani in prodotti come pasta, gelati, dolci, salse ed altre preparazioni industriali ed artigianali. Per quanto riguarda la produzione mondiale, nell'anno 1999, ha raggiunto i 736 miliardi di pezzi; per gli anni a venire è previsto un ulteriore incremento della produzione delle uova poichè esse sono sempre più richieste dalle pasticcerie e dalle industrie alimentari in genere, per la fabbricazione di una grande quantità di prodotti finiti: biscotti, creme, maionese, paste speciali etc.

A causa dell'alto contenuto di colesterolo stimato a partire dal 1976, la società americana per la tutela della salute (American Heart Association's Nutrition Committee), consigliava un consumo settimanale di uova che non superasse le tre unità. In seguito agli ultimi ritrovamenti di ricercatori del Dipartimento dell'Agricoltura americano, i quali hanno scoperto che il contenuto di colesterolo dell'uovo non sarebbe 274 mg, bensì 213 mg [4], la società suddetta ha portato a 4 uova per settimana tale limite.

La conoscenza della quantità di colesterolo presente nelle uova riveste una grande importanza di carattere nutrizionale per l'alimentazione umana, in quanto questo sterolo, presente nei grassi animali, è il maggiore responsabile della formazione di placche nelle arterie che, ostacolando il flusso sanguigno, portano all'aterosclerosi; per tale motivo, il suo livello nel sangue deve essere tenuto sotto controllo. Recenti sperimentazioni hanno evidenziato un contenuto di colesterolo, circa 200-220 mg/uovo, più basso di quello riportato in letteratura [5]. Altri autori trovano un contenuto di colesterolo addirittura ancora più basso che arriva a 160 mg per uovo [6].

L'obiettivo del presente lavoro è quello di mettere a punto una procedura analitica semplice, rapida ed allo stesso tempo accurata che possa diventare un metodo di riferimento universale per la determinazione del contenuto di colesterolo libero ed esterificato con acidi grassi nelle uova al fine di razionalizzare i diversi risultati ottenuti.

## MATERIALI E METODI

**Materiale occorrente:** etere dietilico (Fluka, Buchs, Switzerland), cloroformio (Fluka, Buchs, Switzerland), metanolo (Carlo Erba, Milano, Italia), acido tricloroacetico (Carlo Erba, Milano, Italia) n-esano (Fluka, Buchs, Switzerland), n-pentano (Fluka, Buchs, Switzerland), 1-pentanololo (Fluka, Buchs, Switzerland), sodio metallico (Fluka, Buchs, Switzerland), colesterolo (Fluka, Buchs, Switzerland), squalene (Fluka, Buchs, Switzerland); tutti i reattivi sono di un grado di purezza analitico; centrifuga da banco mod. PK 131 (ALC International, Milano, Italia), evaporatore rotante, azoto in bombola.

## STRUMENTAZIONE

Gas cromatografo Autosystem XL (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) equipaggiato con iniettore PSS e rivelatore FID e collegato al sistema di acquisizione dei dati Turbochrom versione 4.1.

Gas cromatografo DANI 8521-a (DANI, Monza, Italia)

equipaggiato con iniettore PTV e rivelatore FID e collegato con un integratore HP mod. 8890 A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

## CAMPIONI

Le uova utilizzate per la sperimentazione sono state reperite in commercio in modo casuale; il loro peso è stato compreso tra 55 ed 80 grammi, intervallo in cui le uova sono di taglia media (M), grande (L) e più che grande (XL); tutte le uova analizzate sono appartenenti alla categoria A; di esse, inoltre, è nota la data di deposizione. Le uova sono state differenziate in base al peso totale, peso dell'albume, peso del tuorlo e peso del guscio (tabella I).

**Tabella I - Classificazione delle uova analizzate in base ai dati ponderali del peso intero tuorlo, albume, e guscio e percentuali in peso di tuorlo, albume e guscio**

Campione	Uovo (g)	Tuorlo (g)	Albume (g)	Guscio (g)	Tuorlo (%)	Albume (%)	Guscio (%)
1	78,92	18,48	51,54	8,90	23,4	65,3	11,3
2	73,78	17,05	46,53	10,20	23,1	63,1	13,8
3	73,03	19,30	45,18	8,55	26,4	61,9	11,7
4	61,00	19,16	34,82	7,02	31,4	57,1	11,5
5	57,76	14,24	36,35	7,17	24,7	62,9	12,4
6	64,91	17,88	39,76	7,27	27,5	61,3	11,2
7	69,61	17,68	44,16	7,77	25,4	63,4	11,2
8	63,51	16,80	39,71	7,00	26,5	62,5	11,0
9	67,88	18,22	42,44	7,22	26,8	62,6	10,6
10	73,44	17,89	47,17	8,38	24,4	64,2	11,4
11	69,22	17,05	44,76	7,41	24,6	64,7	10,7
12	70,78	17,99	44,89	7,90	25,4	63,4	11,2
13	55,25	13,45	34,47	7,33	24,3	62,4	13,3
14	59,39	17,23	34,84	7,32	29,0	58,7	12,3
15	69,24	17,48	43,17	8,59	25,2	62,4	12,4
16	66,29	13,74	43,90	8,65	20,7	66,3	13,0
17	61,21	15,09	38,13	7,99	24,7	62,3	13,0
18	63,19	17,10	37,87	8,22	27,1	59,9	13,0
19	65,20	16,82	40,83	7,55	25,8	62,6	11,6
20	62,07	15,69	38,58	7,80	25,3	62,1	12,6

## ESTRAZIONE DEL GRASSO

*Estrazione della componente lipidica totale mediante soluzione di cloroformio e metanolo 2:1*

**Procedura:** pesare l'uovo in analisi alla bilancia tecnica ed annotarne il peso (P); separare accuratamente il tuorlo dall'albume, pesare il tuorlo ed annotare il peso (T). Porre il tuorlo in un contenitore per centrifuga da 50 mL. Aggiungere 18 mL della soluzione estraente cloroformio-metanolo e dopo vigorosa agitazione centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti. Allontanare la parte sottostante con l'ausilio di una pipetta Pasteur e trasferirla in un pallone tarato; aggiungere altri 18 mL di soluzione cloroformio-metanolo nel contenitore da centrifuga. Dopo centrifugazione, trasferire il liquido sottostante nel pallone tarato;

infine, aggiungere 10 mL di soluzione estraente. Centrifugare a 5000 rpm e recuperare il liquido sottostante; aggiungere alle frazioni recuperate precedentemente nel pallone tarato. Eliminare il solvente dalla soluzione contenuta nel pallone tarato con l'ausilio di un evaporatore rotante e allontanare le ultime tracce insufflando azoto. Pesare il pallone e, dalla differenza con la tara, risalire alla quantità di grasso estratto (G). Il contenuto di grasso nell'uovo e nel tuorlo espressi in percentuale è data dalle seguenti espressioni:

$$\text{Grasso nell'uovo (\%)} = \frac{G \cdot 100}{P}$$

$$\text{Grasso nel tuorlo (\%)} = \frac{G \cdot 100}{T}$$

dove:

G = peso del grasso estratto (g);

T = peso del tuorlo (g);

P = peso dell'uovo intero (g).

