

胆固醇热氧化反应研究

张明霞¹, 庞建光¹, 周建科²

(1.河北工程学院, 河北 邯郸 056038; 2.河北大学理化分析研究中心, 河北 保定 071002)

摘要: 以纯胆固醇为对照, 对油脂存在下胆固醇受热氧化情况进行了研究。探讨了温度、加热时间、花生油加入量对胆固醇氧化的影响。采用自制微型固相萃取柱样品预处理结合毛细管气相色谱法分离检测胆固醇氧化产物, 共有6种氧化物被检出。在一定范围内, 氧化物的组成和生成量随加热温度升高和时间延长明显增加, 而随加油量的增加有明显减少的趋势。

关键词: 胆固醇氧化物; 胆固醇; 毛细管气相色谱法; 花生油

Study on Cholesterol Oxidation During Heating

ZHANG Ming-xia¹, PANG Jian-guang¹, ZHOU Jian-ke²

(1.Hebei Engineering College, Handan 056038, China;

2.Research Center of Physics and Chemistry Analysis, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Oxidation of cholesterol in the presence of cooking oil during heating was studied in comparison with oxidation of pure cholesterol. The sample pretreatment was conducted by solid-phase extraction column as (made by the laboratory itself) provided micro-packed-bed with only 20mg of sorbent(silica gel 60H). The cholesterol oxidation products were separated and assayed by capillary column gas chromatography. Six cholesterol oxidation products were detected. Among them, 7-ketocholesterol was the most predominant product. To some degree, the amount of cholesterol oxidation products increased along with the increase of heating time and temperature, but there was the tendency of decrease with the increase of the amount of oil added.

Key words: cholesterol oxidation products; cholesterol; capillary gas chromatography; peanut oil

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)10-0076-03

胆固醇普遍存在于动物性脂肪、乳类和蛋制品中^[1], 受光、热、氧作用易引起自氧化反应而生成多种氧化产物^[2]。早在1913年Anitschkow首次描述了他当时认为是用纯胆固醇溶解在植物油中喂养兔子而导致其动脉粥样硬化(Atherosclerosis, As)的情况。1966年Brooks等报道了人动脉粥样斑块内含有胆固醇氧化产物(Cholesterol Oxidation Products, COPs)。1969年, Kritchevsky等分别用含结晶胆固醇和无定型胆固醇的饲料喂养兔子, 结果发现无定型胆固醇最易导致As发生^[3], 后来证实这些无定型胆固醇中含有COPs。当时人们普遍认为高胆固醇血症是As的主要危险因素, 并未对COPs引起重视。80年代研究发现COPs与胆固醇同时存在, 结构相似, 但生物学作用大不相同。90年代以来, 由于对低密度脂蛋白, 特别是氧化修饰的低密度脂蛋白与As关系的深入研究, 发现氧化修饰的低密度脂蛋白中含有大量的COPs, 且其毒性主要来自

COPs, 从而引起研究者对COPs的重视^[4,5], 包括不同氧化物的动物毒性试验研究, 各种食品及动物组织中COPs的分析方法研究以及富含胆固醇食品加工储存过程中COPs的生成情况研究等。在食品加工业和家庭烹调中加热是一道最普通的工序, 但系统研究胆固醇受热氧化情况的报道很少, Osada等研究了纯胆固醇长时间(24h)受热氧化情况^[6]。食品中的胆固醇经常与脂类共存, 故胆固醇氧化速度会受共存脂类影响^[7], Li Nan等研究了不饱和三酸甘油酯存在时对胆固醇氧化的影响^[8]。花生油乃我国用量最大的食用油之一, 本文以纯胆固醇^[9]做对照, 研究了花生油存在下的胆固醇在较短时间(2h)内受热氧化情况, 考察了不同加油量、加热温度和时间下胆固醇的氧化情况。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

收稿日期: 2004-10-18

作者简介: 张明霞(1971-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事化学教学和食品研究工作。

Varian 3400 气相色谱仪; 1075 分流/不分流注样器; FID 检测器; SP4290M 积分仪; 自制微型 SPE 固相萃取柱(1.5mm i.d. \times 15cm); 内装 20mg 硅胶(H60 型), 柱床高度 4.3cm。

色谱条件: SE-30 弹性石英毛细管柱 (25m \times 0.22mm i.d., 膜厚 0.2 μ m) 柱温 280 $^{\circ}$ C, 注样室 315 $^{\circ}$ C, 检测器 315 $^{\circ}$ C; 载气为高纯氮, 柱前压 82.8kPa; 补充氮气, 流量 30ml/min, 氢气流量 30ml/min, 空气流量 300ml/min。不分流注样, 0.2min 后打开分流阀。

