

Magdalena Rudzińska, Tomasz Kazuś, Erwin Wąsowicz

Akademia Rolnicza w Poznaniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Sterole i ich utlenione pochodne w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno

Sterols and their oxidized derivatives in refined and cold pressed seed oils

Słowa kluczowe: oksyfitosterole, oleje roślinne, chromatografia gazowa, spektrometria masowa

Key words: oxyphytosterols, plant oils, gas chromatography, mass spectrometry

Celem niniejszej pracy była identyfikacja pochodnych utlenionych kampesterolu, stigmasterolu i β -sitosterolu techniką GC/MS oraz oznaczanie ich zawartości w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno. Analizie poddano oleje z oliwek, rzepakowy, sojowy, słonecznikowy, kukurydziany tłoczone na zimno i rafinowane oraz olej lniany wysokolinolowy tłoczony na zimno. Oleje te zostały zakupione w sieci detalicznej. Zawartość fitosteroli oznaczano metodą chromatograficzną GC, po uprzednim zmydleniu próby. W celu oznaczenia zawartości oksyfitosteroli, proces zmydlenia zastąpiono transestryfikacją, następnie próbę oczyszczano na kolumnkach SPE – NH₂, siliowano i analizowano techniką GC/MS. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najwyższą zawartością steroli charakteryzowały się oleje kukurydziany i rzepakowy, zarówno rafinowane jak i tłoczone na zimno. Do identyfikacji oksyfitosteroli w próbach olejów wykorzystano mieszaninę pochodnych utlenionych kampesterolu, β -sitosterolu oraz stigmasterolu otrzymaną po ogrzewaniu standardów. Zastosowane metody analityczne pozwoliły na oznaczenie zawartości 18 pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach roślinnych. We wszystkich olejach stwierdzono obecność tych związków, ale w olejach rafinowanych ich zawartość była około 2–2,5 razy wyższa niż w olejach tłoczonych na zimno. Najniższą zawartość pochod-

The goal of this work were identification of oxidation products of campesterol, stigmasterol and β -sitosterol using GC/MS technique and determination of their content in plant oils both refined and cold pressed. The following oils purchased at local shops were analyzed: olive, rapeseed, soy, sunflower, corn oils cold pressed and refined and cold pressed flax oil. The content of phytosterols was determined using GC method after sample saponification. For the determination of oxyphytosterols saponification process was replaced by transesterification, followed by sample clean-up on SPE-NH₂ cartridges. Cleaned samples were derivatized (silylated) and analyzed by GC/MS. Based on our findings rapeseed and corn oils both refined and cold pressed were the ones with the highest in phytosterols contents. For the identification purposes a mixture of oxidized campesterol, β -sitosterol and stigmasterol derivatives obtained by appropriate phytosterols standards heating was used. Utilized analytical methods enabled the determination of phytosterols oxidation products (POP) in plant oils. POPs were present in each sample but their contents in refined oils was 2–2.5 times higher than in cold pressed ones. The lowest levels of oxyphytosterols were detected in cold pressed rapeseed oil 7.83 $\mu\text{g/g}$ of oil and the highest in refined sunflower oil — 48.76 $\mu\text{g/g}$ of oil. Epimers 7-hydroxy-phytosterols and 7-keto-phytosterols were predominant

nych utlenionych fitosteroli stwierdzono w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno — 7,83 µg/g oleju, a najwyższą w oleju słonecznikowym rafinowanym — 48,76 µg/g oleju. W przypadku olejów tłoczonych na zimno były to głównie epimery 7-hydroksy-fitosteroli oraz 7-keto-fitosteroli, natomiast w olejach rafinowanych największą grupę stanowiły pochodne epoksydowe. Jednocześnie stwierdzono, że skład procentowy frakcji oksyfitosterolowej różni się znacznie od składu procentowego frakcji fitosterolowej.

group in cold pressed oils whereas epoxy derivatives were predominant compound in refined oils. Percentage composition of oxyphytosterol fraction differed from phytosterol percentage fraction.