#### *Determinazione quantitativa della frazione lipidica libera non polare (FLLNP) contenuta nell'uovo*

**Procedura:** pesare l'uovo in analisi alla bilancia ed annotarne il peso (P); separare accuratamente il tuorlo dall'albume e pesarlo alla bilancia tecnica; annotarne il peso (T). Trasferire il tuorlo in un tubo da centrifuga da 50 mL ed aggiungere 15 mL di acido tricloroacetico al 12 % (p/v); agitare al vortex per due minuti; aggiungere 10 mL di n-esano ed agitare vigorosamente per tre minuti; centrifugare a 8000 rpm per 5 minuti; separare la fase esanica surnatante e trasferirla in un imbuto separatore da 50 mL; ripetere l'estrazione con altre due frazioni di n-esano e raccoglierle nell'imbuto separatore; lavare la frazione esanica separata con due frazioni da 10 mL di acqua distillata; trasferire la frazione esanica in un pallone tarato e portare a secco tramite evaporatore rotante; allontanare le ultime tracce di solvente mediante azoto; pesare alla bilancia tecnica e, dalla differenza del peso ottenuto rispetto alla tara, risalire al peso del quantitativo di grasso estratto (L).

#### *Calcolo*

$$\text{FLLNP sul tuorlo (\%)} = \frac{L \cdot 100}{T}$$

$$\text{FLLNP sull'uovo (\%)} = \frac{L \cdot 100}{P}$$

dove:

L = peso della frazione lipidica non polare (g);

T = peso del tuorlo (g);

P = peso dell'uovo intero (g).

### **ANALISI DELLA COMPONENTE GRASSA**

#### *Analisi dei trigliceridi*

##### Condizioni gascromatografiche

- ◆ Colonna: fase stazionaria 65% fenil metilsilicone HT (TG), RTX 65-TG (Restek, Bellefonte, CA, USA); l=30 m; i.d.=0,25 mm; f.t. = 0,25 μ
- ◆ Programmata iniettore: 70 °C per 12 sec, incremento di 999 °C/min fino a 370 °C, tenere per 5 min.
- ◆ Programmata camera: 220 °C per 2 min., incremento di 5 °C/min. fino a 360 °C, tenere per 5 min.
- ◆ Temperatura del rivelatore: 370 °C.

◆ Flusso: 1,5 mL/min.

◆ Split: 1:80

È stato utilizzato il sistema di azzeramento della deriva (Background) dovuta all'aumento della temperatura, calibrando con tre acquisizioni della linea di base del segnale al fine di permettere una migliore integrazione dei trigliceridi.

**Procedura:** pesare circa 50 mg di grasso in una provetta ed aggiungere 1 mL di n-esano; agitare fino alla completa dissoluzione del grasso; iniettare 0,5 μL della soluzione nel gascromatografo. Integrare i trigliceridi raggruppati per numero totale di atomi di carbonio uguale.

#### *Analisi degli acidi grassi*

##### Condizioni gascromatografiche

- ◆ Colonna: fase stazionaria 90% bis-cianopropil fenilsilicone FAME (Restek, Bellefonte, CA, USA); l=50 m; i.d.=0,25 mm; f.t.=0,25 μ
- ◆ Programmata iniettore: 50 °C per 15 sec., incremento di 999 °C/min. fino a 270 °C tenere per 3 min.
- ◆ Programmata camera: 70 °C per 2 min; incremento 8 °C/min. fino a 250 °C, tenere per 3 min.
- ◆ Temperatura del rivelatore: 270 °C.
- ◆ Flusso 2 mL/min.
- ◆ Split: 1:80.

**Procedura:** pesare circa 50 mg di grasso in una provetta da centrifuga; aggiungere 1 mL di n-pentano ed agitare fino a completa dissoluzione del grasso; aggiungere 200 μL di pentossido di sodio 2 N in pentanolo ed agitare per due minuti; aggiungere 400 μL di acido cloridrico 1 N ed agitare per trenta secondi; centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto; iniettare 0,5 μL della fase organica superiore.

### **ANALISI DEL COLESTEROLO LIBERO E LEGATO**

#### Preparazione della retta di calibrazione per il colesterolo libero

Pesare accuratamente 300 mg di squalene (SI) in un matraccio da 100 mL, sciogliere in una quantità minima di etere etilico e portare a volume. Pesare accuratamente in tre matracci da 10 mL, 15, 30 e 45 mg rispettivamente di colesterolo e portare a volume con la soluzione eterea dello standard interno. Le soluzioni così ottenute avranno la concentrazione di 1500, 3000 e 4500 mg/L. Iniettare 0,5 μL di ciascuna soluzione nel gas cromatografo. Riportare in grafico i rapporti tra l'area del colesterolo e quella dello squalene (Ri) ottenuti per le tre soluzioni in funzione delle rispettive concentrazioni di colesterolo.

I punti sperimentali ottenuti nelle nostre condizioni analitiche sono stati interpolati dalla funzione:  $R=0,000242 \cdot C$ , dove R rappresenta il valore del rapporto tra l'area del colesterolo e quella dello standard interno e C la concentrazione del colesterolo.