胆固醇(cholesterol)和 6 种 COPs 标准品: 5 α , 6 α -环氧化胆固醇(5 α -EP)、5 β , 6 β -环氧化胆固醇(5 β -EP)、6-酮基胆固醇(6-keto)、7-酮基胆固醇(7-keto)、25-羟基胆固醇(25-OH)、3 β , 5 α , 6 β -胆甾烷三醇(triol), 5 α -胆甾烷(5 α -cholestane, 内标)以及衍生试剂 N,O-双(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(BSTFA, 含 1% 三甲基氯硅烷)均购自 Sigma 公司。其它试剂均为分析纯, 花生色拉油购自本地超市。

1.2 胆固醇加热氧化

用正己烷配制胆固醇标准溶液(5.00mg/ml)和花生油溶液(10.20mg/ml)。在两只刻度一致的磨口具塞锥形玻璃反应管中, 分别加入等量胆固醇溶液, 并在其中一玻璃管中加入一定量的花生油溶液, 涡旋混合后, 用微氮气流吹干溶剂, 然后一同敞口在可控温加热装置上于不同温度, 不同时间, 不同花生油量的条件下进行加热, 反应后用正己烷溶解。

1.3 预分离与净化

混合液加入 0.5ml 正己烷预活化的 SPE 固相萃取柱内, 用注射器控制流速为 0.5ml/min。依次用 0.1ml 正己烷/乙酸乙酯=95/5(V/V), 0.3ml 正己烷/乙酸乙酯=90/10(V/V)和 0.2ml 正己烷/乙酸乙酯=80/20(V/V)混合溶剂洗脱, 洗脱液弃去, 则中性脂、磷脂和绝大部分胆固醇被除去。最后用 0.3ml 丙酮将洗脱 COPs 出来进行衍生反应。

1.4 衍生反应

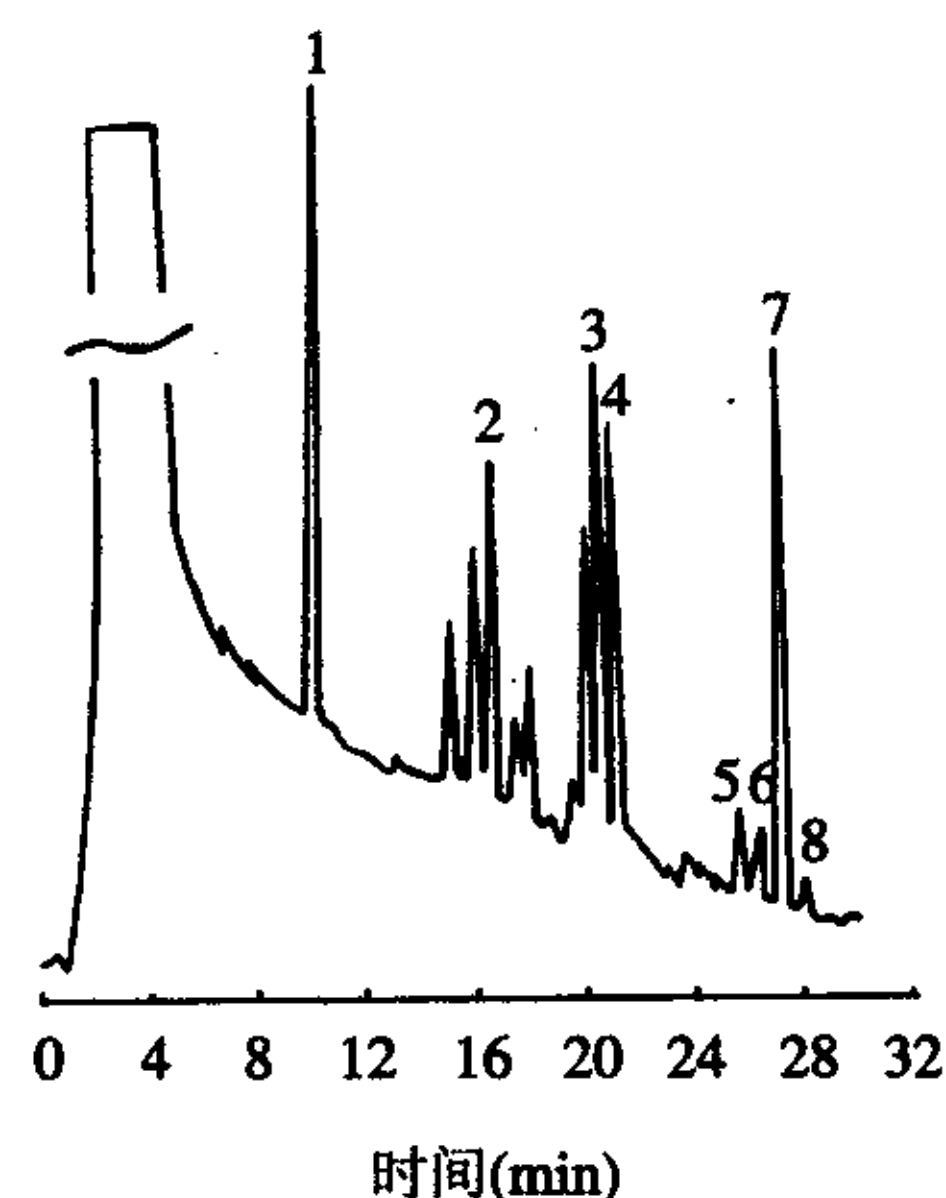
用微氮气流吹干丙酮溶剂, 加入 25 μ l BSTFA(1% TMCS) 和 50 μ l 吡啶, 漩涡混合 10s, 于 60 $^{\circ}$ C 下反应 1h。挥干反应试剂, 加入 1mg/ml 5 α -胆甾烷的乙酸乙酯溶液 1 μ l 做内标, 再加 24 μ l 乙酸乙酯溶解, 进样 1 μ l 进行气相色谱分析, 用内标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱行为

