

超临界流体萃取分离、纯化鸡蛋 食品中游离胆固醇

高新¹, 张小燕^{1,2}, 白海涛¹, 李延¹, 范晓东²

(1. 西北大学化工学院 陕西 西安 710069; 2. 西北工业大学理学院 陕西 西安 710072)

摘 要:在含有鸡蛋的食品中, 比较两种分离测定胆固醇的方法: 一是传统的 Soxhlet (索氏提取) 法; 另一种是超临界二氧化碳萃取 (338bar, 40 °C) 并同时进行了固相分离 (与 ODS (装有特殊试剂的器皿) 静止相接有一个固相收集器)。鸡蛋面、饼干和甜点均匀混合, 然后加入内标物及无水 Na_2SO_4 , 每种样品的一部分通过联机超临界流体萃取-固相收集法 (SFE-SPE) 分离, 余下部分用石油醚通过传统方法分离。Soxhlet 分离后, 用 SPE 作进一步提纯。游离的胆固醇在 Soxhlet-SPE 和 SFE-SPE 分离方法中用毛细管气相色谱都可以检测到。两种分离方法得到同样结果。但是, 连续的 SFE-SPE 是 Soxhlet 方法的一个替代方法。因为它具有很多重要优点, 例如分析时间短和溶剂消耗少。

关键词: 超临界流体; 萃取; 分离; 纯化; 鸡蛋; 胆固醇

Study on Extraction, Separation and Purification of Free Cholesterol in Food Contained Egg by Supercritical Fluid

GAO Xin¹, ZHANG Xiao-yan^{1,2}, BAI Hai-tao¹, LI Yan¹, FAN Xiao-dong²

(1. College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Department of Chemical Engineering, Northwest Polytechnic University, Xi'an 710072, China)

Abstract: Two separation methods of cholesterol were compared in food contained egg: one was conventional Soxhlet method; the other was supercritical carbon dioxide extraction (338bar, 40 °C) along with solid phase separation (a solid phase collector was joined with ODS static phase). Egg noodles, biscuits and sweetmeat were equably mixed, and then was added in the internal standard and anhydrous Na_2SO_4 . One part of every sample was separated by SFE-SPE method, and the remainder was done against benzine purification by conventional method. After Soxhlet separation, the further purification was made by SPE. Dissociative cholesterol can be determined in the Soxhlet-SPE and SFE-SPE separation (with capillary gas chromatography). The same result was gained by two separation methods. However, the continuous SFE-SPE was a substitute for Soxhlet method, for with

收稿日期: 2005-07-09

基金项目: 陕西省教育厅产业化培育项目 (00KJ004)

作者简介: 高新 (1951-), 女, 副教授, 从事生物材料等方面的研究。

phospholipids [J]. Ana Biochemistry, 1997, 249: 67-78.

[7] HY Kim, et al. Separation of lipid classes by solid phase extraction [J]. Jof Lipid Research, 1990, 31: 2285-2289,

[8] Amelia Carekku, etc. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil [J]. JAOCS, 1997, 74(5).

[9] L Kwan et al. Fractionation of water soluble and insoluble components from egg yolk with organic solvent [J]. Jof Food Sci, 56(6), 1537-1541 (1991)

[10] Hanras C, JL Perrin. Isolation of soybean phospholipids [J]. JAOCS, 1991, 68: 804,

many important assets such as short analysis time and a few solvent needed.

Key words: supercritical fluid; extraction; separation; purification; egg; cholesterol

中图分类号: 0652.62

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)-08-0222-03

超临界流体萃取法(SFE)对于试样制备在分析领域中变得越来越流行,因为这种方法溶剂消耗低,检测试样所用时间短,所用试样少。这使提取物更纯,减少了外来物的干扰。人们提出使用超临界CO₂可以有几种方法来测定污染物(杀虫剂, PAHS, PCBS)、医药品和气味^[1]。通过SFE分析提取胆固醇的方法(旨在对食品质量控制)在干鸡蛋黄中使用^[2,3]。近来,通过SFE从面包制品、牛奶^[4]以及鸡肝^[5]中提取胆固醇。定量分析可分别采用酶法或HPLC法。在这里介绍一种样品的快速制备方法,其目的是为了测定含有鸡蛋食物中的胆固醇含量。为了实现这个目的,将超临界二氧化碳萃取和固相分离结合起来,这样既可以分离,也可以先于气相色谱分析之前的一个步骤中自动清除胆固醇。