#### Preparazione della retta di calibrazione per il colesterolo legato

Sottoporre a transesterificazione, secondo la procedura riportata in "materiale e metodi" per l'analisi degli acidi grassi, le soluzioni preparate come nel paragrafo prece-

**Tabella II - Precisione ed accuratezza per il recupero della frazione lipidica libera non polare**

Campione	Estrazione con CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH 2:1	Campione	Estrazione con TCA e n-esano	Δ	Frazione polare separata con TLC
1	36,1 %	1	27,7 %	8,4	8,5
2	36,3 %	2	28,0 %	8,3	8,4
3	36,0 %	3	27,9 %	8,1	8,5
4	35,9 %	4	27,8 %	8,1	8,2
5	36,0 %	5	27,9 %	8,1	8,1
Media	36,1 %	Media	27,9 %	8,2	8,3
Scarto max %	0,5	Scarto max %	0,7	2,4	2,4

**Tabella III - Pesì della componente lipidica libera non polare del tuorlo e normalizzazione rispetto al tuorlo (%). Valori della costante K, del contenuto di colesterolo per uovo, normalizzazione del colesterolo rispetto alla frazione lipidica libera non polare e rispetto al tuorlo**

Campione	Fraz. non polare (g)	Fraz. non polare (%)	K	Col/uovo (mg)	Col/grasso (mg/g)	Col/tuorlo (mg/g)
1	5,17	28,0	1,19	168	32,5	9,1
2	5,38	31,6	1,37	169	31,4	9,9
3	5,19	26,9	1,02	174	33,5	9,0
4	5,35	27,9	0,89	193	36,1	10,1
5	3,85	27,0	1,10	126	32,7	8,8
6	5,19	29,0	1,05	169	32,6	9,5
7	4,94	27,9	1,10	178	36,0	10,1
8	4,70	28,0	1,06	158	33,6	9,4
9	4,95	27,2	1,01	155	31,3	8,5
10	4,95	27,7	1,14	159	32,1	8,9
11	4,70	27,6	1,12	149	31,7	8,7
12	5,20	28,9	1,14	148	28,5	8,2
13	3,77	28,0	1,15	140	37,1	10,4
14	4,95	28,7	0,99	150	30,3	8,7
15	4,95	28,3	1,12	151	30,5	8,6
16	3,99	29,0	1,40	130	32,6	9,5
17	4,24	28,1	1,14	145	34,2	9,6
18	5,13	30,0	1,11	150	29,2	8,8
19	5,00	30,0	1,16	166	33,2	10,0
20	4,30	27,4	1,08	156	36,2	9,9

Analisi del campione di grasso proveniente dall'estrazione con TCA e n-esano in termini di colesterolo libero

Pesare accuratamente alla bilancia analitica circa 50 mg (l) della frazione lipidica apolare (L) estratta dal tuorlo di uovo. Aggiungere 1 mL esatto della soluzione di standard interno 3000 ppm ed iniettare 0,5 μL della soluzione risultante nel gascromatografo. Registrare il rapporto tra l'area del colesterolo e quella dello squalene. Dalla retta di calibrazione del colesterolo libero risalire alla concentrazione del colesterolo nella soluzione del grasso.

Calcolo

$$\text{Colesterolo libero (mg/uovo)} = \frac{C \cdot V \cdot L}{I}$$

dove:

C = concentrazione del colesterolo nella soluzione del grasso (mg/L);

V = volume di soluzione dello standard interno (mL);

L = peso della frazione apolare estratta dal tuorlo di uovo (g);

I = peso del grasso prelevato per l'analisi gascromatografica (mg).

Analisi del campione di grasso proveniente dall'estrazione con TCA e n-esano in termini di colesterolo legato

Sottoporre la soluzione di grasso preparata al punto precedente alla reazione di transesterificazione ed iniettare 0,5 μL di supernante nel gascromatografo. Procedere al calcolo come sopra riportato per ottenere il contenuto di colesterolo totale.

Calcolo

$$\text{Colesterolo legato} = \text{Colesterolo totale} - \text{Colesterolo libero}$$

Analisi del campione di grasso proveniente dall'estrazione con cloroformio e metanolo

Sul grasso portato a secco avente peso (G) proveniente dalla estrazione con cloroformio e metanolo 2:1 aggiungere una quantità di solvente della stessa miscela e contenente 3000 mg/L di squalene come standard interno in modo da ottenere una soluzione al 5% p/v. Iniettare 0,5 μL della soluzione risultante nel gascromatografo e registrare il rapporto tra l'area del colesterolo e quella dello squalene. Dalla retta di calibrazione per il colesterolo libero risalire alla concentrazione del colesterolo nella soluzione del grasso.

dente ed iniettare 0,5 μL della fase organica surnatante nel gascromatografo mantenendo invariate le condizioni gascromatografiche. Riportare in grafico i rapporti tra l'area del colesterolo e quella dello squalene (Ri) ottenuti per le tre soluzioni in funzione delle rispettive concentrazioni di colesterolo.

I punti sperimentali ottenuti nelle nostre condizioni analitiche sono stati interpolati dalla funzione:  $R=0,000254 \cdot C$ , dove R rappresenta il valore del rapporto tra l'area del colesterolo e quella dello standard interno e C la concentrazione del colesterolo.

