

## 水产加工制品中胆固醇氧化物的分布与由来

李 楠

(天津商学院食品科学与工程系, 天津 300400)

**摘 要** 使用 GLC 和 GC/MS 对市售盐渍干燥、水煮后干燥和烤制的水产加工制品中的胆固醇氧化物进行了定性定量的测定。胆固醇氧化物的含量为  $8.3 \sim 188.0 \mu\text{g/g}$ 。其中检出了  $7\beta$ -羟基胆固醇 ( $2 \sim 55 \mu\text{g/g}$ )、 $7$ -酮基胆固醇 ( $2 \sim 60 \mu\text{g/g}$ )、环氧化胆固醇 ( $1 \sim 43 \mu\text{g/g}$ )、胆甾烷三醇 ( $1 \sim 8 \mu\text{g/g}$ ) 和  $25$ -羟基胆固醇 ( $0.2 \sim 1.8 \mu\text{g/g}$ )。并且对油脂的过氧化物价 (POV) 和胆固醇氧化物含量的相关性进行了探讨。认为水产品在加工和贮藏过程中, 胆固醇氧化物的生成与高度不饱和脂肪酸的过氧化反应有关。

**关键词** 胆固醇, 胆固醇氧化物, 水产制品, 氧化反应, 过氧化物价

近年来的研究已经证明, 胆固醇氧化物能对人体生理机能产生各种各样的不良影响, 它是导致动脉硬化<sup>[1]</sup>, 诱发变异原性癌症的因子<sup>[2]</sup>。因此, 存在于加工食品中的胆固醇氧化物, 越来越引起人们的极大关注<sup>[3~7]</sup>。

水产品自古以来就是人们日常摄取营养的主要来源之一。但是, 水产品中存在着含  $2 \sim 6$  个双键的 PUFA, 其中以  $20$  碳  $5$  烯酸 (EPA  $20:5n-3$ ) 和  $22$  碳  $6$  烯酸 (DHA  $22:6n-3$ ) 最不稳定, 在加工和贮藏过程中, 最易被氧化。为了了解胆固醇氧化物在水产加工制品中的分布状况, 剖析水产品中过氧化物与胆固醇氧化物的关系, 本研究利用气相色谱仪和质谱仪, 对照标准品, 对市售水产加工制品中的胆固醇氧化物进行了定量、定性的分析, 并且对试样的过氧化物价 (POV) 与胆固醇氧化物两者的关系进行了探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材 料

##### 1.1.1 实验材料

市售水产加工制品 10 种, 水分含量为  $9.1\% \sim 80.2\%$ 。盐渍干燥制品 (salted-dried): 鳀鱼 (anchovy); 太平洋鳕鱼 (pacific cod) 其中包括 A (冷风干燥), B (脱皮盐渍干

燥); 鳕鱼 (northern cod); 横带马鲛 (barracuda); 秋刀鱼 (pacific saury); 太平洋鲱鱼 (pacific herring)。水煮后干燥制品 (boiled-dried): 鳀鱼 (anchovy); 樱虾 (shrimp)。烤制加工制品 (roasted): 扇贝 (scallop)。

##### 1.1.2 标准品、试剂与仪器

胆固醇及其氧化物标准品: Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) 气相色谱用纯度  $99\%$  以上。

三甲基酯化 (TMS) 试剂 (Tokyo Kasei, Japan)  $1,1,1,3,3,3$ -Hexamethyldisilazne (HMDS), Trimethylchlorosilane (TMCS); 气相色谱仪 (GLC): 岛津 (Shimadzu) GC-12A; 数据处理器: 岛津 C-R6A; 质谱仪 (GC/MS): 岛津 QP 1000。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 脂质的抽出