在上述色谱条件下, 胆固醇及其 6 种氧化物分离效果良好, 图 1 为 500 μ g 胆固醇加入 5mg 花生油(质量比为 1/10)于 150 $^{\circ}$ C 下氧化 80min 的色谱图, 根据图中各峰相对保留时间可确定 6 种胆固醇氧化产物的存在, 胆固醇的量不是太大时不干扰氧化物定量。另外在保留时间

为 14.97、15.95、19.47 和 17.96min 处出现几个未知峰, 是胆固醇的其它氧化产物, 还是 COPs 的降解产物, 或者是花生油的氧化产物, 有待进一步探讨。



1, 5 α -cholestane; 2, cholesterol; 3, 5 β -EP; 4, 5 α -EP; 5, triol; 6, 6-keto; 7, 7-keto; 8, 25-OH.

图 1 胆固醇于 150 $^{\circ}$ C 下加热 2h 的色谱图

Fig.1 Gas chromatogram of cholesterol heated at 150 $^{\circ}$ C for 80min

2.2 温度对 COPs 生成的影响

表 1 为 500 μ g 胆固醇于不同温度下加热 2h 胆固醇氧化产物的生成情况。从表 1 中看到, 不论是纯胆固醇, 还是花生油存在下的胆固醇于 90 $^{\circ}$ C 加热 2h 还是很稳定的, 未检测到有 COPs 生成, 和文献[10]报道结果一致。当温度加热到 100 $^{\circ}$ C 时, 纯胆固醇有极微量的 7-keto 生成, 而油脂存在下的胆固醇有两种氧化物被检测到。120 $^{\circ}$ C 时与油共存的胆固醇氧化非常严重, 总氧化物生成量为 5.30 μ g 达到最高点, 而纯胆固醇仅生成 0.87 μ g。150 $^{\circ}$ C 时前者总氧化物生成量为 4.26 μ g, 而后者为 3.13 μ g 达到纯胆固醇氧化最高点。比较几种加热温度下油脂存在下的胆固醇总比纯胆固醇氧化严重, 说明油脂能促进自氧化反应的发生。210 $^{\circ}$ C 时两者炭化均相当严重。

2.3 加热时间对 COPs 生成的影响

表 2 为 500 μ g 胆固醇于 150 $^{\circ}$ C 下加热不同的时间胆固醇氧化产物的生成情况。从表 2 可以看出, 加热初期, 10min 以内花生油存在胆固醇有 3 种氧化物被检出, 而纯胆固醇仅检出 1 种。10min 之后各氧化物生成量均呈上升的趋势, 其中以 7-keto 上升速度最快, 其次为 5 α -EP 和 5 β -EP。毒性较强的 25-OH 自 20 min 开始生成后含量几乎保持不变。此与 Osada 等^[6]的实验结果相似, 计算每一时刻总氧化物生成量前者总大于后者。由此可得出结论: 花生油存在下胆固醇更易氧化, 说明油脂能促进自氧化反应的发生。原因是加入不饱和油脂以后, 油脂先进行自氧化, 形成大量的自由基和过氧化物, 加速了胆固醇的自氧化过程。