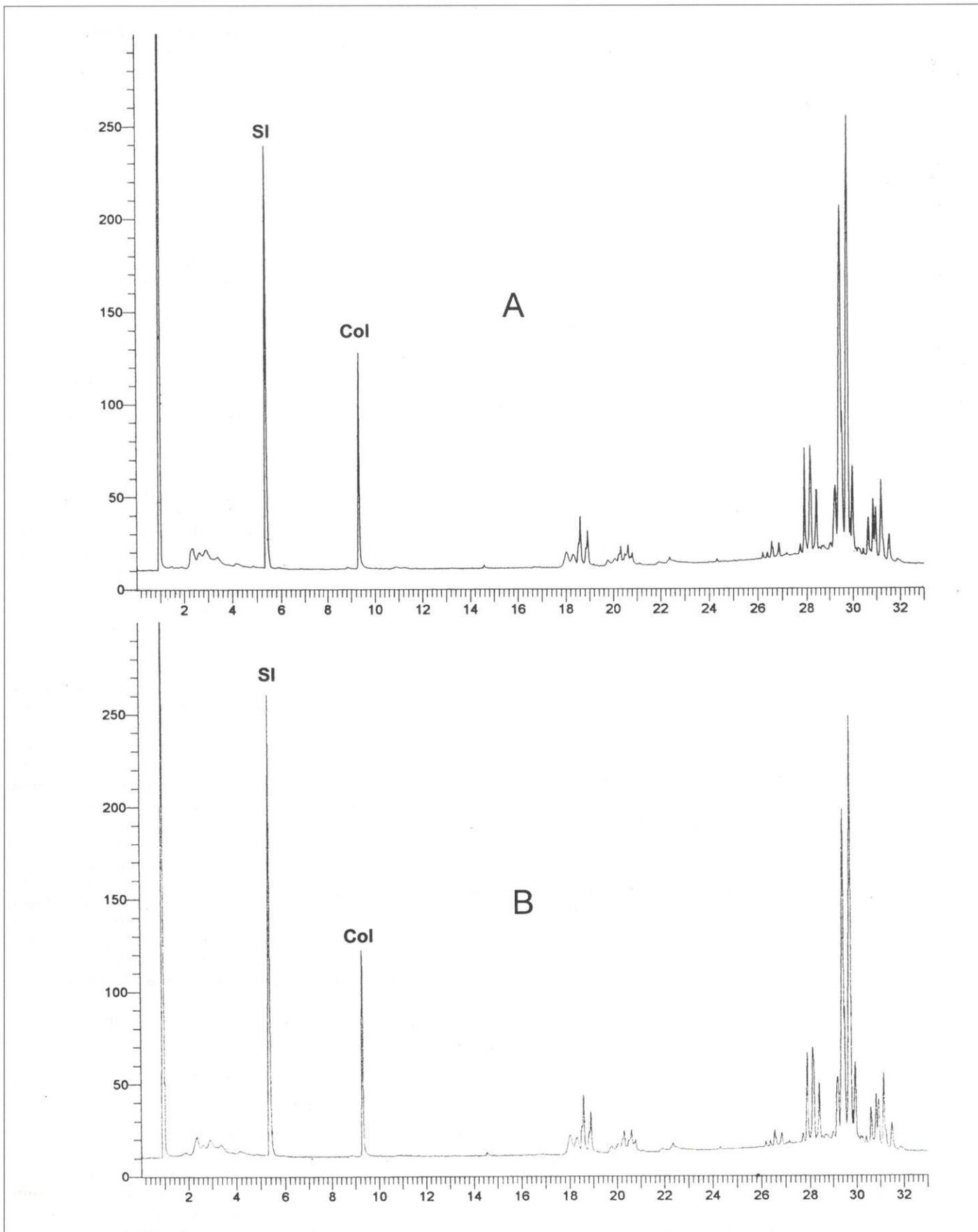
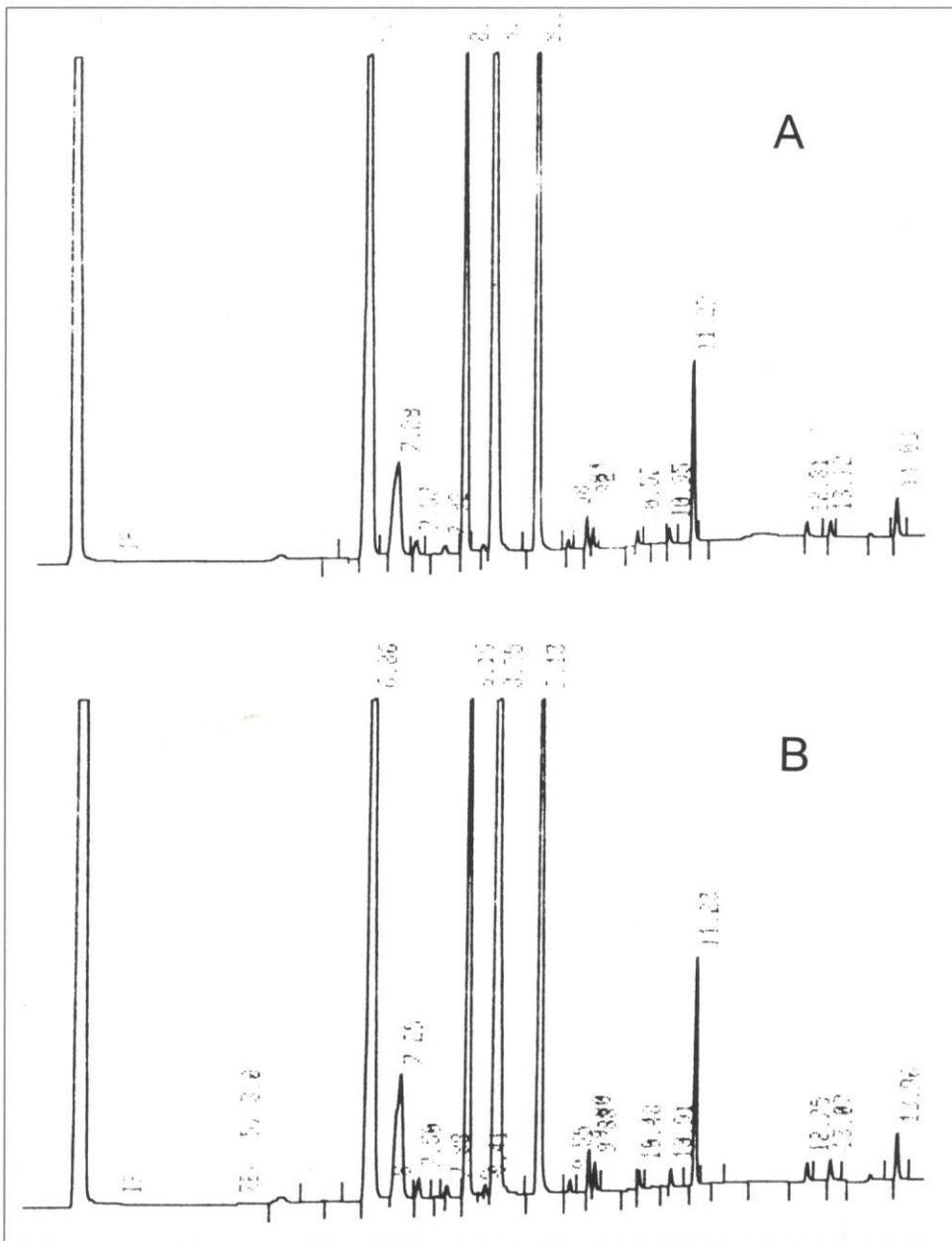


Fig. 1 - Gascromatogramma dei trigliceridi del tuorlo di uovo ottenuti dall'analisi del grasso estratto con cloroformio e metanolo 2:1 (A) e dall'analisi della frazione lipidica libera non polare (B). Sono evidenziati i picchi del colesterolo e dello squalene (SI).



**Fig. 2 - Gascromatogrammi degli acidi grassi pentilesteri, ottenuti sottoponendo a transesterificazione con pentanolo il grasso estratto con cloroformio e metanolo 2:1 (A) e la frazione lipidica libera non polare (B).**

#### Calcolo

$$\text{Colesterolo (mg/uovo)} = C \cdot V$$

dove:

C = concentrazione del colesterolo nella soluzione del grasso (mg/L);

V = volume finale della soluzione al 5% p/v.

