

蛋黄胆固醇的分离及结构鉴定

吾惠婷, 许先敏, 王钰翎, 贾文敬, 郑永标, 黄建忠, 舒正玉

(福建师范大学 生命科学学院, 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 福州 350117)

摘要:为探索快速、操作简单的鸡蛋黄中胆固醇的提取分离工艺, 采用二元有机溶剂乙醇-正己烷混合溶剂萃取蛋黄中的油脂, 以胆固醇含量为指标, 通过单因素实验对蛋黄油萃取工艺条件进行优化, 利用硅胶色谱柱对蛋黄油中胆固醇进行分离纯化, 并通过核磁共振(NMR)进行结构鉴定。结果表明: 蛋黄油最佳萃取工艺条件为乙醇与正己烷体积比 1:1、液料比 3:1, 在此条件下胆固醇含量为 21.14 mg/g, 萃取率达 100%; 蛋黄油经硅胶色谱柱梯度洗脱后可获得单一组分, 经核磁共振氢谱(^1H NMR)和碳谱(^{13}C NMR)初步鉴定其分子结构为 27 个碳原子组成的具有甾体母核的固醇。综上, 二元有机溶剂萃取结合硅胶色谱柱分离可快速制备蛋黄胆固醇。

关键词: 蛋黄油; 胆固醇; 分离; 核磁共振; 结构鉴定

中图分类号: TS253.1; O482.53+2 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2025)07-0034-05

Isolation and structural identification of cholesterol from egg yolk

WU Huiting, XU Xianmin, WANG Yuling, JIA Wenjing,

ZHENG Yongbiao, HUANG Jianzhong, SHU Zhengyu

(National and Local Joint Engineering Research Center for Industrial Microbial Fermentation Technology, College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract: In order to explore a fast and simple process for the extraction and separation of cholesterol from egg yolk, the oil in egg yolk was extracted with a binary organic solvent (ethanol-*n*-hexane mixed solvent), and the cholesterol content was used as an index, the oil extraction conditions were optimized by single factor experiment. The cholesterol in the egg yolk oil was isolated and purified using silica gel column chromatography, and its structural identification was carried out by nuclear magnetic resonance (NMR). The results showed that the optimal extraction conditions for egg yolk oil were volume ratio of ethanol to *n*-hexane 1:1 and liquid to material ratio 3:1. Under these conditions, the cholesterol content was 21.14 mg/g, and the extraction rate was 100%. A single component was obtained from the egg yolk oil after gradient elution on a silica gel column, and its molecular structure was initially identified as a steroidal parent core sterol composed of 27 carbon atoms by nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy (^1H NMR) and carbon spectroscopy (^{13}C NMR). In conclusion, the binary organic solvent extraction combined with silica gel column chromatography can rapidly prepare cholesterol from egg yolk.

Key words: egg yolk oil; cholesterol; isolation; nuclear magnetic resonance; structural identification

收稿日期: 2023-10-27; 修回日期: 2025-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370802); 福建省自然科学基金项目(2021J01169); 福州市农业科技项目(2021-N-210)

作者简介: 吾惠婷(1999), 女, 硕士研究生, 研究方向为酶工程(E-mail) wuht1123@163.com; 许先敏(2001), 女, 硕士研究生, 研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail) xuxianminwy@163.com。吾惠婷与许先敏为共同第一作者。

通信作者: 舒正玉, 教授, 博士(E-mail) shuzhengyu@fjnu.edu.cn; 郑永标, 教授, 博士(E-mail) yongbiaozheng@fjnu.edu.cn。

以雄烯二酮、脱氢表雄酮等为代表的甾体类药物, 是仅次于抗生素的第二大临床用药^[1-2]。合成上述甾体类药物的原料主要来源途径有动物源胆固醇、植物源(含海藻类植物)甾醇和微生物源麦角固醇。胆固醇、甾醇和麦角固醇分子结构差异主要在于侧链取代基团的类型及构型、母核

环上的共轭不饱和键的位置及数量等^[3]。植物甾醇虽然是甾体类药物生产的主要原料,但其提取工艺烦琐,生产成本和产品价格相对较高,市场供应不稳定^[4]。微生物源麦角固醇是利用微生物作为底盘细胞,生物合成甾醇,虽然在技术上已具备可行性,但目前尚未实现工业化生产,供应量有限^[5-6]。