Wprowadzenie

Badania dotyczące metabolizmu i powstawania pochodnych utlenionych cholesterolu są szeroko prowadzone w świecie (Finocchiaro, Richardson 1983; Pie i in. 1991; Przygoński i in. 2000; Schmarr i in. 1996; Wąsowicz 1997). Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano ponad 100 związków powstających w czasie utleniania cholesterolu, tzw. oksysteroli (zwanymi także pochodnymi utlenionymi cholesterolu — PUC). Badania kliniczne udowodniły działanie mutagenne, kancerogenne, cytotoksyczne i aterogenne tych związków. Dorobek naukowy dotyczący oksyfitosteroli, związków powstających w procesie utleniania steroli roślinnych, jest dużo skromniejszy. Podobieństwo w budowie chemicznej pochodnych utlenionych fitosteroli i pochodnych utlenionych cholesterolu sugeruje, że związki te mają analogiczny wpływ na organizm człowieka, a ich metabolizm przebiega tymi samymi drogami. Wprawdzie już w 1965 roku Niewiadomski i Sawicki (1965) stwierdzili obecność 7-hydroksy-sitosterolu i 7-keto-sitosterolu w olejach rafinowanych, to jednak badania te nie były szeroko prowadzone. Jest to związane z brakiem na rynku standardów pochodnych utlenionych fitosteroli oraz z dużą liczbą i niską zawartością tych związków w produktach spożywczych. Oznaczanie oksyfitosteroli wymaga zastosowania kosztownej i czasochłonnej metodyki przygotowania próby do analizy wysokosprawnymi technikami chromatograficznymi. Badania modelowe oraz próby oznaczania pochodnych utlenionych β -sitosterolu były prowadzone przez Yanishlevą i in. (1980). Zaproponowali oni mechanizm autooksydacji β -sitosterolu jako reakcji wolnorodnikowej zachodzącej głównie przy węglu C7 pierścienia B tej cząsteczki. Powstający 7-wodoro-nadtlenek rozpada się na 7-hydroksy- lub 7-keto-sitosterol. Może też reagować z obojętną cząsteczką sterolu tworząc pochodne 7-hydroksy- i epoksy-sterol. Pochodne epoksydowe przyłączając cząsteczkę wody tworzą triol — związek uważany za najbardziej toksyczną (reaktywną) pochodną utlenioną steroli.

W 1997 roku Dutta i Appelqvist (Dutta, Appelqvist 1997; Dutta 1997) opublikowali widma masowe standardów pięciu głównych pochodnych utlenionych (7α - i 7β -hydrokso-, 7-keto-, epokso-steroli, trioli) kampesterolu, β -sitosterolu i stigmasterolu. W pracy tej stwierdzili, iż widma te mogą różnić się w zależności od stosowanych parametrów analizy GC/MS oraz matrycy w badanym materiale biologicznym. Dutta (1997) zastosował opracowaną metodykę do oznaczania oksyfitosteroli w oleju słonecznikowym, oleju rzepakowym zmieszonym z palmowym oraz oleju słonecznikowym wysokooleinowym. Podczas dwudniowego smażenia frytek w oleju słonecznikowym i rzepakowym nastąpił wzrost zawartości tych związków o ponad 40%. Natomiast w oleju słonecznikowym wysokooleinowym nastąpił wzrost zawartości oksyfitosteroli tylko o 20%. Jednak najwięcej tych związków oznaczono we frytkach smażonych na oleju słonecznikowym wysokooleinowym.

Pierwszą część niniejszej pracy poświęcono otrzymywaniu mieszaniny pochodnych utlenionych kampesterolu, stigmasterolu i β -sitosterolu poprzez ogrzewanie standardów fitosteroli. Otrzymane mieszaniny pozwoliły na uzyskanie danych retencyjnych i widm masowych oksyfitosteroli. W następnym etapie pracy oznaczono zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno zakupionych w sieci detalicznej.

