

鸭蛋黄渣中胆固醇的提取及GC-MS含量测定

马萍¹, 夏露², 马鹏飞², 王娜¹, 周敏¹

(1. 杭州市质量技术监督检测院, 浙江杭州 310019; 2. 浙江大学动物科学学院, 浙江杭州 310029)

摘要:以已提取了卵磷脂的鸭蛋黄渣为原料, 采用有机溶剂(丙酮)提取法提取胆固醇, 设计了四因素三水平正交实验, 结果表明: 丙酮用量为鸭蛋黄渣质量的0.8倍, 温度25℃, 每次搅拌时间2h, 提取次数5次的条件下, 提取的胆固醇得率最高。采用GC-MS测定, 胆固醇的纯度达到81.3%, 此法的回收率为92.4%~96.3%, 相对标准偏差1.22%, 最低检出限0.02mg/kg。

关键词:胆固醇, 丙酮, 气质联用

Extraction of cholesterol in duck egg yolk residue and GC-MS analysis

MA Ping¹, XIA Lu², MA Peng-fei², WANG Na¹, ZHOU Min¹

(1. Hangzhou Institute of Test and Calibration for Quality and Technology Supervision, Hangzhou 310019, China;

2. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Cholesterol from duck egg yolk residue without lecithin is extracted by using organic solvent (acetone). The experiment was designed according to four factors and three levels orthogonal table. The results showed that the optimum condition as follows: acetone volume was 0.8 times of the quality of egg yolk residue, temperature at 25℃, extraction 2h for each time, and extract 5 times. Determined by GC-MS, the content of cholesterol reached 81.3%. The recovery rate was 92.4%~96.3%, the relative standard deviation was 1.22%, The lowest detection limit was 0.02mg/kg.

Key words: cholesterol; acetone; GC-MS

中图分类号: TS253.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)07-0305-03

胆固醇又称胆甾醇, 是一种环戊烷多氢菲的衍生物。化学名为胆甾-5-烯-3-醇, 分子式为 $C_{27}H_{46}O$, 分子量为 386.67。胆固醇为白色蜡状结晶片, 具有液晶的性质, 难溶于水, 难溶于冷乙醇, 而较易溶于热乙醇, 易溶于氯仿、丙酮、苯、石油醚、油脂及乙醚等有机溶剂。胆固醇属于体内的基本脂类化合物。它是人体细胞膜的成分, 参与性激素的合成, 是人体内必不可少的物质^[1]。人体内胆固醇主要来源于内源性合成和外源性吸收。内源性胆固醇主要在肝脏合成, 占体内胆固醇合成总量的70%~80%。外源性胆固醇由消化道从食物中摄取, 吸收量受饮食结构影响, 其中营养丰富的禽蛋类食品含有大量胆固醇, 是外源性胆固醇的主要来源^[1]。目前对于胆固醇的提取方法有溶剂提取法, 超临界二氧化碳萃取法^[2], 分子印记固相萃取法^[3]。主要的测定方法有比色法^[4], 酶催化法^[5], 气相色谱法, 高效液相色谱法^[6]。

1 材料与设备

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2008-11-03

作者简介: 马萍(1981-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 气相色谱。

鸭蛋黄渣 由浙江省武义田歌实业有限公司提供; 丙酮、无水乙醇、浓硫酸、正己烷 均为化学纯; 胆固醇标准品 分析纯, 白色或淡黄色片状结晶。

气-质联用仪(5975C)、气相色谱仪(7890A) 安捷伦公司; Sartorius CP 224S 电子分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; D25-2F 电动搅拌机 杭州仪表电机有限公司; HH-S 型水浴锅 郑州长城科工贸有限公司; SPX 型智能生化培养箱 宁波江南仪器厂; Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机 上海力申科学仪器有限公司; DGX-9143B-1 电热鼓风干燥箱 上海福玛实验设备有限公司; 电热恒温水温箱 上海医疗器械七厂。

1.2 实验方法

1.2.1 胆固醇提取工艺流程 鸭蛋黄渣→多次丙酮搅拌提取、离心→合并上清液→水浴加热浓缩→用工业乙醇加热回流除杂→过滤→滤液冷却结晶→粗胆固醇酯→加乙醇和硫酸→加热回流8h→冷却结晶→收集结晶→用95%的乙醇洗至中性