近些年来,随着我国禽养殖、蛋制品加工规模的日益扩大,利用现代生物技术促进蛋制品的高值化生产加工,对促进传统农业的产业升级具有重要的意义^[7-8]。从鸡蛋中分离纯化胆固醇、磷脂、溶菌酶等高附加值成分,可有效提高鸡蛋价值。鸡蛋中的胆固醇含量丰富,而且主要集中在蛋黄中,新鲜鸡蛋黄含有 30.6% 的脂质(主要由胆固醇、磷脂和脂肪酸酯组成)^[9],是分离制备胆固醇的优良原料^[10-11]。

从蛋黄中分离胆固醇的第一步是从蛋黄中萃取蛋黄油,然后再从蛋黄油中分离胆固醇。当前从蛋黄中萃取蛋黄油的研究报道中,围绕超临界 CO₂ 萃取工艺的研究报道较多^[12-13]。但该技术对设备依赖度高,操作复杂,生产成本低,一定程度上制约了其在工业化生产中的推广普及。因此,建立操作简单、成本低廉的蛋黄胆固醇快速制备技术,仍有其实际应用价值,如不仅有助于实现蛋黄的高值化利用,还可延伸蛋制品深加工产业链,为下游生物制药提供稳定的原料供应途径。本文以具有良好食品安全性、价格低廉的乙醇与正己烷混合溶剂为萃取剂从鸡蛋黄中萃取蛋黄油,对萃取工艺进行优化,利用硅胶色谱柱从蛋黄油中快速分离蛋黄胆固醇,并经核磁共振(NMR)分析初步鉴定其分子结构,以期操作简单、能够快速获得高纯度胆固醇的工艺提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜鸡蛋,福建吉百年食品有限公司;胆固醇标准品、硫酸铁铵、磷酸、冰醋酸、硫酸、正己烷、石油醚、乙酸乙酯、甲醇、乙醇、氘代氯仿等,均为分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;铁矾贮备液和铁矾显色液,参照 GB 5009.128—2016《食品安全国家标准 食品中胆固醇的测定》要求配制。

正相柱层析硅胶[50~75 μm(200~300 目)]、GF254 薄层层析硅胶,青岛海洋化工有限公司;硅胶层析柱(15 mm×150 mm);JNM-ECZ600R/S1 型核磁共振仪,日本 JEOL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡蛋黄中脂肪和胆固醇含量的测定

脂肪含量的测定参照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》第一法(索氏抽提法);胆固醇含量的测定参照 GB 5009.128—2016《食品安全国家标准 食品中胆固醇的测定》第三法(比色法),标准曲线线性回归方程为 $y = 2.5514x - 0.0187$ ($R^2 = 0.9998$; x 为胆固醇的质量; y 为 570 nm 下的吸光度)。

1.2.2 蛋黄油的萃取

蛋黄油的萃取参照魏作君等^[14]的方法,并略作修改。将鸡蛋打碎,分离蛋清和蛋黄,称取一定量的蛋黄,按一定液料比加入萃取剂(乙醇与正己烷混合溶剂),涡旋振荡混匀后,置于摇床上 220 r/min、室温下振荡 45 min,于 12 000 r/min 离心 5~10 min,收集液相(液相分为上下两层,上层主要是正己烷及其萃取物,下层主要是乙醇及其萃取物,分别收集),并利用旋转蒸发仪回收溶剂。上层液相旋转蒸发后的残留物即为蛋黄油,测定其胆固醇含量(结果以蛋黄中的含量计算)。

1.2.3 蛋黄油中胆固醇的色谱柱分离纯化

称取 50 mg 蛋黄油溶于 1 mL 三氯甲烷中,然后转移到硅胶色谱柱中,依次用 50 mL 石油醚、体积比分别为 100:1、80:1、60:1、40:1、20:1、10:1、8:1、5:1、2:1 的石油醚-乙酸乙酯溶液和甲醇以 5.0 mL/min 的流速进行梯度洗脱,按照 1 mL/管的体积分步收集洗脱液。各管洗脱液进行薄层层析[以石油醚-乙酸乙酯(体积比 10:1)为展开剂]展开,显色,将具有相同比移值(R_f 值)的洗脱液合并,其中不同体积比的石油醚-乙酸乙酯中只有体积比 100:1 的洗脱液中含有胆固醇,且由其共收集到 5 个具有不同 R_f 值的洗脱液。将洗脱液用旋转蒸发仪回收溶剂,收集残余物。