Materialy

W sieci detalicznej miasta Poznania zakupiono następujące oleje roślinne przeznaczone do badań:

- oleje tłoczone na zimno — kukurydziany, lniany wysokolinolowy, rzepakowy, słonecznikowy, sojowy, oliwa z oliwek Extra Virgin;
- oleje rafinowane — kukurydziany, rzepakowy, słonecznikowy, sojowy, oliwa z oliwek.

Odczynniki

Standardy β -sitosterolu i stigmasterolu zakupiono w firmie Merck. Standard β -sitosterolu zawierał 76% β -sitosterolu, 8% kampesterolu, 1,33% stigmasterolu i 14% awenasterolu. Zakupiony standard stigmasterolu zawierał 97% stigmasterolu oraz 2,6% β -sitosterolu.

Standardy 5α -cholestanu i 19-hydrokso-cholesterolu (19-OH-C) zakupiono w firmie SIGMA-ALDRICH.

Rozpuszczalniki organiczne o wysokiej klasie czystości zakupiono w firmach: ROMIL (chloroform, metanol, heksan), Merck (metanolan sodu, eter metylo-tert-butylowy — MTBE) i SIGMA (aceton, eter etylowy).

Odczynniki siliujące BSTFA + 1% TMCS oraz Sylon HTP zakupiono w firmie SIGMA-ALDRICH.

Trioleinian glicerolu zakupiono w firmie FLUKA.

Metody badań

Oznaczanie liczby nadtlenkowej wykonano wg PN-ISO 3960 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.

Oznaczanie liczby anizydynowej wykonano wg PN-93/A-86926 Tłuszcze roślinne jadalne. Oznaczanie liczby anizydynowej oraz obliczanie wskaźnika oksydacji tłuszczu Totox.

Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych

Skład kwasów tłuszczowych w badanych olejach oznaczono według metody opisanej przez Wąsowicza (1984), która polega na uzyskaniu estrów metylowych kwasów tłuszczowych przez transestryfikację 0,4 N metanolanem sodu i analizie chromatograficznej GC na kolumnie kapilarnej Innowax 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm.

Ogrzewanie standardów fitosteroli

W celu uzyskania mieszaniny pochodnych utlenionych fitosteroli przygotowano 2,5% roztwory standardów β-sitosterolu i stigmasterolu w trioleinianie glicerolu. Następnie roztwory te ogrzewano w aparacie Oxidograph w temperaturze 180°C przez 4 godziny w obecności tlenu. W uzyskanych próbach oznaczano pochodne utlenione kampesterolu, β-sitosterolu i stigmasterolu techniką GC/MS.

Oznaczanie zawartości fitosteroli

W celu oznaczenia zawartości steroli roślinnych w badanych olejach zaadaptowano metodę GC opisaną przez Pie i in. (Pie, Spahis, Seillan 1991) do analizy cholesterolu. W tym celu 0,2 g oleju poddawano zmydlaniu 1 N roztworem KOH w metanolu. Frakcję niezmydlającą ekstrahowano eterem etylowym i siliowano odczynnikiem BSTFA z 1% dodatkiem TMCS. Analizę chromatograficzną wykonano na aparacie firmy Hewlett-Packard 5890 II stosując kolumnę kapilarną DB-5 30 m × 0,32 mm × 0,25 μm. Analizę prowadzono w stałej temperaturze pieca 290°C. Jako standard wewnętrzny stosowano 5α-cholestan. Identyfikację analizowanych związków wykonano na podstawie porównania ich czasów retencji ze standardami.