1.2.2 操作要点

1.2.2.1 提取 取100g 蛋黄渣, 分别加入80、100、120mL 的丙酮, 在25、35、45℃三种温度下, 进行搅拌

提取,提取时间分别为 1、1.5、2h,提取次数分别为 3、4、5 次。提取条件根据正交实验设计表(表 1)进行组合。

1.2.2.2 离心 每次搅拌结束后进行离心分离,收集合并上清液。

1.2.2.3 浓缩 将提取液在水浴锅中 65℃ 水浴,尽量蒸发丙酮,直至浓缩至原体积的 1/10 左右。

1.2.2.4 除杂 将以上浓缩液中加入约 10 倍体积的 95% 工业乙醇,然后 65℃ 加热回流 30min。

1.2.2.5 过滤 将上述回流后的液体过滤,收集滤液,弃滤渣。

1.2.2.6 结晶 将滤液放于 0~5℃ 处冷却,收集结晶,即粗胆固醇酯。

1.2.2.7 水解 在上述结晶中加 5 倍量 95% 的工业乙醇和 5%~6% 的硫酸,加热回流 8h。

1.2.2.8 结晶 液体放于 0~5℃ 下放置冷却,再次结晶。

1.2.2.9 洗涤结晶 收集结晶,用 95% 的工业乙醇洗至中性,即为粗品胆固醇。

1.2.2.10 干燥 将粗品胆固醇放入鼓风干燥箱中,65℃ 下干燥,得到干物质。

1.2.3 实验方案 根据预实验的结果,分别对丙酮用量、搅拌温度、搅拌时间和提取次数四个因素的范围进行了选定,并按四因素三水平设计了正交实验,因素水平见表 1,每组实验重复两次。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交因素水平表

水平	因素			
	A 丙酮用量 (mL/100g 蛋黄渣)	B 搅拌温度 (℃)	C 搅拌时间 (h)	D 提取 次数
1	80	25	1.0	3
2	100	35	1.5	4
3	120	45	2.0	5

1.2.4 纯度测定方法

1.2.4.1 气相色谱条件 石英毛细管柱(15m × 0.25mm i.d.,膜厚 0.1μm);载气为高纯氦;柱流量为 1.2mL/min;进样口温度 300℃;程序升温条件:起始温度 90℃,保持 1min;以 30℃/min 的速率升至 320℃,保持 3min;进样方式采用不分流进样,进样量为 1μL。

1.2.4.2 质谱条件 EI 电离方式,电子能量为 70eV,离子源温度 230℃,四级杆温度 150℃,质量扫描范围 50~650u,传输线温度为 280℃。

1.2.4.3 待测液制备 称取干燥后的胆固醇 0.5mg,定容到 100mL 的正己烷溶液中,过 0.45μm 滤膜待用。

1.2.5 计算方法 自动进样器进样,分别吸取 1、2、4、8、10mg/L 的胆固醇标准溶液 1μL 进样,通过全扫描方式得到总离子流图,选择丰度较高,质量数较大的作为定性和定量的碎片离子。选择 m/z 386、368、241 作为定性离子,m/z386 作为定量离子,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 提取实验结果

根据正交实验的条件,以粗胆固醇得率(100g 鸭蛋黄渣中粗胆固醇的含量)为指标,确定出提取的最佳条件,见表 2。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	粗胆固醇得率 (%)
1	1	1	1	1	1.75
2	1	2	2	2	1.50
3	1	3	3	3	1.90
4	2	1	2	3	2.20
5	2	2	3	1	1.25
6	2	3	1	2	1.10
7	3	1	3	2	2.05
8	3	2	1	3	1.20
9	3	3	2	1	1.30
K_1	5.15	6.00	4.05	4.30	
K_2	4.55	3.95	5.00	4.65	
K_3	4.55	4.30	5.20	5.30	
R	0.6	2.05	1.15	1.0	

根据表 2 级差分析结果得出,因素 B(搅拌温度)是影响胆固醇得率的主要因素,温度对于天然有机物的浸出有明显影响,在 25℃ 下粗胆固醇得率最高,说明胆固醇在 25℃ 时在丙酮中的溶解度最高,在此温度下对于提取胆固醇最有利。

