

在牛油加工過程中膽固醇的氧化作用

摘要

本實驗是研究牛油在漂白和除臭的過程中，膽固醇的氧化作用。八種極性的膽固醇氧化產物是主要的研究目標，但是只有 cholest-5-en-3 β ,7 β -diol (7 β -HC)和 5 β ,6 β -epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol (β -CE)在分析的樣本中被偵測到。與天然牛油 (0.2 μ g/g)比起來，加工後牛油的 7 β -HC 的量稍微高些 (0.6-0.7 μ g/g)。然而， β -CE 的量在加工後明顯增加(分布範圍從 0.8 到 3.4)，而天然牛油中只含 0.6 μ g/g 的 β -CE。一般觀察顯示， β -CE 的產量會受到溫度、期間和漂白土的影響。

關鍵字: 漂白(Bleaching)；膽固醇氧化產物(Cholesterol oxidation products)；膽固醇氧化產物(COPs)；除臭(deodorization)；加工過程(Processing)；牛油(Tallow)。

1. 序言

為了更適合人類食用，動物脂肪必須加工處理過。在動物脂肪溶解之後，漂白和除臭是兩個最重要的加工步驟。在加工過程中，利用漂白土和高溫以及乾的蒸氣 (Love, 1996)，將脂肪和油中不必要的顏色與味道會去除。在漂白和除臭過程裡，固醇的量明顯減少。因漂白土的種類和用量，溫度，時間和蒸氣量的關係，會生成許多不必要的產物(Dutta, Przybylski, Appelqvist,&Eskin, 1996)。

有許多在加工過程中所產生的固醇降解產物被用來分析研究，但是大部分是針對植物油的研究。較著名的降解物是 sterenes 或是 steradienes(固醇的脫水產物，主要是在漂白和除臭時產生)。除了 sterenes(屬於比較非極性的化合物)外，在可食用的植物性脂肪和植物油的加工過程裡，還存在著許多極性的固醇氧化產物。但是，較少有關動物脂肪方面的數據(Dutta et al., 1996)。

膽固醇是在動物脂肪和油脂裡最主要的固醇。在一般條件下(Savage, Dutta,& Rodriguez-Estrada, 2002)，可以生成許多氧化產物(COPs)。大部分的研究集中在極性的 COPs，因為這些產物在食物中的濃度而且他們會不利於人體健康 (Paniangvait, King, Jones, & German, 1995; Schroepfer, 2000)。

有報導指出，在於天然和加工過的豬油樣本裡(Nourooz-Zadeh & Appelqvist, 1989)有一些少量的 COPs 存在。但是作者卻找不到有關牛油加工過程對其 COPs 濃度的影響的相關資料。

為了了解哪個參數對膽固醇的氧化有所影響，我們做了一些針對牛油漂白與除臭的初步實驗，但是重點著重於牛油漂白過程對 COPs 的形成。這些參數包括溫度、時間、漂白土的程度和漂白土的酸活化作用。

2. 材料與方法

2.1 材料

未加工的牛油脂肪是 Baeten(比利時 Overmere)捐贈的。漂白土是從 Südchemie(德國)得到的。所有的樣本在未用於分析研究前，皆儲存在-20°C 裡。工業用漂白土也是從 Südchemie(德國慕尼黑)得到的，它們主要的特性皆列在表格 1 裡。

表格 1：在未加工、漂白過和除臭過的牛油，兩種膽固醇氧化物 ($\mu\text{g/g} \pm \text{SEM}$) 的量

樣本號碼	漂白土			時間 (min)	溫度 (°C)	蒸氣 (%)	壓力 (mbar)	膽固醇 $\mu\text{g/g}$ 牛油 $\pm \text{SEM}$	7 β -OH ^a	β -CE ^b
	種類	懸浮體的 pH	表面積 (m ² /g)							
天然牛油										
1								502 \pm 3	0.17 \pm 0.03	0.60 \pm 0.15
漂白過的牛油										
2	1% optimum 215°	2.8	230	30	100	-	-	-	0.69 \pm 0.02	2.65 \pm 0.60
3	1% optimum 215	-	-	60	80	-	-	-	0.69 \pm 0.07	3.37 \pm 0.23
4	2% optimum 215	-	-	30	80	-	-	-	0.49 \pm 0.01	1.48 \pm 0.29
5	1% 標準 310 ^d	3.6	330	30	100	-	-	-	0.60 \pm 0.09	1.98 \pm 0.45
6	1% Ex 640°	6.0	140	30	100	-	-	-	0.69 \pm 0.08	0.81 \pm 0.12
除臭過的牛油										
7 ^f				45	230	1	2	-	0.60 \pm 0.07	2.09 \pm 0.36