1.2.4 薄层层析鉴定

用石油醚溶解 1.2.3 中的残余物并定量为 1 mg/mL;用乙酸乙酯配制质量浓度为 1 mg/mL 的胆固醇标准溶液。将胆固醇标准溶液和石油醚溶解液分别用毛细管点样到硅胶板上(重复点样 3~4 次),以石油醚-乙酸乙酯(体积比 10:1)为展开剂进行薄层层析,显色,对照胆固醇标准溶液的 R_f 值对残余物进行定性。

1.2.5 核磁共振(NMR)分析

收集并合并上述与胆固醇标准品具有相同 R_f 值的洗脱液(石油醚与乙酸乙酯体积比为 100:1 的部分洗脱液),用旋转蒸发仪回收溶剂,制备固态蛋

黄胆固醇样品。将 10 mg 蛋黄胆固醇固体样品转移到核磁管中,用氘代氯仿(CDCl_3)溶解并配制质量浓度为 16.67 mg/mL 的溶液,进行核磁共振碳谱(^{13}C NMR, 150 MHz)和氢谱(^1H NMR, 600 MHz)测定,并解析其结构式。

2 结果与分析

2.1 鸡蛋黄中脂肪和胆固醇含量

经测定,鸡蛋黄中的脂肪含量为 28.73 g/100 g,略低于谢绿绿^[15]的实验结果(32.66 ~ 34.41 g/100 g)。鸡蛋黄中的胆固醇含量为 2.15 g/100 g,高于 Batkowska 等^[16]报道的鸡蛋黄中的胆固醇含量(1.2 g/100 g)。鸡蛋黄中胆固醇的含量与母鸡品种、饲喂母鸡的饲料等多种因素有关^[15-16]。

2.2 蛋黄油的萃取工艺条件优化

2.2.1 液料比

在萃取剂乙醇与正己烷体积比为 1:1,液料比分别为 1:1、2:1、3:1 和 4:1 下,按 1.2.2 方法萃取蛋黄油,探究液料比对蛋黄胆固醇萃取效果的影响,结果如图 1 所示。

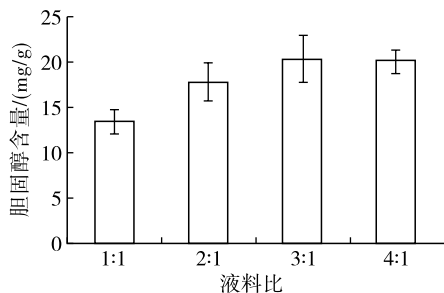


图 1 液料比对蛋黄胆固醇萃取效果的影响

Fig. 1 Effect of liquid to material ratio on the extraction of cholesterol from egg yolk

由图 1 可以看出,当液料比为 3:1 时,蛋黄胆固醇的含量最高,为 20.27 mg/g。

2.2.2 萃取剂乙醇与正己烷体积比

在液料比为 3:1,乙醇与正己烷体积比分别为 3:1、1:1、1:3 下,按 1.2.2 方法萃取蛋黄油,探究乙醇与正己烷体积比对蛋黄胆固醇萃取效果的影响,并与单一乙醇或正己烷萃取进行比较,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,当乙醇与正己烷体积比为 1:1 时,蛋黄胆固醇含量最高,为 21.14 mg/g,胆固醇萃取率达到 100%,胆固醇含量显著高于石油醚-丙酮(体积比 6:1)萃取体系的萃取效果(13.94 mg/g)^[17]。乙醇与正己烷(体积比 1:1)组成的复合萃取剂的萃取效果显著优于单一乙醇(5.01 mg/g)或正己烷(0.084 mg/g)作为萃取剂的萃取效果。