由于原料颗粒内部溶质的溶解及扩散需要一定的时间,所以延长浸提时间有利于颗粒浸取完全,提高得率。随着搅拌时间的增加,粗胆固醇的得率提高。

用有机溶剂丙酮从蛋黄渣中提取胆固醇,得率并不因为用量的增加而升高。胆固醇的得率取决于胆固醇在丙酮中的溶解度。100g 的鸭蛋黄渣用 0.8 倍(80mL)的丙酮,便可达到最高的粗胆固醇得率。

最终得出的最佳处理组合为: $A_1 B_1 C_3 D_3$ 。

2.2 纯度测定结果

在选定的 GC-MS 条件下,测得样品中离子 386 的丰度值为 132979,根据标准曲线计算得到粗胆固醇中胆固醇的含量为 0.41mg,由此得胆固醇的纯度为 81.3%。胆固醇的标准品与样品的总离子流图见图 1,标准曲线见图 2。

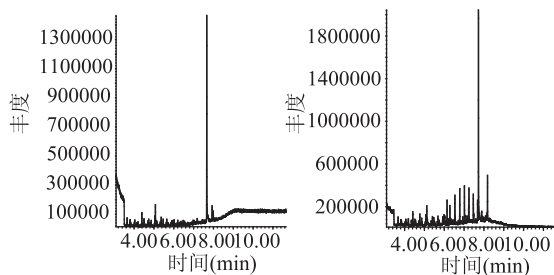


图 1 胆固醇标准品和蛋黄渣提取液的 GC-MS 总离子流图

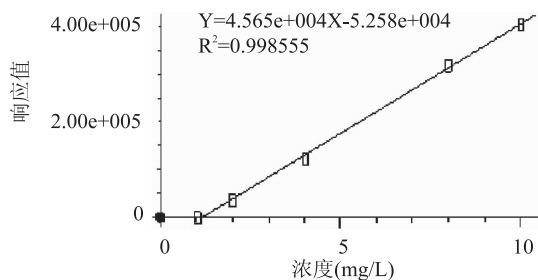


图 2 胆固醇含量与响应值的关系标准曲线

(下转第 309 页)

从图4可见,用碱处理的糖蛋白在240nm处的紫外吸收比没有用碱处理时明显增加。这表明发生了 β 消去反应,因此,燕窝糖蛋白中存在O型糖肽键。

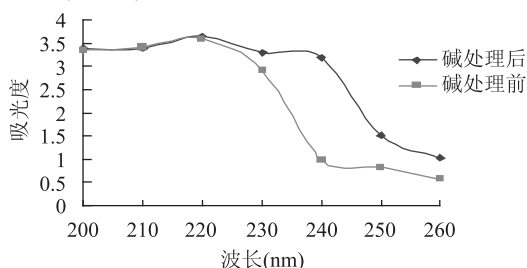


图4 糖蛋白用碱处理前后的紫外吸收谱图

2.2 抗体制备及纯化

免疫获得的抗血清效价为1:64000, Protein A 可以特异性地吸附血清中的IgG 抗体,因此采用 Protein A-Sepharose 4B 亲和层析纯化特异性抗体,将收集到的抗体用PBS 超滤后,以PBS 为空白,在280nm 下测定吸光度值为0.2415。根据经验公式得到抗体浓度为:

$$\text{浓度} = \frac{0.2415 \times 20}{1.35} = 3.58 \text{ mg/mL}.$$

3 讨论

糖蛋白粗品的获得,用有机溶剂沉淀糖蛋白,提取液的浓度对其沉淀效果起着很重要的作用,同时可减少有机溶剂的消耗。采用中空纤维超滤通过分子量截留实现液体的浓缩,不加热液体,能耗低,浓缩效率高。浓缩的同时,可滤除提取液中的多数小分子物质,包括无机盐、氨基酸、小分子蛋白、小分子糖等,起到部分纯化作用。

燕窝中的唾液酸糖蛋白呈弱酸性,因此采用 DEAE-Spharose Fast Flow 弱碱性阴离子交换树脂进行纯化,上样采用 Tris-HCl 缓冲液,首先通过静态实验,分别对上样缓冲液的pH、洗脱缓冲液的离子

