

# 在牛油加工过程中胆固醇的氧化作用

## 摘要

本实验是研究牛油在漂白和除臭的过程中，胆固醇的氧化作用。八种极性的胆固醇氧化产物是主要的研究目标，但是只有cholest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol (7 $\beta$ -HC)和5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -CE)在分析的样本中被检测到。与天然牛油(0.2  $\mu$ g/g)比起来，加工后牛油的7 $\beta$ -HC的量稍微高些 (0.6-0.7  $\mu$ g/g)。然而， $\beta$ -CE的量在加工后明显增加(分布范围从0.8到3.4)，而天然牛油中只含0.6  $\mu$ g/g的 $\beta$ -CE。一般观察显示， $\beta$ -CE的产量会受到温度、期间和漂白土的影响。

**关键词:** 漂白(Bleaching) ;胆固醇氧化产物(Cholesterol oxidation products) ;胆固醇氧化产物(COPs) ;除臭(deodorization) ;加工过程(Processing) ;牛油(Tallow)。

## 1. 序言

为了更适合人类食用，动物脂肪必须加工处理过。在动物脂肪溶解之后，漂白和除臭是两个最重要的加工步骤。在加工过程中，利用漂白土和高温以及干的蒸气(Love, 1996)，将脂肪和油中不必要的颜色与味道会去除。在漂白和除臭过程中，固醇的量明显减少。因漂白土的种类和用量，温度，时间和蒸气量的关系，会生成许多不必要的产物(Dutta, Przybylski, Appelqvist, & Eskin, 1996)。

有许多在加工过程中所产生的固醇降解产物被用来分析研究，但是大部分是针对植物油的研究。较著名的降解物是sterenes或是steradienes(固醇的脱水产物，主要是在漂白和除臭时产生)。除了sterenes(属于比较非极性的化合物)外，在可食用的植物性脂肪和植物油的加工过程中，还存在着许多极性的固醇氧化产物。但是，较少有关动物脂肪方面的数据(Dutta et al., 1996)。

胆固醇是在动物脂肪和油脂里最主要的固醇。在一般条件下(Savage, Dutta, & Rodriguez-Estrada, 2002)，可以生成许多氧化产物(COPs)。大部分的研究集中在极性的COPs，因为这些产物在食物中的浓度而且他们会不利于人体健康(Paniangvait, King, Jones, & German, 1995; Schroepfer, 2000)。

有报导指出，在于天然和加工过的猪油样本里(Nourooz-Zadeh & Appelqvist, 1989)有一些少量的COPs存在。但是作者却找不到有关牛油加工过程对其COPs浓度的影响的相关资料。

为了了解哪个参数对胆固醇的氧化有所影响，我们做了一些针对牛油漂白与除臭的初步实验，但是重点着重于牛油漂白过程对COPs的形成。这些参数包括温度、时间、漂白土的程度和漂白土的酸活化作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1 材料

未加工的牛油脂肪是Baeten(比利时Overmere)捐赠的。漂白土是从Südchemie(德国)得到的。所有的样本在未用于分析研究前,皆储存在-20 °C裡。工业用漂白土也是从Südchemie(德国慕尼黑)得到的,它们主要的特性皆列在表格1裡。

表格1: 在未加工、漂白过和除臭过的牛油, 两种胆固醇氧化物( $\mu\text{g/g} \pm \text{SEM}$ )的量

样本号码	漂白土			时间	温度	蒸气	压力	胆固醇	7 -OH <sup>a</sup>	-CE <sup>b</sup>
	种类	悬浮体的pH	表面积(m <sup>2</sup> /g)	(min)	(°C)	(%)	(mbar)	$\mu\text{g/g}$ 牛油 $\pm$ SEM		
天然牛油										
1								502 $\pm$ 3	0.17 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.15
漂白过的牛油										
2	1% optimum 215 <sup>c</sup>	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% 标准 310 <sup>d</sup>	3.6	330	30	100	-	-	-	0.60 $\pm$ 0.09	1.98 $\pm$ 0.45
6	1% Ex 640 <sup>e</sup>	6.0	140	30	100	-	-	-	0.69 $\pm$ 0.08	0.81 $\pm$ 0.12
除臭过的牛油										
7 <sup>f</sup>				45	230	1	2	-	0.60 $\pm$ 0.07	2.09 $\pm$ 0.36