根据 Bligh 和 Dyer 的脂质抽出法<sup>[8]</sup>, 对试样进行全脂质的抽出。

#### 1.2.2 脂质的皂化以及非皂化物的提取

精确称量抽出的脂质  $0.5 \text{ g}$ , 加入  $5\alpha$ -胆甾烷 ( $5\alpha$ -cholestane) 标准品三氯甲烷溶液, 作为内部标准, 并加入甲醇和 KOH 甲醇溶液, 在  $25^\circ\text{C}$  下皂化  $18 \text{ h}$ 。然后用水和乙醚对皂化液进行非皂化物的抽提。

### 1.2.3 非皂化物的三甲基酯化

在非皂化物中加入 1 mL 无水吡啶,使非皂化物溶解,再加入 1 mL HMDS 和 0.5 mL TMCS,在室温下反应 40 ~ 60 min。然后使用氮气除去溶剂,加入正己烷溶解,过滤得到气相色谱仪和质谱仪分析试样。

### 1.2.4 胆固醇氧化物的检出及同定

GLC 测定条件:色谱柱 non-polar methyl silicone liquid phase(内径:0.25 mm,柱长:25 m,膜厚 0.1  $\mu\text{m}$  Quadrex, New Haven, CT), 检出器 FID, 色谱柱温 180 ~ 250  $^{\circ}\text{C}$  3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 试样气化室温度 250  $^{\circ}\text{C}$ , 载体 He, 色谱柱入口压力 2  $\text{kg}/\text{cm}^2$ , 分离比率 1:1。

GC/MS 测定条件:质子检出柱 methyl silicone-phase open tubular fused-silica column(内径:0.25 mm,柱长:30 m,膜厚:0.1  $\mu\text{m}$ , Quadrex), 电子束能量 70 eV, 加速能量 3 kV, 离子源温度 210  $^{\circ}\text{C}$ , 分离器温度 250  $^{\circ}\text{C}$ , 扫描范围 100 ~ 570  $\text{m}/\text{z}$ , 扫描速度 9  $\text{s}$ 。

图 1A 是经盐渍干燥加工的鲢鱼制品,胆固醇及其氧化物的 GLC 检出图。同定方法:在试样中加入各标准品的混合液,经 GLC 检出后与各标准品的保留时间对照(图 1B)。此外,将各试样中胆固醇氧化物的质量图谱与各标准品的特征质量图谱对照,共同进行。

### 1.2.5 标准曲线的制作

取各种胆固醇氧化物的标准品,加入内部标准 5 $\alpha$ -胆甾烷,按照 1.2.3 和 1.2.4 的方法进行三甲基酯化,再使用气相色谱进行定量。根据各标准品的重量比率和相应检出峰面积比率,制作标准曲线。各标准曲线的直线回归率为  $r^2 = 0.993 \sim 0.998$ 。

### 1.2.6 过氧化物价(POV)的测定

根据 Lea 改良滴定法<sup>[9]</sup>和 Asakawa 和 Matsushita 微量比色法<sup>[10, 11]</sup>测定 POV。

## 2 结果与讨论

### 2.1 试样中胆固醇氧化物的分布与由来

各试样的总脂质含量、胆固醇及其氧化物的含量如表 1 所示。10 种试样检出了 7 $\beta$ -

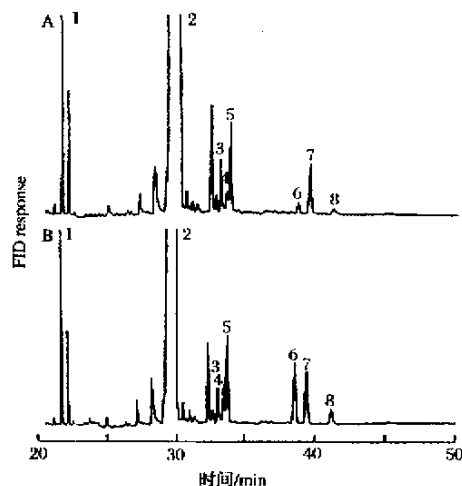


图 1A 盐渍干燥鲢鱼中,胆固醇氧化物三甲基酯衍生物 GLC 检出图;图 1B 在图 1A 试样中添加胆固醇氧化物标准品后 GLC 检出图。

1, 5 $\alpha$ -胆甾烷(内部标准);2, 胆固醇;3,  $\beta$ -环氧化胆固醇;4,  $\alpha$ -环氧化胆固醇;5, 7 $\beta$ -羟基胆固醇;6, 胆甾烷三醇;7, 7-酮基胆固醇;8, 25-羟基胆固醇