#### Analisi della concentrazione del colesterolo nella componente trigliceridica totale

Integrare l'area del colesterolo (A) e quella dei trigliceridi raggruppati per famiglie comprendenti composti a numero di atomi di carbonio uguali (Bx). Calcolare il percento del contenuto di colesterolo mediante la seguente formula:

$$\text{Colesterolo (\%)} = \frac{A \cdot 100}{\sum (Bx)}$$

dove:

A = area del colesterolo;

Bx = area della famiglia x di trigliceridi.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Estrazione della frazione lipidica libera non polare

Dieci tuorli di uova pesate e catalogate sono stati mescolati ed analizzati utilizzando l'estrazione con una miscela di cloroformio e metanolo 2:1 e parallelamente con la procedura proposta che impiega acido tricloroacetico e n-esano. In tabella II sono riportati i valori del grasso estratto con le due procedure ripetute cinque volte e normalizzati rispetto al tuorlo. La riproducibilità della metodica proposta è più che buona presentando un errore massimo percentuale inferiore al 1%. Come è possibile osservare i risultati dell'estrazione cloroformio e metanolo sono sempre in eccesso rispetto a quelli ottenuti per l'estrazione con TCA e n-esano. La differenza tra i due valori ottenuti rappresenta la frazione polare del grasso del tuorlo di uovo.

Per avere una conferma di tale conclusione il grasso ottenuto per estrazione con cloroformio e metanolo è stato analizzato per cromatografia preparativa su strato sottile secondo un metodo riportato in letteratura [7]; la banda corrispondente alla frazione lipidica polare è stata isolata ed analizzata in termini quantitativi; il risultato è stato corrispondente alla differenza tra i pesi dei due estratti nei limiti degli errori sperimentali. Lo scarto massimo tra i valori medi ottenuti applicando separatamente le due procedure è risultato essere inferiore al 2% e ciò tiene conto di una buona accuratezza della procedura proposta.

Per quanto riguarda la discussione circa l'importanza della separazione della frazione libera non polare del grasso in generale, realizzata a monte della procedura analitica, si rimanda ad un nostro precedente lavoro sul cioccolato [8].

### Analisi qualitativa della frazione lipidica libera non polare in termini di trigliceridi e di acidi grassi

Per verificare se la procedura estrattiva proposta potesse alterare la qualità dell'estratto, sono stati sottoposti ad analisi gas cromatografica l'estratto ottenuto in cloroformio e metanolo (soluzione al 5% p/v) ed il grasso recuperato come frazione lipidica non polare (soluzione al 5% p/v in n-esano). Nelle figure 1 e 2 sono messi a confronto i gascromatogrammi dei trigliceridi e degli acidi grassi pentilesteri analizzati nelle stesse condizioni gas cromatografiche. Come è possibile osservare sia il profilo trigliceridico che quello acidico è uguale per i due grassi analizzati. Questo risultato assicura che la frazione apolare non viene alterata né nella struttura trigliceridica né in quella aci-

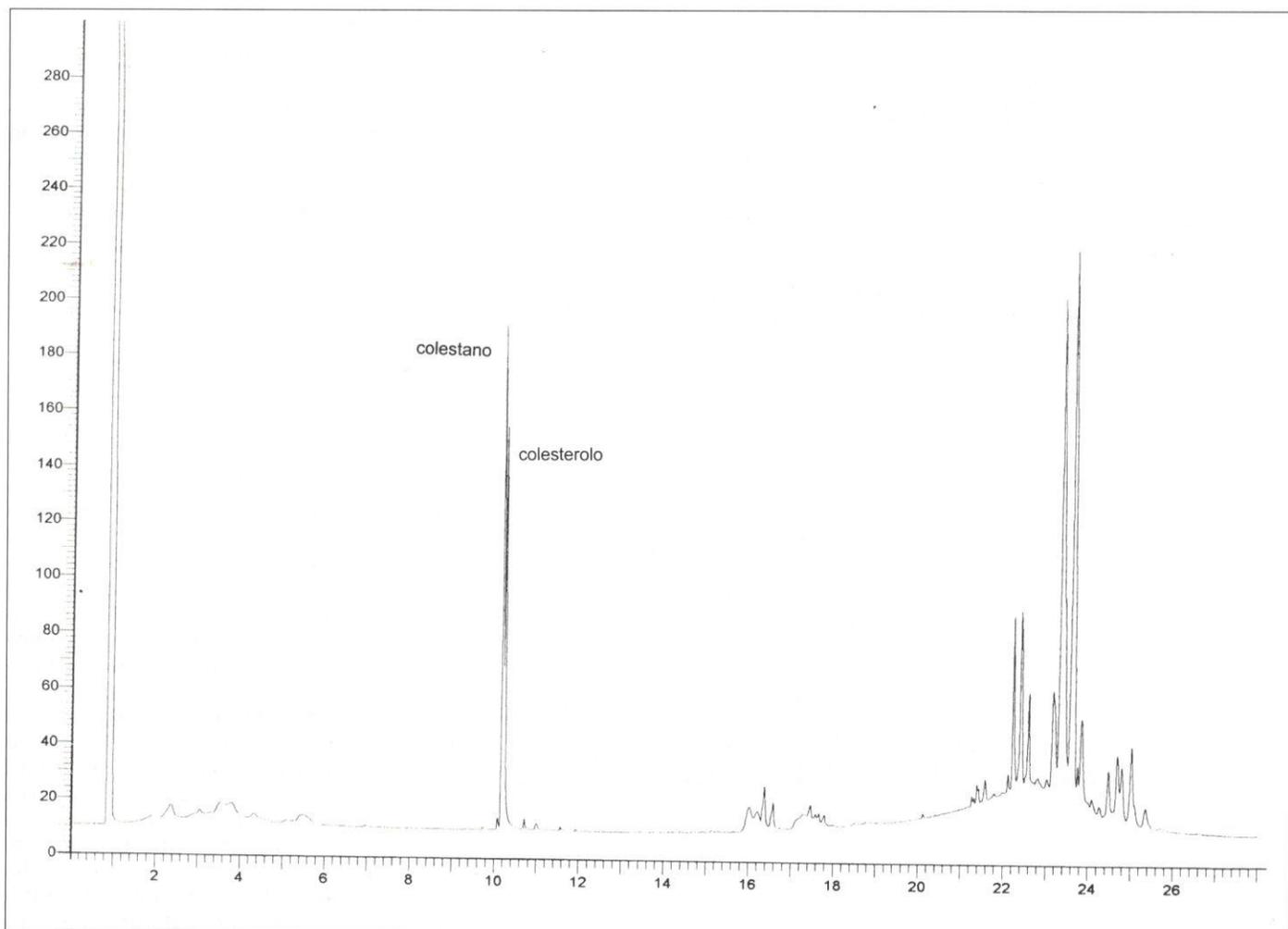


Fig. 3 - Gascromatogramma della frazione lipidica libera non polare aggiunta di colestano come standard interno.

dica. I dati ottenuti dimostrano che è possibile analizzare in termini quali-quantitativi la parte lipidica apolare del tuorlo in termini di trigliceridi e di acidi grassi e di caratterizzarne, di conseguenza, il grasso.