Oznaczanie zawartości oksyfitosteroli

Do oznaczania pochodnych utlenionych fitosteroli adaptowano metodę opisaną przez Przygońskiego i in. (2000), a przeznaczoną do analizy produktów utlenienia cholesterolu. Badany olej w ilości 200 μl poddawano transestryfikacji metanolanem sodu. Po ekstrakcji chloroformem próbkę frakcjonowano na kolumnkach

SEP-PAK NH₂, sililowano i analizowano techniką chromatografii gazowej na aparacie Trace 2000 sprzężonym ze spektrometrem masowym firmy Finnigan-Polaris Q. Analizę prowadzono na kolumnie kapilarnej HP-5MS 50 m × 0,2 mm × 0,32 μm w temperaturze programowanej: 50–270°C wzrost 25°C/min, 270–290°C wzrost 1°C/min, 290°C utrzymywano przez 95 minut. Temperatura źródła jonów — 250°C, temperatura interfejsu GC/MS — 280°C, tryb pracy SCAN w zakresie mas 100–650, energia jonizacji 70 eV. Jako standard wewnętrzny dodawano do próby 19-hydroksy-cholesterol w ilości 10 μg.

Nazwy zwyczajowe i chemiczne oraz skróty pochodnych utlenionych fitosteroli zidentyfikowanych w badanych olejach podano w tabeli 1.

Omówienie wyników

Ocena jakości badanych olejów roślinnych

Oleje roślinne zakupione do badań pochodziły z różnych źródeł. W celu określenia ich jakości wykonano oznaczenia liczby nadtlenkowej i liczby anizydynowej, obliczono wskaźnik Totox (tab. 2) oraz oznaczono skład kwasów tłuszczowych (tab. 3). Zarówno wśród olejów tłoczonych na zimno, jak i rafinowanych najwyższą liczbę nadtlenkową oraz liczbę anizydynową posiadała oliwa z oliwek. Również olej słonecznikowy tłoczony na zimno charakteryzował się wysokim wskaźnikiem Totox (43,09). Natomiast najniższy wskaźnik Totox stwierdzono w oleju rzepakowym rafinowanym (8,0) oraz oleju kukurydzianym tłoczonym na zimno (11,74). Wszystkie zakupione w sieci detalicznej oleje posiadały ważny okres przydatności do spożycia, a tak wysokie liczby nadtlenkowe mogą świadczyć o złych warunkach ich transportu i magazynowania.

Skład kwasów tłuszczowych (tab. 3) większości badanych olejów był typowy. W oleju sojowym tłoczonym na zimno oraz rafinowanym skład kwasów tłuszczowych może świadczyć o zafałszowaniach.

Zawartość fitosteroli w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno

W badanych olejach oznaczono zawartość takich steroli roślinnych jak brassikasterol, kampesterol, stigmasterol, β-sitosterol i awenasterol. Przedstawione w tabeli 4 wyniki są średnią z trzech powtórzeń. Współczynnik zmienności uzyskanych wyników wynosił 6,3%. Na rysunku 1 przedstawiono przykładowy chromatogram rozdziału steroli roślinnych w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno.

Tabela 1

Pochodne utlenione fitosteroli zidentyfikowane i oznaczone w olejach roślinnych
Phytosterol oxidation products identified and determined in plant oils