A: Cholest-5-en-3 β ,7 β -diol(可能是編輯上的問題，在摘要和結果與討論中他們也叫做 7 β -HC)

B: 5 β , 6 β -epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol

C: 極酸性活化漂白土

D: 一般酸性活化漂白土

E: 天然漂白土

F: 依據 2 號樣本的條件漂白

2.2 方法

提煉步驟：所有的提煉步驟皆是以實驗室等級來執行。在漂白前，未加工的牛油先用減壓濃縮機在 95°C 減壓(50 mbar)下預熱。在加入漂白土後，牛油用 85rpm 的速度混合 30 分鐘，接著用分離漏斗過濾。除臭步驟是根據之前報告提到的方式進行(Petrauskaite, De Greyt, & Kellens, 2000)。還有其他處的漂白和除臭的方法(Verleyen et al., 2002)。工業用漂白土是從 Südchemie(德國慕尼黑)得到的，它們主要的特性皆列在表格 1 裡。

爲了分離 COP，牛油樣本依據之前發表的冷皂化方法稍加改良(Larkeson, Dutta, & Hansson, 2000)。簡單的說，脂肪樣本(0.20-0.25 g，放在有塞子的玻璃管裡秤重)溶解於二氯甲烷(3 ml)和再加入 5ml 的 2M 氫氧化鉀溶液(溶解在 95%的乙醇裡)。混合物放在室溫陰暗處一個晚上(18-20 小時)。將水(10 ml)和二氯甲烷(7 ml)加入管中用力搖晃。吸出二氯甲烷層的溶液放入乾淨的管子中，用 0.5N KOH (5 ml)沖洗一次。離心後(2 分鐘，3000rpm)，將水層取出，剩下的有機部份繼續重複沖洗步驟，直到得到清澈的有機溶液爲止。接著用氮氣將二氯甲烷蒸乾，再將未皂化的物質溶解於 1 ml 的 n-己烷/乙醚(75/25 v/v)裡。

COP的部分是用固相萃取(SPE)濃縮，衍生成三甲基硅烷基乙醚衍生物，然後用 GC-FID(氣相層析儀/火焰離子化偵測法)定量。其步驟如同之前報告所描述(Larkeson et al., 2000)。膽固醇的量是根據之前報告所描述的方法定量(Larkeson et al., 2000)。每一個步驟裡，所有的COPs和膽固醇樣本皆重複分析，表格 1 所列的數據皆爲平均值。

2.3 氣相層析-質譜儀(GC-MS)

作爲確認用目的：本實驗是使用 GC8000 最高系列氣相層析譜(義大利 ThermoQuest Italia S.p.A., Rodano)與旅行者質譜儀和 MassLab 數據處理系統 1.4V 版(英國曼徹斯特 Finnigan)連結。COPs 用和在 GC 分析時所使用的同一根管柱分離。用氮氣做爲載體氣體，其進口壓力是 80 kpa。注射溫度是 250°C，樣本是以非分流形式注射。烤箱最先溫度是在 60°C 停留 0.5 分鐘，之後以每分鐘 50°C 速度上升，上昇到 290°C。最後以每分鐘 0.5°C 速度上升，上昇到 300°C。質譜是以 70eV 的電子能量紀錄。離子出處的溫度是 200°C。

3. 結果和討論

八種在食物裡常見的膽固醇氧化產物是本實驗主要的研究目標。這些 COPs 包括 cholest-5-en-3 β ,7 α -diol(7 α -HC)，cholest-5-en-3 β ,7 β -diol(7 β -HC)，5 α ,6 α -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol (α -CE)，5 β ,6 β -epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol (β -CE)，5 α -cholestan-3 β ,5,6 β -triol (CT)，cholest-5-en-3 β ,20 α -diol(20 α -HC)，cholest-5-en-3 β ,25-diol(25-HC)，3 β -hydroxycholest-5-en-7-one(7-KC) (Larkeson et al., 2000)。在本研究的分析條件下，COP 最低偵測標準是 0.1 μ g/每克的牛油。所有的結果都是重複分析，只有 COP 濃度超過 0.1 μ g/每克的牛油，才有發表。