#### Analisi del contenuto di colesterolo libero per uovo

L'analisi del colesterolo contenuto nell'uovo è stata condotta sulla frazione non polare del grasso del tuorlo di uovo. In figura 3 viene riportato il gascromatogramma dell'analisi del colesterolo condotta utilizzando come standard interno il colestano; come è possibile osservare i due composti non sono ben risolti sulla fase stazionaria polare della colonna capillare per trigliceridi; sono stati provati diversi composti come standard interno (n-ottacosano, altri steroli) ed il composto che più ha soddisfatto i requisiti di standard interno è stato lo squalene. Il cambio di standard interno si è reso necessario per il fatto che l'analisi è stata condotta su colonna polare 65% fenil metilsilicone al fine di separare la componente trigliceridica dopo l'uscita del colesterolo; la separazione del colesterolo e dei trigliceridi del grasso del tuorlo consente di ricavare il contenuto di colesterolo rispetto alla massa trigliceridica. I risultati ottenuti nella determinazione della quantità di colesterolo per integrazione dell'area del picco dello sterolo rispetto alla massa dei trigliceridi non hanno consentito l'ottenimento di risultati accurati. Ciò è spiegabile in base al fatto che non esiste alcuna relazione tra la quantità di colesterolo contenuta nell'uovo e la componente trigliceridica. Questo risultato è in accordo con il ri-

sultato ottenuto in termini ponderali della normalizzazione del colesterolo rispetto al peso del grasso estratto dal tuorlo riportata nella tabella III.

L'utilizzo della fase stazionaria polare 65% fenil metilsilicone si rende necessario per eluire la grande massa dei trigliceridi; nella procedura proposta il grasso non è sottoposto a saponificazione e di conseguenza non potrebbe essere analizzato tal quale su una fase stazionaria poco polare. In questo modo è stato possibile ottenere un gascromatogramma in cui è presente il picco del colesterolo ed i picchi dei trigliceridi, che sono suscettibili di integrazione. La sostituzione della fase stazionaria 5% fenil metilsilicone con quella più polare consente perciò di snellire i tempi di analisi e di avere, allo stesso tempo, più informazioni circa il grasso in analisi.

#### Valutazione dei dati ponderali del peso dell'uovo, del tuorlo, dell'albume e del guscio

Nella figura 4 sono riportati gli istogrammi relativi al peso dell'uovo, del tuorlo, dell'albume e del guscio. Come è possibile osservare, nessuno dei quattro istogrammi evidenzia un andamento regolare: la frequenza di comparsa di ciascun risultato ponderale è del tutto casuale. Questi risultati ci indicano che non è possibile trovare una relazione semplice tra le varie parti dell'uovo, per cui non vale la regola secondo la quale all'aumentare del peso dell'uovo aumenta il peso del guscio, del tuorlo o dell'albume. I valori riportati nella tabella I concordano con tale conclusione.

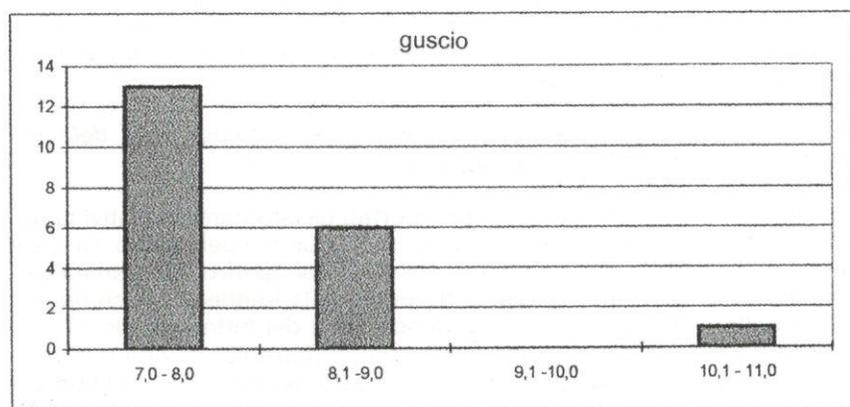
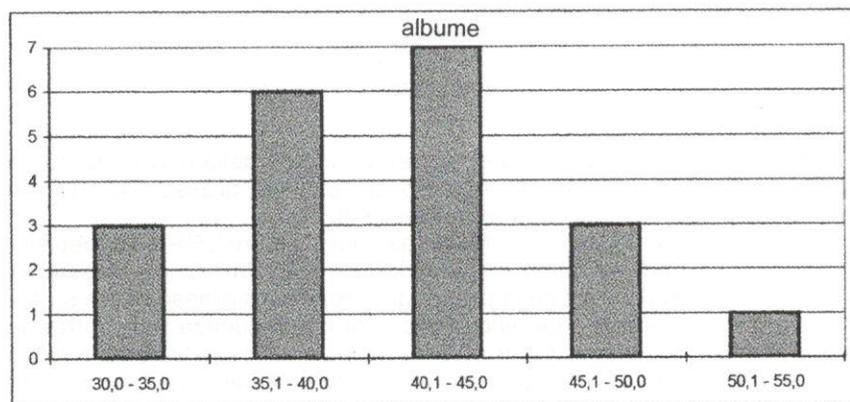
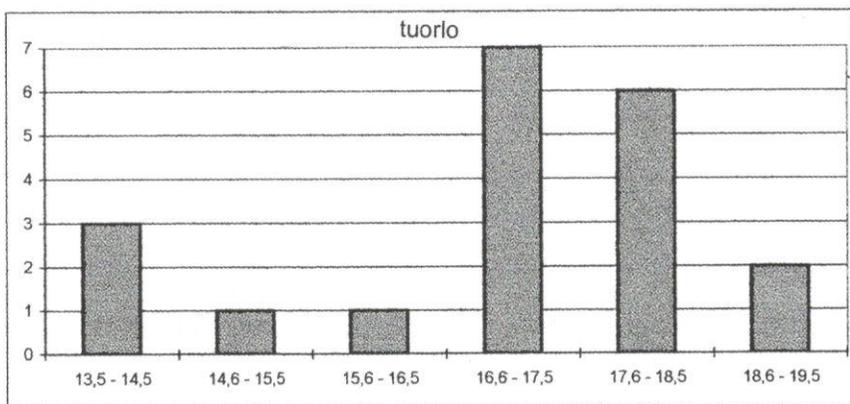
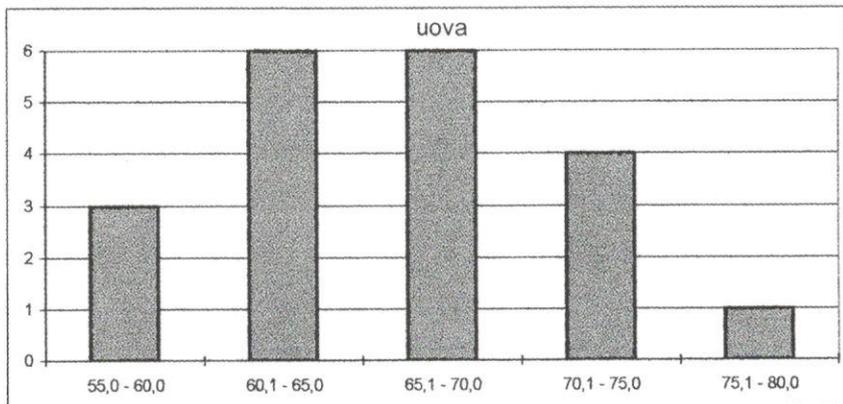