A: Cholest-5-en-3 ,7 -diol(可能是编辑上的问题,在摘要和结果与讨论中他们也叫做7 $\beta$ -HC)

B: 5 $\beta$  ,6 $\beta$  -epoxy-5 $\beta$  -cholestan-3 $\beta$  -ol

C: 极酸性活化漂白土

D: 一般酸性活化漂白土

E: 天然漂白土

## F: 依据2号样本的条件漂白

### 2.2 方法

提煉步骤：所有的提煉步骤皆是以实验室等级來执行。在漂白前，未加工的牛油先用减压浓缩机在95 ° C减压(50 mbar)下预热。在加入漂白土后，牛油用85rpm的速度混合30分钟，接着用分离漏斗过滤。除臭步骤是根据之前报告提到的方式进行(Petrauskaite, De Greyt, & Kellens, 2000)。还有其它处的漂白和除臭的方法(Verleyen et al., 2002)。工业用漂白土是从Südchemie(德国慕尼黑)得到的，它们主要的特性皆列在表格1裡。

为了分离COP，牛油样本依据之前发表的冷皂化方法稍加改良(Larkeson, Dutta, & Hansson, 2000)。简单的說，脂肪样本(0.20-0.25 g，放在有塞子的玻璃管裡秤重)溶解于二氯甲烷(3 ml)和再加入5ml的2M氢氧化钾溶液(溶解在95%的乙醇裡)。混合物放在室温阴暗处一个晚上(18-20小时)。将水(10 ml)和二氯甲烷(7 ml)加入管中用力摇晃。吸出二氯甲烷层的溶液放入干净的管子中，用0.5N KOH (5 ml)冲洗一次。离心后(2分钟，3000rpm)，将水层取出，剩下的有机部份继续重复冲洗步骤，直到得到清澈的有机溶液为止。接着用氮气将二氯甲烷蒸干，再将未皂化的物质溶解于1 ml的n-己烷/乙醚(75/25 v/v)裡。

COP的部分是用固相萃取(SPE)浓缩，衍生成三甲基硅烷基乙醚衍生物，然后用GC-FID(气相层析仪/火焰离子化侦测法)定量。其步骤如同之前报告所描述(Larkeson et al., 2000)。胆固醇的量是根据之前报告所描述的方法定量(Larkeson et al., 2000)。每一个步骤裡，所有的COPs和胆固醇样本皆重复分析，表格1所列的数据皆为平均值。

### 2.3 气相层析-质谱仪(GC-MS)

作为确认用目的：本实验是使用GC8000 最高系列气相层析谱(义大利ThermoQuest Italia S.p.A., Rodano)与旅行者质谱仪和MassLab数据处理系统1.4V版(英国曼彻斯特Finnigan)连结。COPs用和在GC分析时所使用的同一根管柱分离。用氦气做为载体气体，其进口压力是80 kpa。注射温度是250°C，样本是以非分流形式注射。烤箱最先温度是在60°C停留 0.5分钟，之后以每分钟50°C速度上升，上升到290°C。最后以每分钟0.5°C速度上升，上升到300°C。质谱是以70eV的电子能量纪录。离子出处的温度是200°C。

## 3. 结果和讨论

八种在食物裡常见的胆固醇氧化产物是本实验主要的研究目标。这些COPs包括cholest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol(7 $\alpha$ -HC)，cholest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol(7 $\beta$ -HC)，5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol ( $\alpha$ -CE)，5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -CE)，

5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ ,5,6 $\beta$ -triol (CT), cholest-5-en-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol(20 $\alpha$ -HC), cholest-5-en-3 $\beta$ ,25-diol(25-HC), 3 $\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one(7-KC) (Larkeson et al., 2000)。在本研究的分析条件下, COP最低侦测标准是0.1  $\mu$ g/每克的牛油。所有的结果都是重复分析, 只有COP浓度超过0.1  $\mu$ g/每克的牛油, 才有发表。

我们也分析未提炼的牛油的胆固醇含量(Larkeson et al., 2000), 其浓度为500 $\mu$ g/g (表格1)。文献记载, 在未提炼牛油的胆固醇含量范围是700-1400  $\mu$ g/g(依来源而定), 但是, 本实验所得远比已发表的数据还低( Dutta et al., 1996; Park & Addis, 1986)。