1 材料与方法

1.1 试样及其制备

1.1.1 试样

下面所用到的食品购于超市。一份甜点,两份饼干(A和B),两份鸡蛋面。

1.1.2 试样的制备

将试样研磨好,称重并和已研磨好的内标物(1S)3-羟基-胆甾烷通过比例混合^[6]。约20mg 1S和研钵中同样数量的样品混合,将粉末和同样数量余下的样品混合。此过程一直重复直至所有的样品(约20g)被加完并且充分混合。适量的无水Na₂SO₄被加到每一份样品中。比例分别为鸡蛋面、饼干A样1:1,饼干B样1:3,甜点样1:10。混合后的每一份样被分成两部分去作两种分离。

1.2 方法

1.2.1 胆固醇溶剂分离

混合物(10~16g)加到Soxhlet设备的葡萄糖分离套筒中,并使用装有70ml 40~60 石油醚的烧瓶。每一份样品的分离时间是8h。醚分离物在水浴中用旋转蒸发器蒸干。每一种样品的脂肪含量被确定。然后,脂肪溶解于氯仿中,对应于100mg脂肪的等分试样在试验试管中氮气流下干燥。类脂体的分离物被溶解于500ml的正己烷/二乙醚(4:1,V/V)的混合液中。通过SPE用硅胶筒(被用于真空管中)提纯胆固醇^[7]。无水Na₂SO₄加到硅胶筒中并加入3ml正己烷。然后样品用注射器注入筒中,分四部分洗提。在每一次洗提后,筒不用干燥。废弃的前两部分是3ml的正己烷和3ml的正己烷/二乙醚混合液(4:1,V/V),第三、四部分用4ml正己烷/二乙醚混合

物(1:1,V/V)和3ml的甲醇洗提。这些成分混合,在氮气流下干燥。

1.2.2 胆固醇的SFE-SPE法

使用计算机控制的HP7680T分离机。它装备有一个可调节的阀和ODS固相收集器。流体CS₂(99.9980%)来源于SIAD(意大利),用在圆筒内。当样品和收集器中温度为40 时,250~700mg混合物样品被分离。二氧化碳密度为0.93mg/ml,其压力为338bar,流率为4.00ml/min,静态提取时间2.00min,动态提取时间8.00min。固相物质用2ml甲醇和2ml的正己烷洗涤,收集甲醇成分并且蒸发。

1.2.3 毛细管气相色谱

无水吡啶,六甲基乙硅烷和三乙基氯硅烷以体积比5:2:1混合制得TMS浓缩衍生物^[8]。用溶剂萃取,并用CO₂-SFE在室温下硅烷化反应20min(500μl硅烷化混合物添加到样品中),溶剂在氮气流下并且90 除去,剩余物溶解于100ml正乙烷中。毛细管气相色谱进行分析,此装置由Fisons GC 8160组成,并带有离子火焰检测器(FID)、100%二甲基硅氧烷静止相和25m×0.32mm,0.23μm薄膜厚度的毛细管柱。注射器和FID内温度300 ,烘箱温度设定在1 /min使其从265 上升至300 。载气(氮)流率设置为2ml/min,衰变率为1:50,注射量为1μl。

2 结果与讨论

表1表示了气相色谱测定胆固醇的结果。SFE-SPE法的结果是三次重复实验平均值。如表1所示,SFE-SPE方法的重现性较好,每组之间的标准差不在99%的置信区间内。如以前研究对粉末状蛋黄样品所确定的提取和复原条件给出一个满意的重现值(方差系数=7.68%,n=10)在此种方法中动态与静态提取混合在一起,为了提高分离的复原能力,提取以后,CO₂在固体收集器中被降压,固体收集器包含一个配有固定相(ODS)的一个筒,非常类似于SPE筒。在第一次洗涤过程中,胆固醇用甲醇从收集器中洗提出来。此后,用正乙烷洗涤,为了提取甘油三酸酯,然后重新生成固体收集器,这样在脂肪提取后,联机SPE可以自动进行,从而可以避免进一步的清理操作。3-羟基-胆甾烷被用作内标物,因为它是一种合成产品,在食物样品中的天然脂肪部分是缺少的,在以前研究中^[9],β-谷固醇用来做内标物,因为它在粉末状的蛋黄中不存在。两种方法所测定的游离胆固醇和内标物的毛细管气相色谱追踪图

见图1。

确定鸡蛋食品中的胆固醇含量代表了一个参数,一个控制食品中含有较低胆固醇或没有胆固醇的参数。而且,鸡蛋面中胆固醇的含量对于控制此种食品的真假是必须的。Soxhlet方法作为一种提取过程被广泛使用,适合于任何一种样品。然而它的提取时间则相对长(6~8h)。在提取时间里,操作者要经常在现场控制蒸