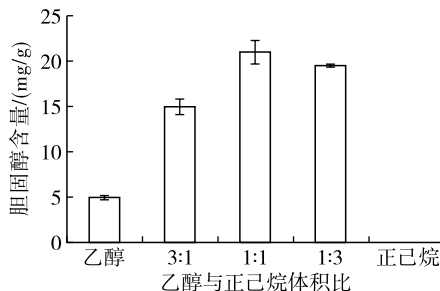


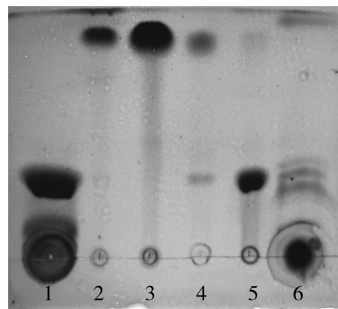
图 2 乙醇与正己烷体积比对蛋黄胆固醇萃取效果的影响

Fig. 2 Effect of volume ratio of ethanol to *n*-hexane on the extraction of cholesterol from egg yolk

综上,在乙醇与正己烷体积比 1:1、液料比 3:1 条件下,按照 1.2.2 方法提取蛋黄油,并以其为原料进行胆固醇的分离。

2.3 蛋黄油中胆固醇的硅胶色谱柱分离结果

按 1.2.3 方法对蛋黄油中胆固醇进行色谱柱分离,获得 5 个不同 Rf 值的洗脱液(体积比 100:1 的石油醚-乙酸乙酯)回收溶剂后的残余物,按 1.2.4 方法进行定性,并与甲醇洗脱液的残余物样品进行比较,结果见图 3。



注:1. 胆固醇标准品;2~5. 石油醚-乙酸乙酯(体积比 100:1)洗脱液;6. 甲醇洗脱液

Note: 1. Cholesterol standard; 2-5. Petroleum ether-ethyl acetate (volume ratio 100:1) eluate; 6. Methanol eluate

图 3 不同溶剂洗脱液脱溶后的薄层层析结果

Fig. 3 Thin layer chromatography analysis result of eluate collected from different solvents

由图 3 可知:仅在 5 号样品中获得与胆固醇标准样品具有相同 Rf 值的单一组分;在甲醇洗脱液样品中,虽检测到与胆固醇标准品具有类似 Rf 值的化合物,但考虑到该化合物为甲醇洗脱物,与胆固醇具有强烈疏水性的性质差异较大,因此后续实验中未对该化合物进行深入研究。5 号样品经气相色谱(检测方法参考文献^[18],采用高温色谱柱,省去皂化步骤)进一步分析发现,其仅显示一个对称色谱峰。因此,后续将此样品进行 NMR 分析。

2.4 蛋黄胆固醇的结构解析

用核磁共振检测上述样品的碳谱和氢谱。在

^{13}C -NMR(150 MHz, CDCl_3) 谱中(图 4a), 共检出 27 个碳信号, 包括: 5 个甲基, 即 δ_{C} 11.9 (C-18)、19.5 (C-19)、18.8 (C-21)、22.7 (C-26) 和 22.9 (C-27); 11 个亚甲基, 即 δ_{C} 37.3 (C-1)、31.7 (C-2)、42.4 (C-4)、36.3 (C-7)、21.2 (C-11)、39.9 (C-12)、23.9 (C-15)、28.3 (C-16)、29.8 (C-22)、24.4 (C-23) 和 39.6 (C-24); 8 个次甲基, 即 δ_{C} 71.9 (连氧, C-3)、121.8 (sp^2 杂化的烯烃, C-6)、32.0 (C-8)、50.2 (C-9)、56.8 (C-14)、56.2 (C-17)、35.9 (C-20) 和 28.1 (C-25); 以及 3 个季碳, 即 δ_{C} 36.6 (C-10)、42.4 (C-13) 和 140.9 (sp^2 杂化, C-5)。在 ^1H -NMR(600 MHz, CDCl_3) 谱中(图 4b), 可以观察到如下的氢信号: δ_{H} 0.68 (d, $J = 2.2$ Hz, 3H, H_3 -18), 0.86 (o, 3H, H_3 -26),