羟基胆固醇(7 $\beta$ -hydroxycholesterol);其中的 8 种试样检出了  $\alpha$ -环氧化胆固醇( $\alpha$ -epoxide)和  $\beta$ -环氧化胆固醇以及 7-酮基胆固醇(7-ketcholesterol), 5 种试样检出了胆甾烷三醇(cholestane triol)和 25-羟基胆固醇(25-hydroxycholesterol)。胆固醇氧化物含量最多的是经水煮后干燥和经盐渍干燥加工的鲢鱼,含量分别为 188.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  和 106.0  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

#### 2.1.1 7-羟基胆固醇和 7-酮基胆固醇

试样中 7 $\beta$ -羟基胆固醇和 7-酮基胆固醇的含量分别为 2.9 ~ 55.8  $\mu\text{g}/\text{g}$  和 2.2 ~ 60.6  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。其中,经水煮后干燥和盐渍干燥加工的鲢鱼,这 2 种氧化物的含量最多。

Yan<sup>[6]</sup>和 Park<sup>[12]</sup>根据研究结果指出,7-羟基胆固醇是胆固醇的早期氧化产物,是由 7-氢过氧化胆固醇脱水生成,在加热或干燥条件下 7-羟基胆固醇会进一步脱水生成 7-酮基胆固醇。因而,这两种胆固醇氧化物多存在于干燥、或经高温加热处理的食物中。同样,实验中使用的试样大都为经干燥处理的水产干制品,因此可以认为试样中这两种氧

化物是由相同的途径,即由 7-氢过氧化胆固醇脱水生成的,而且因干燥处理的方式不同其含量有所增减。2 种试样,盐渍横带马鲛和烤制的贝柱,由于它们的水分含量较高,因此只检出了 7-羟基胆固醇。

另外,以往的许多研究证明 7-羟基胆固醇有  $\alpha$ ,  $\beta$  2 种异构体同时存在<sup>[13~19]</sup>。在本实验的 GLC 分析中,由于 7 $\alpha$ -羟基胆固醇的保留时间与胆固醇的保留时间非常接近,因此未能检出。

### 2.1.2 5,6-环氧化胆固醇

试样中  $\alpha$ -环氧化胆固醇和  $\beta$ -环氧化胆固醇的含量分别为 0.9 ~ 18.0  $\mu\text{g/g}$  和 2.0 ~ 43.3  $\mu\text{g/g}$ ,经水煮后干燥加工的鲱鱼含量最多。

在胆固醇碳链上,5,6 位之间为双键结

构,容易与空气中的氧结合,形成氧环,从而生成胆固醇的环状氧化物  $\alpha$ -和  $\beta$ -环氧化胆固醇。从以往的研究得知,胆固醇 5,6-环氧化胆固醇并非胆固醇自动氧化的早期产物,而是在 7-过氧化氢胆固醇分解,生成 7-羟基胆固醇后,进一步氧化生成的环状氧化物<sup>[20]</sup>,并且随着氧化的条件不同, $\alpha$  与  $\beta$  的比率各异<sup>[21]</sup>。

以往许多的研究者从各种方式加工和保存的食品中检出了 5,6-环氧化胆固醇。Park 和 Adds<sup>[5]</sup>从冷冻干燥后放在玻璃瓶中,室温 22℃ 下贮藏 3 年的猪肉中检出  $\alpha$ : $\beta$  = 1:2.3。Sugino 等人<sup>[18]</sup>从喷雾干燥的蛋粉中检出  $\alpha$ : $\beta$  = 1:1.83。Sander 等人<sup>[22]</sup>从干酪粉中检出,  $\alpha$ : $\beta$  = 1:1。本研究中检出的 2 种环状氧化物的比率为  $\alpha$ : $\beta$  = 1:1.2 ~ 2.5。