Nazwa zwyczajowa <i>Trivial name</i>	Nazwa chemiczna <i>Chemistry name</i>	Skrót <i>Short name</i>
7 α -hydroksy-kampesterol <i>7α-hydroxy-campesterol</i>	5-cholesten-24 α -metylo-3 β ,7 α -diol <i>5-cholesten-24α-methyl-3β,7α-diol</i>	7 α -OH-K <i>7α-OH-C</i>
7 α -hydroksy-stigmasterol <i>7α-hydroxy-stigmasterol</i>	5,22-cholestadien-24-etylo-3 β ,7 α -diol <i>5,22-cholestadien-24-ethyl-3β,7α-diol</i>	7 α -OH-St <i>7α-OH-St</i>
7 α -hydroksy-sitosterol <i>7α-hydroxy-sitosterol</i>	5-cholesten-24 α -etylo-3 β ,7 α -diol <i>5-cholesten-24α-ethyl-3β,7α-diol</i>	7 α -OH-Sito <i>7α-OH-Sito</i>
7 β -hydroksy-kampesterol <i>7β-hydroxy-campesterol</i>	5-cholesten-24 α -metylo-3 β ,7 β -diol <i>5-cholesten-24α-methyl-3β,7β-diol</i>	7 β -OH-K <i>7β-OH-C</i>
7 β -hydroksy-stigmasterol <i>7β-hydroxy-stigmasterol</i>	5,22-cholestadien-24-etylo-3 β ,7 β -diol <i>5,22-cholestadien-24-ethyl-3β,7β-diol</i>	7 β -OH-St <i>7β-OH-St</i>
7 β -hydroksy-sitosterol <i>7β-hydroxy-sitosterol</i>	5-cholesten-24 α -etylo-3 β ,7 β -diol <i>5-cholesten-24α-ethyl-3β,7β-diol</i>	7 β -OH-Sito <i>7β-OH-Sito</i>
β -epoksy-kampesterol <i>β-epoxy-campesterol</i>	cholestan-24 α -metylo-5 β ,6 β -epoksy-3 β -ol <i>cholestan-24α-methyl-5β,6β-epoxy-3β-ol</i>	β -epoksy-K <i>β-epoxy-C</i>
β -epoksy-stigmasterol <i>β-epoxy-stigmasterol</i>	22-cholesten-24-etylo-5 β ,6 β -epoksy-3 β -ol <i>22-cholesten-24-ethyl-5β,6β-epoxy-3β-ol</i>	β -epoksy-St <i>β-epoxy-St</i>
β -epoksy-sitosterol <i>β-epoxy-sitosterol</i>	cholestan-24 α -etylo-5 β ,6 β -epoksy-3 β -ol <i>cholestan-24α-ethyl-5β,6β-epoxy-3β-ol</i>	β -epoksy-Sito <i>β-epoxy-Sito</i>
α -epoksy-kampesterol <i>α-epoxy-campesterol</i>	cholestan-24 α -metylo-5 α ,6 α -epoksy-3 β -ol <i>cholestan-24α-methyl-5α,6α-epoxy-3β-ol</i>	α -epoksy-K <i>α-epoxy-C</i>
α -epoksy-stigmasterol <i>α-epoxy-stigmasterol</i>	22-cholesten-24-etylo-5 α ,6 α -epoksy-3 β -ol <i>22-cholesten-24-ethyl-5α,6α-epoxy-3β-ol</i>	α -epoksy-St <i>α-epoxy-St</i>
α -epoksy-sitosterol <i>α-epoxy-sitosterol</i>	cholestan-24 α -etylo-5 α ,6 α -epoksy-3 β -ol <i>cholestan-24α-ethyl-5α,6α-epoxy-3β-ol</i>	α -epoksy-Sito <i>α-epoxy-Sito</i>
Triol-kampesterolu <i>Dihydroxy-campesterol</i>	cholestan-24 α -metylo-3 β ,5,6 β -triol <i>cholestan-24α-methyl-3β,5,6β-triol</i>	Triol-K <i>Triol-C</i>
Triol-stigmasterolu <i>Dihydroxy-stigmasterol</i>	22-cholesten-24-etylo-3 β ,5,6 β -triol <i>22-cholesten-24-ethyl-3β,5,6β-triol</i>	Triol-St <i>Triol-St</i>
Triol-sitosterolu <i>Dihydroxy-sitosterol</i>	cholestan-24 α -etylo-3 β ,5,6 β -triol <i>cholestan-24α-ethyl-3β,5,6β-triol</i>	Triol-Sito <i>Triol-Sito</i>
7keto-kampesterol <i>7keto-campesterol</i>	5-cholesten-24 α -metylo-3 β -ol-7-on <i>5-cholesten-24α-methyl-3β-ol-7-one</i>	7keto-K <i>7keto-C</i>
7keto-stigmasterol <i>7keto-stigmasterol</i>	5,22-cholestadien-24-etylo-3 β -ol-7-on <i>5,22-cholestadien-24-ethyl-3β-ol-7-one</i>	7keto-St <i>7keto-St</i>
7-keto-sitosterol <i>7keto-sitosterol</i>	5-cholesten-24 α -etylo-3 β -ol-7 on <i>5-cholesten-24α-ethyl-3β-ol-7-one</i>	7keto-Sito <i>7keto-Sito</i>