表1 采用Soxhlet仪器外加脱机固相提取(SPE)法与联机超临界流体萃取-固相收集法(SFE-SPE)测定游离胆固醇的结果

Table 1 Determination of free cholesterol(chol) with the Soxhlet apparatus coupled off-line with solid-phase extraction (SPE) and on-line supercritical fluid extraction-solid-phase extraction (SFE-SPE)

样本	SFE-SPE(联机)		Soxhlet提取+SPE(脱机)		样本中脂肪含量(%)
	样本中胆固醇(mg/g)	脂肪中的胆固醇(mg/100mg)	样本中胆固醇(mg/g)	脂肪中的胆固醇(mg/100mg)	
甜点	0.9	0.4	1.0	0.4	22.7
饼干 A	0.7	2.3	0.8	2.6	3.2
饼干 B	0.3	0.2	0.3	0.2	16.8
鸡蛋面	1.0	3.3	0.9	2.9	3.1
鸡蛋面	1.3	4.5	1.4	4.7	3.0

SFE-SPE法所测样本的相对标准偏差在4.25%和6.8%(n=3)之间变化。
The relative standard deviation of samples submitted to SFE-SPE varied between 4.25% and 6.8%(n=3).

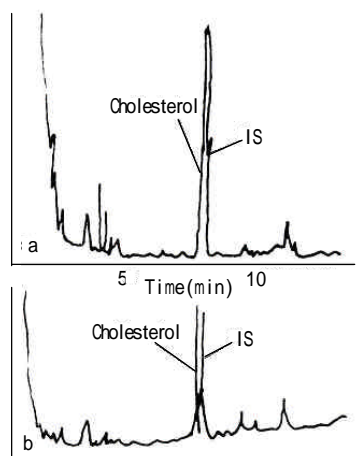


图1 a为毛细管气相色谱对Soxhlet提取与脱机固相收集法所获得的游离胆固醇和内标物的追踪;b为毛细管气相色谱对联机超临界流体萃取-固相收集法所获得的游离胆固醇和内标物的追踪

Fig.1 Capillary gas chromatography traces of free cholesterol and internal standard (IS) obtained with a Soxhlet extraction and off-line solid-phase extraction and b on-line supercritical fluid extraction-solid-phase extraction

馏。若仅是确定游离的胆固醇,需要作进一步的清洗,而且,在溶剂蒸发阶段,杂质也更多,这些杂质可以在气相色谱中发现。并且这个方法消耗大量有机溶剂。而超临界CO₂提取很大程度上降低了溶剂的消耗量和分析时间(用目前方法小于1h),而且减少操作人员数目。

在联机SFE-SPE之前样品的制备,即将提取的样品对分析而言一定是具有代表性的。样品粉碎,和内标物混合,惰性物质仔细加进去。不正确的研磨会产生两种缺点:一、在称重步骤中定量错误出现,因为样品和惰性材料没有均匀混合;二、减少了样品和超临界流体的联系,更多的路径影响了分离。

3 结论

带有联机SPE的超临界CO₂提取具有以下优点:减少了时间和使用的溶剂,很少的样品操作。通过减少溶剂的蒸发提高了纯度。这种方法一定会发展成为对每种样品均适用的方法。因为每种样品的结构特性和湿含量需要特别制备和特别的提取条件。还原,重现性和操作条件令人满意。这种方法是传统过程的一种替代,设备投资等可被使用频率更短的分析时间和过程自动化所补偿。

参考文献:

- [1] Chester T L, Pinkston J D, Raynie D E. Anal Chem, 1994, 66:12106-130.
- [2] Sun R, Sivik B, Larsson K. Fat Sci Technol, 1995, 97:214-219.
- [3] Boselli E, Caboni M F, Lercker G. Z Lebensm Unters Forsch A, 1997, 205: 356-359.
- [4] Jimenez-Canmona M M, Luque de Castro M D. Anal Chem, 1998, 70:2100-2103.
- [5] Li S, Maxwell R J, Lightfield A R. J Am Oil Chem Soc, 1999, 76:523-528.
- [6] Parrot E I. Comminution and blending of solids. Pharmaceutical technology[M]. Burgess Minneapolis, 1997. 37-38.
- [7] Boscho I O, Bertolomazzi R. Cholesterol and phytosterol determination in butter used for confectionary products[C]. In: Proceedings of the Congress International 'Chevreul' pour l'Etude des Corps Gras. ETIG, Paris, 1989. 193-198.
- [8] Sweeley C C, Beutley R, Makita M, et al. J Am Chem Soc, 1963, 85: 2497.
- [9] Tsai I S, Tjichi K, Hudson C A. Meehan Lipids, 2004, 15: 124-138.