表 1 水产加工制品胆固醇氧化物的含量

试 样	总脂质含量 /%	可食部分		胆固醇氧化物/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 可食部分					总 量
		胆固醇 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	7 $\beta$ -羟基 胆固醇	7-酮基 胆固醇	$\alpha$ -环氧化物	$\beta$ -环氧化物	三 醇	25-羟基 胆固醇	
盐渍干燥									
鲱鱼	7.1	2.3	30.6	38.1	13.1	18.7	5.3	0.2	106.0
太平洋鳕鱼									
A	1.6	1.4	2.8	2.3	0.9	2.3	0.9	0.2	9.4
B	1.5	0.8	2.9	2.2	1.1	2.0	1.4	—	9.6
鳕鱼	2.4	2.8	3.6	4.3	1.5	3.4	1.2	0.2	14.2
横带马鲛	7.3	0.6	3.3	—	1.3	1.3	—	—	5.9
秋刀鱼	18.0	0.8	9.9	7.8	—	—	—	—	17.7
太平洋鲱鱼	10.9	0.6	5.6	4.3	2.1	2.5	—	—	14.5
水煮后干燥									
鲱鱼	11.2	3.8	55.8	60.6	18.0	43.3	8.5	1.8	188.0
樱虾	6.2	6.5	3.7	4.0	—	—	—	0.6	8.3
烤制贝柱	2.1	0.9	31.8	—	6.9	8.6	—	—	47.3

### 2.1.3 胆甾烷三醇和 25-羟基胆固醇

以往的研究证明,胆甾烷三醇和 25-羟基胆固醇具有较强的细胞毒性,是引发动脉硬化的因子<sup>[1]</sup>。本实验中从 5 种试样中检出,含量分别为 0.9 ~ 8.5  $\mu\text{g/g}$  和 0.2 ~ 1.8  $\mu\text{g/g}$ ,其中经水煮后干燥加工的鲱鱼含量最多。

Peng<sup>[23,24]</sup>的研究报告认为,试样中的胆甾烷三醇是在 5,6-环氧化胆固醇生成后,吸收环境条件下的水分,使碳 5,6 位的氧环打开,生成了碳 3,5,6 位的三醇氧化物。在检出三醇氧化物的 5 种试样中,同时检出了碳

5,6 位的环状氧化物。而在未检出试样中,有两种盐渍干燥的产品,横带马鲛和太平洋鲱鱼,只检出了碳 5,6 位的环状氧化物,这可能与加工和贮藏的条件和方法有关。

胆固醇碳链结构中,侧链的氧化产物有 20-, 24-, 25-和 26-羟基胆固醇。同 7-羟基胆固醇一样,他们是由各碳位的氢过氧化物分解而生成<sup>[25,26]</sup>。胆固醇在低温下自动氧化,作为中间产物最初生成碳 7 位和碳 25 位的游离基,在加工或贮藏中,碳 25 位的游离基以及氧化物非常不稳定,只残留了碳 7 位的

游离基<sup>[27]</sup>,所以生成的 25-羟基胆固醇的数量比其他氧化产物的数量少。因此,本研究中只有 5 种试样检出了碳 25 位的胆固醇氧化物,而且在同一试样中,其他碳位氧化物的数量也比碳 25 位氧化物多。

## 2.2 过氧化物价与胆固醇氧化物

试样中脂质的 POV 以及胆固醇氧化物总含量如表 2、图 2 所示。从图 2 可以看出,除秋刀鱼和太平洋鲱鱼外(图 2 中未表示出),其他试样显示了 POV 高,胆固醇氧化物总含量多的结果。例如,经盐渍干燥和水煮后干燥加工的鲱鱼的 POV 分别为 29.2 meq/kg 和 67.7 meq/kg,胆固醇氧化物的总含量为 106.0  $\mu\text{g/g}$  和 188.0  $\mu\text{g/g}$ 。