我們也分析未提煉的牛油的膽固醇含量(Larkeson et al., 2000)，其濃度為 500 μ g/g (表格 1)。文獻記載，在未提煉牛油的膽固醇含量範圍是 700-1400 μ g/g(依來源而定)，但是，本實驗所得遠比已發表的數據還低(Dutta et al., 1996; Park & Addis, 1986)。

在未加工和加工過的牛油樣本裡，其所得 COPs 的濃度全部列在表格 1。在所有的分析樣本裡，只有 7 β -HC 和 β -CE 達到定量的標準而且利用 GC-MS 確定他們的化學結構。在未加工的牛油裡，7 β -HC 和 β -CE 的含量分別為 0.2 μ g/g 和 0.6 μ g/g。值得注意的是，在未加工的牛油樣本裡，其他的 COPs 濃度是低於偵測標準，這可能是因為未加工的牛油在製造過程中含較低的氧化壓力有關。雖然如此，在組織裡可能有一些天然少量的 COP 存在，或是他們可能在溶解過程中自動氧化形成的(Smith, 1987)。

和未加工的牛油相似，在漂白牛油的樣本裡，只有 7 β -OH 和 β -CE 達到定量的標準。所有漂白樣本，在不同的條件下，其 7 β -OH 量是極為相似的，皆約為 0.6 μ g/g，這個數值比起天然牛油(0.2 μ g/g)稍微高些(表格 1)。它的濃度不受漂白條件如：時間，溫度和漂白土的種類的所影響。

漂白樣本含 β -CE 的量從 0.8 到 3.4 μ g/g 都有，這個值遠比天然牛油樣本(0.6 μ g/g)高許多。 β -CE 是膽固醇主要的自動氧化產物，其產量遠超過 α -CE。在酸性環境下，pH 值低於 5.5 時， β -CE 比 α -CE 還要敏感(Smith, 1987)。但是，在這個研究裡，酸性活化漂白土對牛油漂白過程 pH 值的影響是不能確定的。從結果看來(表格 1)，1%極酸性活化漂白土在較高溫和較長的漂白時間會造成大量 β -CE 的形成。但是，較高濃度的同種漂白土對 4 號樣本並沒有如此大的影響。

一般說來，利用酸性活化漂白土漂白會促進 β -CE 的形成。使用天然的漂白土(6 號樣本)， β -CE 的量只增加了一點點或是根本沒有改變。但是使用酸性活化漂白土， β -CE 的濃度逐漸增加(2-5 號樣本)。天然漂白土是微酸性的，而且其表面積

較小，也較少氣孔，因而限制了其吸附的能力。爲了增加漂白土吸附的能力，所以用酸性活化(Zschau, 2000)。因爲酸性活化，漂白土的表面變的非常有反應性，如此可以促進膽固醇的氧化作用。

7 號樣本是依造 2 號樣本的漂白方式漂白(表格 1)，再加上除臭步驟。與 2 號樣本比起來，7 β -OH 的量幾乎沒有差別，但是 β -CE 的量稍微下降。CT 被認爲是有效的血管毒劑，可以利用水解 CE 的表異構物而得到(Smith, 1987,1996)。但是，在 7 號樣本或其他的分析樣本裡，CE 的量還達不到最低偵測量的標準。

如同稍早所提到的，據我們所知，並沒有有關牛油加工過程的研究。但是，有少部分的研究是有關在加熱過後的牛油 COPs 的形成處(Park & Addis, 1986; Ryan, Gray, & Morton, 1981; Zhang & Addis, 1990)。在一個有關食用牛油的提煉研究提到，沒發現可察覺的 COPs 量(Ryan et al., 1981)。另一個有關食用牛油的提煉研究也提到，在長時間的未加熱的牛油，沒有發現可偵測的 COPs 量，但是在長時間加熱(155°C 和 190°C)可以偵測到幾個 COPs (Park & Addis, 1986)。不過，在後來的報導指出，在 90%牛油和 10%棉花子油的混合物，在時間等於 0 時，含有 4 μ g/g 的 7 α -OH(Zhang & Addis, 1990)。從這些報導看來，我們可以說，食用牛油在加工過後，沒有或是含極少量的 COPs。我們的結果與這些報導一致。

4. 結論

在本實驗所使用的加工過牛油，只有少數的 COPs 形成，然而和其他加工食物比起來，其數量是極低的。在漂白過程裡，發現 β -CE 的量增加了，這是受到漂白過程的條件所以影響。在今後的研究裡，可以針對在不同膽固醇濃度的牛油裡 COPs 的形成，和在加工過程中脂肪酸成分變化做更進一步的研究。