表1 加热温度对胆固醇氧化的影响
Table 1 Effect of various temperature on cholesterol oxidation

温度 (℃)	胆固醇氧化产物含量(μg)													
	纯胆固醇氧化							花生油存在下的胆固醇氧化						
	5 β -EP	5 α -EP	triol	6-keto	7- keto	25-OH	总量	5 β -EP	5 α -EP	triol	6-keto	7- keto	25-OH	总量
90	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	0
100	—	—	—	—	0.02	—	0.02	—	0.03	—	—	0.06	—	0.09
120	0.06	0.26	0.07	—	0.46	0.02	0.87	0.78	2.02	0.11	—	2.37	0.02	5.30
150	0.25	0.51	0.36	0.32	1.64	0.05	3.13	0.55	1.59	0.31	0.18	1.58	0.05	4.26
180	0.09	—	0.10	0.15	1.05	—	1.39	0.29	0.09	0.23	0.15	1.00	0.05	1.81
210	0.05	—	0.08	0.09	0.36	—	0.58	0.01	—	—	—	0.14	—	0.15

表2 加热时间对胆固醇氧化的影响
Table 2 Effect of various heating time on cholesterol oxidation

加热时间 (min)	胆固醇氧化产物含量(μg)													
	纯胆固醇氧化							花生油存在下的胆固醇氧化						
	5 β -EP	5 α -EP	triol	6-keto	7- keto	25-OH	总量	5 β -EP	5 α -EP	triol	6-keto	7- keto	25-OH	总量
10	—	—	—	—	0.10	—	0.10	0.01	0.01	—	—	0.12	—	0.14
20	0.20	0.73	0.20	0.12	1.40	0.01	2.66	0.41	1.11	0.13	0.06	1.11	0.01	2.83
40	0.60	1.35	0.32	0.10	2.30	0.01	4.68	0.61	1.83	0.32	0.13	1.95	0.02	4.86
60	0.51	1.35	0.50	0.34	2.82	0.05	5.63	0.75	2.02	0.31	0.15	2.61	0.05	5.89
90	0.31	0.81	0.30	0.23	2.01	0.02	3.68	0.42	1.50	0.26	0.18	1.75	0.05	4.08
120	0.25	0.51	0.36	0.32	1.64	0.02	3.13	0.55	1.59	0.31	0.18	1.58	0.05	4.26

象深度油煎、烤、焙这些烹调方式均能达到 120℃ 以上，加热时间多在 10min 以上，既然胆固醇氧化产物对人类健康有害，故在日常家庭烹调和食品加工中应引起足够重视。

2.4 精密度和回收率

用加有花生油及胆固醇的混合样品平行测定 5 次，各组分相对标准偏差均小于 7%，回收率均在 80%~90% 之间。

参考文献：

[1] Paniangvait P, King A J, Jones A D, et al. Cholesterol oxides in foods of animal origin[J]. J Food Sci, 1995, 60: 1159-1174.

[2] Smith L L. Cholesterol Autoxidation[M]. Plenum Press, 1981. 125.

[3] Kritchevsky D, Marcucci A M, Sallata P, et al. Comparison of amorphous and crystalline cholesterol in establishment of atherosclerosis in rabbits[J]. Med Exptl, 1969, 19: 185.

[4] Guardiola F, Codony R, Addis P B, et al. Biological effects

of oxysterols: current status[J]. Food Chem Toxicol, 1996, 34: 193-211.

[5] Dimmeler S F, Haendeler J D, Galle J, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32 - like proteases[J]. Circulation, 1997, 95(7): 1760-1773.

[6] Osada K, Kodama T, Cui L, et al. Oxidation of Cholesterol by Heating[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1198-1202.

[7] Nawar w w, Kim S K, Li Y J, et al. Measurement of oxidative interations of cholesterol[J]. J Am Oil Chem Soc, 1991, 68: 496-498.

[8] Li N, Ohshima T, Shozen K, et al. Effects of degree of unsaturation of coexisting triacylglycerols on cholesterol oxidation[J]. J Am Oil Chem Soc, 1994, 71(6): 623-627.

[9] 张明霞, 周建科, 梁俊红. 胆固醇受热氧化产物研究[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 99-102.

[10] Osada K, Kodama T, Cui L, et al. Levels and formation of oxidize cholesterol in processed marine food[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1893-1898.