秋刀鱼和太平洋鲱鱼于  $-30^{\circ}\text{C}$  的冷冻

箱中保存,使用时经水解冻,测得的 POV 较高,分别为 38.3 meq/kg 和 57.1 meq/kg,但是它们的胆固醇氧化物总含量,与经干燥加工的鲱鱼相比并不太高,分别为 17.7  $\mu\text{g/g}$  和 14.5  $\mu\text{g/g}$ 。这种结果可能是由于低温下胆固醇的氧化速度缓慢所致。

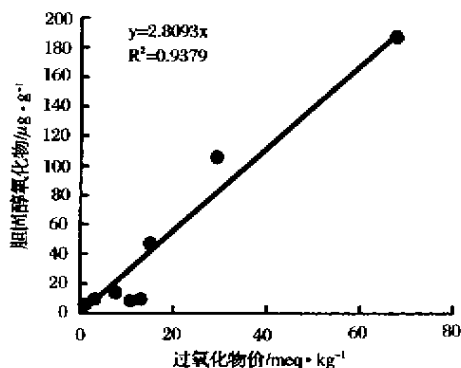


图 2 水产加工制品中脂质的过氧化物价与胆固醇氧化物含量的关系图

表 2 水产制品中胆固醇氧化物的含量与脂质的过氧化物价

试 样	太平洋 横带马鲛	太平洋 鳕鱼(A)	鳕 鱼	樱 虾	太平洋 鳕鱼(B)	烤制 贝柱	盐渍干燥 鳕鱼	秋刀鱼	太平洋 鲱鱼	水煮后干燥 鳕鱼
过氧化物价 /meq·kg <sup>-1</sup>	1.0	3.2	7.6	0.8	13.1	15.1	29.2	38.3	57.1	67.7
胆固醇氧化物 /μg·g <sup>-1</sup>	5.9	9.4	14.2	8.3	9.6	47.3	106.0	17.7	14.5	188.0

## 2.3 讨 论

根据以往有关的研究报告和专著<sup>[28]</sup>,对照实验数据,可以认为水产加工制品中的胆固醇氧化物,主要来自 2 个方面。

一方面,由于水产品中含有多个(2~6)双键的、化学性质非常不稳定的 PUFA,在利用日光或热风进行干燥处理,以及有氧贮存条件下,首先 PUFA 被氧化,产生游离基和过氧化物,与其共存于水产品中的胆固醇,在这些游离基和过氧化物的攻击下发生氧化,生成胆固醇的过氧化物,进而这些过氧化物分解,转变为胆固醇氧化物。制品中胆固醇的氧化程度和氧化物的生成量,随调理、加工和贮藏方法的不同而异。例如,经热风干燥的

盐渍鳕鱼和经日晒干燥的水煮鳕鱼,POV 和胆固醇氧化物含量都高。经过烘烤加工的扇贝,POV 仅为 15.1 meq/kg,由于受到加热调理其胆固醇氧化物的总含量较高,为 47.4  $\mu\text{g/g}$ 。而经冷风干燥的盐渍鳕鱼,其 POV 和胆固醇氧化物总含量比其他制品都低,为 3.2 meq/kg 和 9.4  $\mu\text{g/g}$ 。

另一方面,水产动物在生长期间,体内进行着新陈代谢活动,在体内胆固醇氧化酶的作用下生成的胆固醇氧化物<sup>[20]</sup>,在水产动物死后残留在体内。例如,横带马鲛是只经一夜盐渍的制品,其 POV 为 1.0 meq/kg,但是从制品的体内检出了胆固醇氧化物,含量为 5.9  $\mu\text{g/g}$ 。