0.87 (o, 3H, H_3 -27), 0.91 ~ 0.93 (o, 4H, H_3 -21/9 α), 0.97 ~ 1.01 (o, 6H, H -1 α /14 α /22b/ H_3 -19), 1.05 ~ 1.18 (o, 6H, H -12 α /15 β /17 α /23b/24a/24b), 1.25 ~ 1.37 (o, 4H, H -16 β /20/22a/23a), 1.41 ~ 1.57 (o, 7H, H -2 β /7 α /8 β /11 α /11 β /15 α /25), 1.83 ~ 1.84 (o, 3H, H -1 β /2 α /16 α), 1.96 ~ 2.02 (o, 2H, H -7 β /12 β), 2.25 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H -4 β), 2.31 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H -4 α), 3.52 (m, 1H, H -3 α), 5.30 (1H, —OH) 和 5.36 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H -6)。其中, 在低场区 δ_{H} 5.36 为一个烯氢质子信号, δ_{H} 3.52 为连氧次甲基氢信号, δ_{H} 5.30 羟基氢信号, δ_{H} 0.68、0.86、0.87、0.91 和 δ_{H} 1.01 为 5 个甲基氢质子信号。结合核磁共振谱数据并与文献[19]比较, 推测出该化合物为胆固醇, 结构式如图 5 所示。

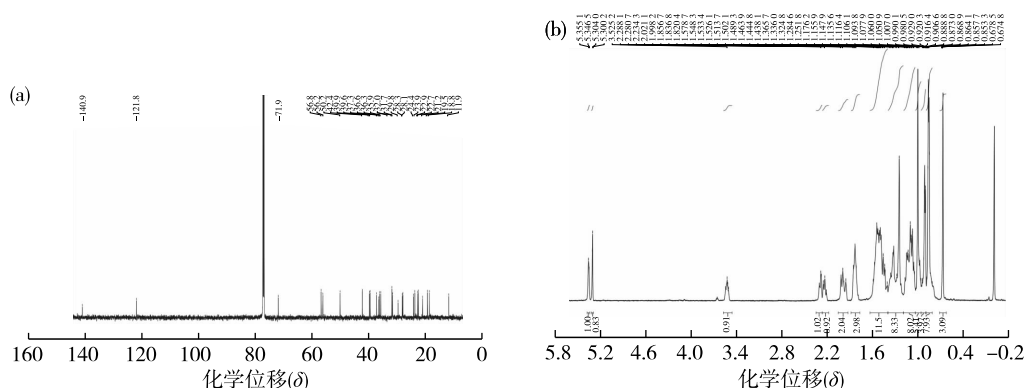


图 4 蛋黄胆固醇的 ^{13}C NMR (a) 和 ^1H NMR (b) 谱图

Fig. 4 ^{13}C NMR (a) and ^1H NMR (b) spectra of cholesterol from egg yolk

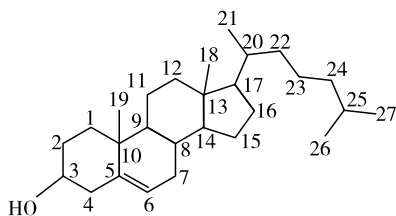


图 5 NMR 鉴定的蛋黄胆固醇分子结构式

Fig. 5 Molecular structural formula of cholesterol from egg yolk inferred from NMR spectra

3 结 论

本研究以鸡蛋黄为原料, 采用乙醇-正己烷混合溶剂萃取其中的油脂, 以胆固醇含量为指标, 采用单因素实验对萃取工艺条件进行优化, 利用硅胶柱层析对蛋黄油中胆固醇进行分离纯化, 并通过 NMR 进行结构鉴定, 得到以下结论。

(1) 蛋黄油最佳萃取工艺条件为乙醇-正己烷体积比 1:1、液料比 3:1, 在此条件下胆固醇含量为 21.14 mg/g, 胆固醇萃取率达 100%。上述萃取体系即使在室温下, 其黏度适中, 上下相自动分离明显, 同时胆固醇主要分布于上相(正己烷)中, 萃取

效果良好, 因此本文未对温度这一参数进行优化(如加热可进一步提高胆固醇的溶解度等)。后续研究工作中, 有必要对萃取时间进行优化(如超声波辅助萃取, 有可能进一步缩短萃取时间)。

(2) 相对传统的从各类油脂中分离纯化单一组分的胆固醇(或胆固醇酯), 常常涉及酯化、皂化、多次萃取及蒸馏等复杂工艺, 甚至最后还需要利用重结晶等方法去杂, 费时费力, 利用硅胶柱层析对蛋黄油中胆固醇进行分离纯化, 可快速获得满足结构鉴定用纯度的适量蛋黄油胆固醇, 可操作性强, 且操作简单。