Fig. 4 - Istogrammi relativi al peso dell'uovo intero, dell'albume, del tuorlo e del guscio

#### Calcolo della costante K

Un potenziale parametro di freschezza, nonché potenziale indicatore del contenuto di colesterolo, è stato individuato in un rapporto particolare che mette in relazione la quantità della frazione apolare con il peso del tuorlo e dell'uovo stesso. Questa costante viene determinata nel modo seguente:

$$K = \frac{L \cdot P}{T^2}$$

dove:

L = peso della frazione apolare (g);

T = peso del tuorlo (g);

P = peso dell'uovo intero (g).

#### Importanza della costante K

La valutazione della costante K consente di anticipare il contenuto di colesterolo ed inoltre rappresenta un parametro di freschezza dell'uovo. Infatti, con il passare del tempo, una certa quantità di acqua si trasferisce dall'albume al tuorlo e questo fenomeno si riflette in una diminuzione della costante K. Il valore di tale costante oscilla per la maggior parte delle uova analizzate nel presente lavoro in un intervallo che va da 1,01 a 1,20. Un valore della costante K pari a 0,89 ha evidenziato un contenuto di colesterolo di circa 193 mg/uovo, molto più alto di quello che è stato riscontrato in media. Nella tabella III sono riportati i valori della costante K per ogni campione analizzato. Nella figura 5 è riportato l'istogramma per i valori della costante K ottenuti per le venti uova analizzate. Come si può osservare, l'intervallo in cui è compresa la maggior parte delle misure è compreso tra i valori 1,01 e 1,20. Per dare un peso maggiore all'importanza di questa costante bisogna avere più dati sperimentali; in questo contesto ci sembra utile indicarne l'applicazione ai ricercatori che imposteranno le loro sperimentazioni a partire dalla separazione della frazione apolare del tuorlo.

#### Contenuto di colesterolo nelle uova

Applicando la procedura analitica messa a punto in questo lavoro è stato possibile determinare il contenuto di colesterolo libero e legato nelle venti uova reperite sul mercato locale.

Innanzitutto è stata valutata la riproducibilità dell'analisi del colesterolo sia a partire dalla frazione lipidica libera non polare che dal grasso estratto con cloroformio e metanolo. Una miscela di dieci tuorli di uova è stata analizzata cinque volte mediante la procedura proposta e cinque volte mediante estrazione del grasso con cloroformio e metanolo. Nel primo caso lo scarto massimo dal valore medio è stato del 3%, mentre nel secondo lo scarto massimo dalla media è stato del 5%. Il passo successivo è stato la valutazione dell'accuratezza della procedura proposta. Come riportato nella tabella III, il contenuto di colesterolo

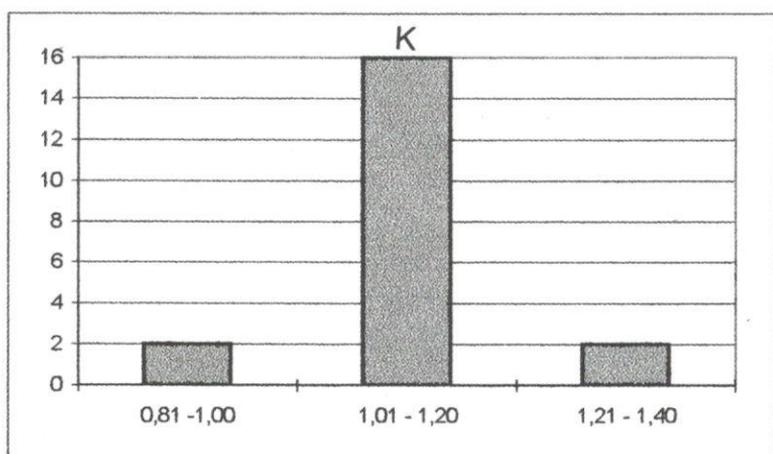
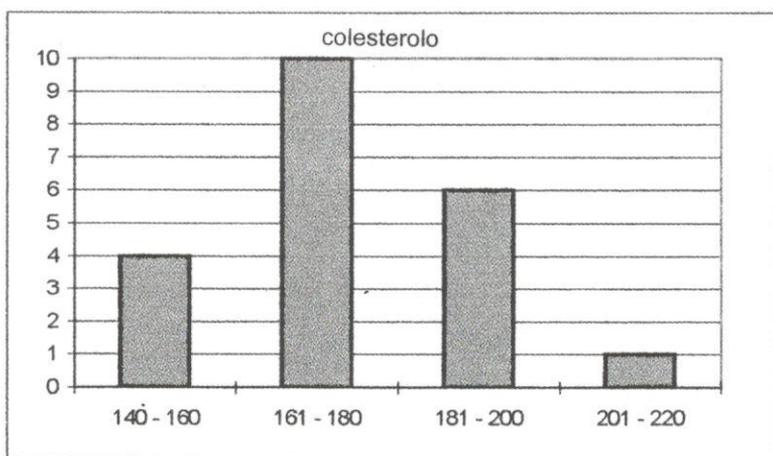
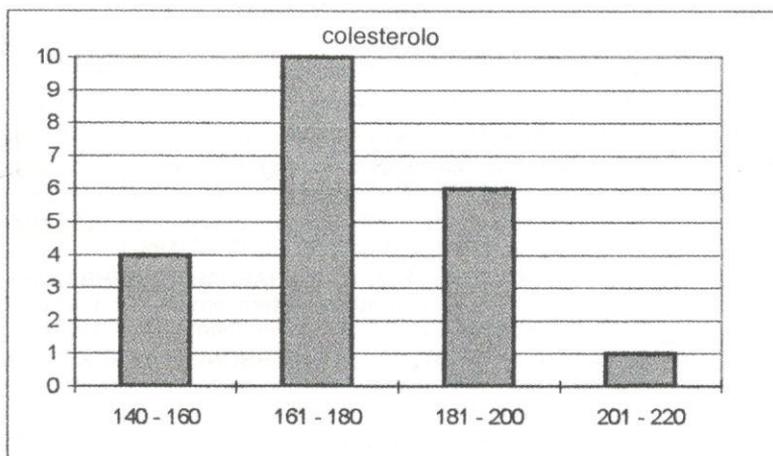


Fig. 5 - Istogrammi relativi al contenuto di colesterolo per uovo, della frazione lipidica libera non polare e dei valori della costante K.