## 3 结 论

(1) 根据检测结果, 市售的水产加工制品存在着胆固醇氧化物, 特别是干制品中含量较高。

(2) 根据本研究结果, 初步解明了水产加工制品中, 脂质的 *POV* 与胆固醇氧化物含量的关系。一般来说, 脂质的 *POV* 高, 胆固醇氧化物含量多。

(3) 水产加工制品中 PUFA 的氧化, 生成的游离基和过氧化物, 对共存的胆固醇的攻击, 可能是致使胆固醇氧化的主要原因之一 (这点还有待今后进一步研究实验的证明。)

## 参 考 文 献

- Peng S K. Am. J. Clin. Nutr. , 1979 , 32 :1033
- Watanabe K. J. Food Sci. , 1988 , 53 :1913
- Finocchiaro E T. J. Food Port. , 1983 , 46 :917
- Finocchiaro E T. JAOCS , 1984 , 61 :877
- park S W. J. Food Sci. , 1989 , 52 :1500
- Yan P. J. Am. Oil Chem. Soc. , 1990 , 67 :927
- Ryan T C. Ibid. , 1984 , 61 :668
- Bligh E G. Can. J. Biochem. , 1959 , 37 :911 ~ 917
- 日本油化学协会编. 基准油脂分析试验法. 东京 :日本油化学协会 , 1971. 2.4.12 ~ 71
- Asakawa T. J. Am. Oil Chem. Soc. , 1978 , 55 :619
- Asakawa T. Lipids , 1980 , 15 :965
- Park S W. J. Agric. Food Chem. , 1986 , 34 :653 ~ 659
- Fischer K H. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 1985 , 181 :14
- Higley N A. Meat Sci. , 1986 , 16 :175
- Chicoye E. J. Food Sci. , 1968 , 33 :581
- Naber E C. Poultry Sci. , 1985 , 64 :341
- Finocchiaro E. J. Am. Oil Chem. Soc. , 1984 , 61 :877
- Sugino K. J. Agric. Food Chem. , 1986 , 34 :36
- Ibrahim N. J. Food Sci. , 1990 , 55 :1488
- Smith L L. Cholesterol Autooxidation. New York : Plenum Press , 1981. 209 ~ 211
- Smith L L. Cancer Biochem. Biophys. , 1975 , 1 :79
- Sander B D. J. Food Sci. , 1989 , 54 :874
- Peng S K. World Rev. Nutr. Diet , 1984 , 44 :117
- Peng S K. Am. J. Clin. Nutr. , 1979 , 32 :1033
- Korahani V. Lipids , 1979 , 17 :703
- maerker G. J. Am. Oil Chem. Soc. , 1982 , 63 :452
- Sevilla C L. J. phys. Chem. , 1986 , 90 :2963
- 渡边乾二. 日本食品工业 , 1990 , 37 :830.

## Distribution and Origination of Cholesterol Oxides in Marine Products

Li Nan

( Department of Food Science and Engineering , Tianjin University of Commerce , Tianjin , 300400 )

**ABSTRACT** Cholesterol oxides in commercial marine products , including salted and dried , boiled and dried and roasted products , were qualitatively and quantitatively determined as trimethylsilyl ether derivatives by gas liquid chromatography and mass spectrometry. The levels of total cholesterol oxides ranged widely between 8.3  $\mu\text{g/g}$  in boiled and dried shrimp and 188.0  $\mu\text{g/g}$  in boiled and dried anchovy. 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol and 7-ketcholesterol were 2 ~ 55  $\mu\text{g/g}$  and 2 ~ 60  $\mu\text{g/g}$  in the edible portion , respectively. The levels of epimeric epoxides ( 1 ~ 43  $\mu\text{g/g}$  ) , cholestane triol ( 1 ~ 8  $\mu\text{g/g}$  ) and 25 - hydroxy - cholesterol ( 0.2 ~ 1.8  $\mu\text{g/g}$  ) were respectively low in most samples. Peroxide values seemed to correlate to the amounts of cholesterol oxides in the extracted oils. The results suggest cholesterol oxidation progresses in conjugation with peroxidation of polyunsaturated lipids during processing and subsequent storage of the marine products.

**Key words** cholesterol , cholesterol oxides , marine products , oxidation , peroxide value.