在未加工和加工过的牛油样本裡, 其所得COPs的浓度全部列在表格1。在所有的分析样本裡, 只有7 $\beta$ -HC和 -CE达到定量的标准而且利用GC-MS确定他们的化学结构。在未加工的牛油裡, 7 $\beta$ -HC和 -CE的含量分别为0.2  $\mu$ g/g和 0.6  $\mu$ g/g。值得注意的是, 在未加工的牛油样本裡, 其它的COPs浓度是低于侦测标准, 这可能是因为没有加工的牛油在制造过程中含较低的氧化压力有关。虽然如此, 在组织裡可能有一些天然少量的COP存在, 或是他们可能在溶解过程中自动氧化形成的(Smith, 1987)。

和未加工的牛油相似, 在漂白牛油的样本裡, 只有7 $\beta$ -OH和 -CE达到定量的标准。所有漂白样本, 在不同的条件下, 其7 $\beta$ -OH量是极为相似的, 皆约为0.6  $\mu$ g/g, 这个数值比起天然牛油(0.2  $\mu$ g/g)稍微高些(表格1)。它的浓度不受漂白条件如: 时间, 温度和漂白土的种类的影响。

漂白样本含 -CE的量从0.8到3.4  $\mu$ g/g 都有, 这个值远比天然牛油样本(0.6  $\mu$ g/g)高许多。 -CE是胆固醇主要的自动氧化产物, 其产量远超过 -CE。在酸性环境下, pH值低于5.5时, -CE比 -CE还要敏感(Smith, 1987)。但是, 在这个研究裡, 酸性活化漂白土对牛油漂白过程pH值的影响是不能确定的。从结果看来(表格1), 1%极酸性活化漂白土在较高温和较长的漂白时间会造成大量 -CE的形成。但是, 较高浓度的同种漂白土对4号样本并没有如此大的影响。

一般说来, 利用酸性活化漂白土漂白会促进 -CE的形成。使用天然的漂白土(6号样本), -CE的量只增加了一点点或是根本没有改变。但是使用酸性活化漂白土, -CE的浓度逐渐增加(2-5号样本)。天然漂白土是微酸性的, 而且其表面积较小, 也较少气孔, 因而限制了其吸附的能力。为了增加漂白土吸附的能力, 所以用酸性活化(Zschau, 2000)。因为酸性活化, 漂白土的表面变的非常有反应性, 如此可以促进胆固醇的氧化作用。

7号样本是依造2号样本的漂白方式漂白(表格1), 再加上除臭步骤。与2号样本比起来,  $7\beta$ -OH的量几乎没有差别, 但是  $-CE$ 的量稍微下降。CT被认为是有效的血管毒剂, 可以利用水解CE的表异构物而得到(Smith, 1987, 1996)。但是, 在7号样本或其它的分析样本裡, CE的量还达不到最低侦测量的标准。

如同稍早所提到的, 据我们所知, 并没有有关牛油加工过程的研究。但是, 有少部分的研究是有关在加热过后的牛油COPs的形成处(Park & Addis, 1986; Ryan, Gray, & Morton, 1981; Zhang & Addis, 1990)。在一个有关食用牛油的提煉研究提到, 没发现可察觉的COPs量(Ryan et al., 1981)。另一个有关食用牛油的提煉研究也提到, 在长时间的未加热的牛油, 没有发现可侦测的COPs量, 但是在长时间加热( $155^{\circ}\text{C}$ 和 $190^{\circ}\text{C}$ )可以侦测到几个COPs (Park & Addis, 1986)。不过, 在后來的报导指出, 在90%牛油和10%棉花子油的混合物, 在时间等于0时, 含有 $4\ \mu\text{g/g}$ 的 $7\alpha$ -OH(Zhang & Addis, 1990)。从这些报导看来, 我们可以說, 食用牛油在加工过后, 没有或是含极少量的COPs。我们的结果与这些报导一致。

#### 4. 結論

在本实验所使用的加工过牛油, 只有少數的COPs形成, 然而和其它加工食物比起来, 其數量是极低的。在漂白过程裡, 发现  $-CE$ 的量增加了, 这是受到漂白过程的条件所以影响。在今后的研究裡, 可以针对在不同胆固醇浓度的牛油裡COPs的形成, 和在加工过程中脂肪酸成分变化做更进一步的研究。