Tabella IV - Precisione ed accuratezza della misura del colesterolo nella frazione apolare

Mix tuorli (6 uova)	Col. medio (mg) (CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH) 2:1	Col. medio (mg) (TCA e n-esano)	Δ(%)
1	195 ±8,7	171 ±5,0	12,3
2	180 ±9,0	158 ±4,4	12,1
3	187 ±8,6	166 ±4,9	11,2
4	156 ±7,0	138 ±3,8	11,5
5	173 ±8,3	152 ±4,5	12,1

riscontrato è stato compreso tra 140 e 193 mg per uovo analizzando la frazione lipidica libera non polare. La valutazione dell'accuratezza della procedura proposta è stata fatta confrontando i valori di colesterolo ottenuti per una miscela di sei tuorli di uovo ripetuta cinque volte ed analizzata estraendo il grasso mediante cloroformio e metanolo e con n-esano e TCA. I risultati sono riportati nella tabella IV. Ciò che è stato osservato è che il valore ottenuto per l'analisi del contenuto di colesterolo nella frazione apolare è in difetto rispetto a quello ottenuto per l'estrazione con cloroformio e metanolo. La causa di questa perdita, che si presenta riproducibile, sta nella precipitazione della frazione polare con acido tricloroacetico. Il precipitato ottenuto andrebbe ridisciolti e poi precipitato di nuovo, ma ciò renderebbe molto più complessa l'analisi. Per gli obiettivi che si prefinge nella determinazione del colesterolo è sufficiente correggere il dato ottenuto dalla analisi dell'estratto apolare per un valore del 12 % (vedi tab. IV)

In generale, non è possibile dare un dato unico del valore del contenuto di colesterolo nelle uova poiché la sua oscillazione è notevole come si può osservare nell'istogramma della figura 5 relativo al contenuto di colesterolo per uovo; inoltre, il valore medio riscontrato si attesta abbastanza al di sotto dei valori riportati in letteratura. Il valore medio riscontrato nella nostra esperienza è stato di 175 mg/uovo.

Nella figura 5 è riportato l'istogramma della frequenza delle misure del contenuto di colesterolo; come è possibile osservare l'andamento è tipico della curva di Gauss. Questa indicazione evidenzia che c'è una tendenza del colesterolo ad impostarsi intorno ad un valore medio, ma, la grande deviazione standard osservata, indica una notevole dispersione dei dati intorno al valore medio.

Infine, l'analisi del colesterolo esterificato della frazione apolare del grasso del tuorlo ha indicato l'assenza, nei limiti della rilevabilità strumentale, di forme legate di colesterolo con acidi grassi.

## CONCLUSIONI

La separazione della frazione lipidica apolare del tuorlo di uovo ci ha permesso di caratterizzare l'uovo in termini di freschezza e come indicatore del contenuto di colesterolo, in quanto è possibile calcolare la costante K che rappresenta un indice di genuinità essendo compresa con frequenza maggiore tra 1,01 e 1,20. Inoltre è stata riscontrata una correlazione tra il valore di K ed il contenuto di colesterolo dell'uovo: all'aumentare del valore di K corrisponde una diminuzione del contenuto di colesterolo. La frazione apolare fornisce una indicazione importante a riguardo della composizione della frazione lipidica totale in quanto rappresenta la quantità della componente trigliceridica del grasso. L'analisi del colesterolo libero e del colesterolo legato nel tuorlo di uovo ha evidenziato l'assenza del colesterolo legato sotto forma di esteri del colesterolo. Una prima indagine su un campionamento casuale di 20 uova, appartenenti alla categoria A e comprese nell'intervallo 50-80 grammi, ha messo in evidenza che il contenuto medio del colesterolo totale nelle uova è di circa 170 mg/uovo contro i 250 mg/uovo riportati in letteratura. La deviazione standard associata alla

media del contenuto di colesterolo è abbastanza grande; tale constatazione comporta l'analisi di un numero sostenuto di uova per arrivare ad ottenere un campione rappresentativo dell'analisi.

Il metodo di analisi proposto costituisce una procedura analitica semplice che può essere adottata da qualsiasi laboratorio attrezzato di gascromatografo; il nostro auspicio è che esso possa essere recepito dai metodi ufficiali di analisi affinché possa essere razionalizzata la procedura analitica che porta all'ottenimento del contenuto di colesterolo nelle uova.

#### *Ringraziamenti*

Si ringrazia la Mater Soc. Cons. a r.l. ed il M.U.R.S.T. per la collaborazione e per il finanziamento alla realizzazione di questo lavoro nell'ambito dell'iniziativa "Ricerca, sviluppo tecnologico ed alta formazione", progetto "Mediterraneo e Salute - Esperti nella valorizzazione dei prodotti tipici della dieta mediterranea" cod. 1768.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- [1] AOAC, Official Methods of Analysis, vol II, 34, pag. 3 (1995).
- [2] AOAC, Official Methods of Analysis, vol II, 32, pag. 39 (1995).
- [3] AOAC, Official Methods of Analysis, vol II, 41, pag. 35 (1995).
- [4] H. D. GRIFFIN, "Manipulation of egg yolk cholesterol: a physiologist's view", *World's Poultry Sci. J.*, 48, 101-112 (1992).
- [5] A. MORDENTI, A. MELUZZI, "Controllo alimentare della qualità delle uova", *Riv. di Avicoltura*, 11, 17-25 (1997).
- [6] E. D. NAEEMI, N. AHMAD, T. AL-SHARRAH, M. BEHBAHANI, "Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food", *J. of AOAC International*, 78, 6 (1995).
- [7] E. PAGANI, S. CHERUBIN, M.F. CARBONI, G. LERCKER "La composizione della frazione lipidica dell'uovo", *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 70, 433-437 (1993).
- [8] D. NAVIGLIO, R. ROMANO, L. SCHIAVO, F. DE GAETANO, A. BATTAGLIA, M. UGLIANO, "Estrazione e caratterizzazione della componente lipidica libera non polare del cioccolato mediante un metodo rapido di analisi", *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 77, 549-556 (2000).