(3) 基于 NMR, 初步鉴定出蛋黄胆固醇分子结构中共有 27 个碳原子, 具有甾体母核结构, C_3 具有羟基侧链, C_{10} 、 C_{13} 和 C_{20} 具有甲基侧链, C_{17} 具有异辛基侧链, C_5 和 C_6 之间有一个不饱和键。第 10 位、第 13 位和第 20 位的碳原子为手性碳原子, 因此与上述 3 个碳原子连接基团的构象类型还有待进一步深入分析。

后续可利用生物技术修饰、改造胆固醇分子, 以

进一步拓展胆固醇的应用领域,并推动蛋黄油的高值化利用,如利用脂肪酶对胆固醇 3 号位置的羟基进行酯化得到产物胆固醇酯,其脂溶性远高于胆固醇自身。胆固醇酯可作为护肤品原料,发挥稳定剂、柔润剂和保水剂的功能。利用胆固醇羟化酶和胆固醇氧化酶等生物催化剂,将胆固醇转化为肾上腺皮质激素、孕激素和雄性激素等药物合成的中间体,如雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)、雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)和 9α -羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮(9α -OHAD)等。

参考文献:

- [1] BATTH R, NICOLLE C, CUCIUREAN I S, et al. Biosynthesis and industrial production of androsteroids [J/OL]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(9): E1144 [2023-10-27]. <https://doi.org/10.3390/plants9091144>.
- [2] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA J L. New insights on steroid biotechnology [J/OL]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 958 [2023-10-27]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00958>.
- [3] HE W S, ZHU H, CHEN Z Y. Plant sterols: Chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(12): 3047-3062.
- [4] FERNANDES P, CABRALI M S. Phytosterols: Applications and recovery methods [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(12): 2335-2350.
- [5] 熊亮斌, 宋璐, 赵云秋, 等. 甾体化合物绿色生物制造: 从生物转化到微生物从头合成 [J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 942-963.
- [6] SHTRATNIKOVA V Y, SCHELKUNOV M I, DONOVA M V. Genome sequencing of steroid-producing bacteria with illumina technology [M]//*Microbial sterols*. New York: Springer, 2017: 29-44.
- [7] 王仕豪. 我国禽类养殖现状及对食品安全的影响 [J]. *现代食品*, 2022, 28(17): 145-147.
- [8] 马美湖. 我国蛋与蛋制品加工重大关键技术筛选研究报告(三) [J]. *中国家禽*, 2005, 27(1): 3-7.
- [9] XIAO N, ZHAO Y, HE W, et al. Egg yolk oils exert anti-inflammatory effect via regulating Nrf2/NF- κ B pathway [J/OL]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 114070 [2023-10-27]. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114070>.
- [10] LI J, ZHAI J, GU L, et al. Hen egg yolk in food industry: A review of emerging functional modifications and applications [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 115: 12-21.
- [11] LIU Y F, OEY I, BREMER P, et al. Bioactive peptides derived from egg proteins: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(15): 2508-2530.
- [12] POURMORTAZAVIS M, SAGHAFI Z, EHSANI A, et al. Application of supercritical fluids in cholesterol extraction from foodstuffs: A review [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(8): 2813-2823.
- [13] PUERTAS G, VÁZQUEZ M. Advances in techniques for reducing cholesterol in egg yolk: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(14): 2276-2286.
- [14] 魏作君, 钱国平, 王慧, 等. 有机溶剂中胆固醇溶解性能研究 [C]//*第二届全国化学工程与生物化工年会论文集*. 北京: 中国化工学会, 2005.
- [15] 谢绿绿. 鸡蛋黄中脂质成分及脂肪酸组成分析研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [16] BATKOWSKA J, DRABIK K, BRODACKI A, et al. Fatty acids profile, cholesterol level and quality of table eggs from hens fed with the addition of linseed and soybean oil [J/OL]. *Food Chem*, 2021, 334: 127612 [2023-10-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127612>.
- [17] 许标, 陈梅兰, 余佑荣, 等. 萃取剂对鸡蛋黄中胆固醇提取影响 [J]. *科技通报*, 2014, 30(3): 39-42.
- [18] FENTON M, SIMJ S. Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1991, 540: 323-329.
- [19] TABERD F, LI R, ANSON C M. Isolation of cholesterol from an egg yolk [J]. *J Chem Educ*, 2011, 88(11): 1580-1581.