强度进行测试,进一步通过柱层析确定了糖蛋白离子交换纯化条件。用 pH8.9 的 Tris-HCl 平衡足够时间,另外上样后吸附的流速要慢、时间要长最少要保持30min,否则影响吸附。凝胶过滤层析采用水作为流动相,不需要脱盐,减少了操作步骤。

糖蛋白是大分子化合物,其纯度标准不能用通常的小分子化合物纯度标准来衡量,因为即便是糖蛋白纯品,在微观上也是不均一的。糖蛋白的纯度只代表某一糖蛋白相似链长的平均分布,糖蛋白的纯品实际上是指一定分子质量范围内的糖蛋白均一组分^[4]。

参考文献

- [1] 张能荣.燕窝的成分和药理研究概况[J].中国生化药物杂志,1993(4):6~10.
- [2] 林洁茹,等.燕窝研究概述[J].中药材,2006,29(1):85~89.
- [3] 乌日罕,陈颖,等.燕窝真伪鉴别方法及国内外研究进展[J].检验检疫科学,2007,17(4):60~62.
- [4] 唐成康,高小平,徐大勇,等.山茱萸糖蛋白的纯化及部分理化性质研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(2):147~151.
- [5] 刘兴华,赵浩如.天然糖蛋白的提取、分离与纯化[J].药学进展,2006,30(12):543~546.
- [6] 朱科学,周惠明.麦胚水溶性糖蛋白的分离纯化及性质测定[J].无锡轻工大学学报,2003,22(5):83~85.
- [7] 张燕,李轻舟,等.肺炎克雷伯氏菌荚膜多糖的提取纯化及其对细胞免疫活性的影响[J].生物工程学报,2005,21(3):461~465.
- [8] 李亚娜,林永成,余志刚.甘薯糖蛋白的分离、纯化和结构分析[J].华南理工大学学报(自然科学版),2004,32(9):59~62.
- [9] 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000.352~356.

(上接第306页)

2.3 方法最低检出限

将浓度为100mg/L 的胆固醇标样逐级稀释,依次进样,观察其信噪比,可得方法的检出限为0.02mg/L($S/N=3$)。

2.4 精密度与回收率实验

按本实验处理的方法测定蛋黄渣中胆固醇的含量,重复6次,标准偏差 $S=0.023$,得相对标准偏差1.22%,结果显示该方法精密度高重现性好。

准确称取已知胆固醇含量的蛋黄渣,分别加入一定量的标准溶液处理成待测液,测得回收率在92.4%~96.3%。

3 结论

本课题基于工业化角度,采用有机溶剂(丙酮)提取法,从已提取了卵磷脂的鸭蛋黄渣中提取出胆固醇粗品,以达到对鸭蛋黄的充分利用。

通过对提取过程中工艺条件的研究,确定出提取胆固醇的最佳条件:丙酮用量为蛋黄渣质量的0.8倍,提取温度为25℃,每次搅拌时间为2h,提取次数为5次。研究了气-质联用法测定蛋黄渣中胆固醇

的含量,该方法的标准偏差 $S=0.023$,相对标准偏差 $RSD(n=6)=1.22\%$,仪器的最低检出限为0.02mg/L,胆固醇的回收率在92.4%~96.3%。

参考文献

- [1] 姜隆梅,马秀红,鞠端芬,张红.禽蛋胆固醇含量测定与合理利用[J].护理学杂志,2004,19(17):69~70.
- [2] 蔡俊秀.超临界 CO_2 萃取技术在食品工业中的应用[J].广东化工,2006(4):69~72.
- [3] 吕斌,石丹,张江华,江明,石云,戴康.分子印迹固相萃取生物样品中的胆固醇[J].华中科技大学学报(医学版),2005,34(5):639.
- [4] 王蕊.测定鸡蛋中胆固醇含量方法的探讨[J].畜禽业,2002(12):4~5.
- [5] 任彩芬,似学红.酶法直接测定血清总胆固醇的方法探讨[J].实用医技杂志,2005,12(8):2042.
- [6] 辜英杰,吴瑞,闫世平.高效液相色谱-蒸发散射检测器测定食品中胆固醇的含量[J].分析测试学报,2006,25(6):98~100.