Tabela 2

Wartość liczby nadtlenkowej, anizydynowej i wskaźnik Totox dla badanych olejów roślinnych — *Peroxide value, anisidine value and Totox value for analysed plant oils*

Oleje roślinne <i>Plant oils</i>	Liczba nadtlenkowa <i>Peroxide value</i>	Liczba anizydynowa <i>Anisidine value</i>	Wskaźnik TOTOX <i>Totox value</i>
<i>Oleje tłoczone — Cold pressed oils</i>			
Kukurydziany — <i>Corn</i>	5,00	1,74	11,74
Lniany — <i>Flax</i>	6,56	0,50	13,62
Oliwa z oliwek Extra Virgin <i>Extra Virgin Olive Oil</i>	39,36	6,64	85,36
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	12,72	4,04	29,48
Słonecznikowy — <i>Sunflower</i>	20,78	1,53	43,09
Sojowy — <i>Soybean</i>	11,52	2,14	25,18
<i>Oleje rafinowane — Refined oils</i>			
Kukurydziany — <i>Corn</i>	7,40	8,64	23,40
Oliwa z oliwek — <i>Olive oil</i>	18,02	10,70	46,74
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	3,20	1,57	8,00
Słonecznikowy — <i>Sunflower</i>	10,40	4,31	25,10
Sojowy — <i>Soybean</i>	6,20	2,28	14,70

Tabela 3

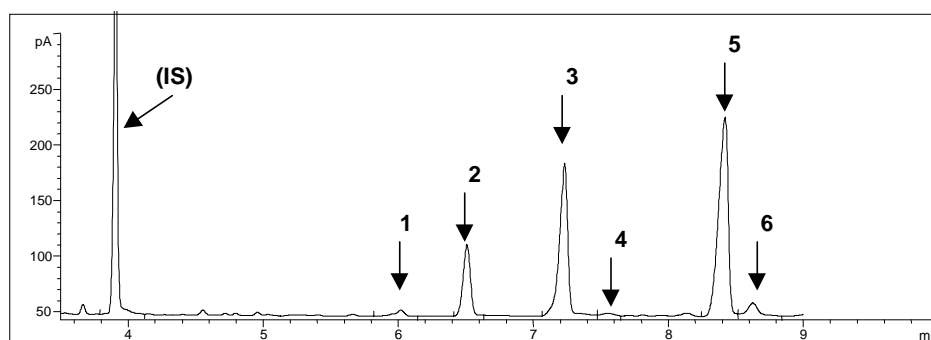
Skład procentowy kwasów tłuszczowych badanych olejów roślinnych
Fatty acids composition of analysed plant oils

Oleje roślinne — <i>Plant oils</i>	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1
<i>Oleje tłoczone — Cold pressed oils</i>											
Kukurydziany — <i>Corn</i>	0,1	12,4	0,1	1,9	31,1	52,7	0,9	0,4	0,3	0	0
Lniany — <i>Flax</i>	0,1	5,8	0,1	3,0	13,6	73,8	3,2	0,1	0,1	0,1	0
Oliwa z oliwek Extra Virgin <i>Extra Virgin Olive Oil</i>	0	10,6	0,8	2,8	77,1	7,1	0,6	0,5	0,3	0	0
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	0,1	4,6	0,2	1,6	61,0	20,1	9,8	0,5	1,4	0,3	0,4
Słonecznikowy — <i>Sunflower</i>	0,1	5,5	0,4	5,2	26,1	60,9	0,6	0,3	0,2	0,8	0
Sojowy — <i>Soybean</i>	0,2	7,6	0,1	3,5	28,5	55,2	3,0	0,3	0,2	0,7	0,1
<i>Oleje rafinowane — Refined oils</i>											
Kukurydziany — <i>Corn</i>	0	10,9	0,1	1,8	28,5	57,2	0,8	0,4	0,3	0	0
Oliwa z oliwek — <i>Olive oil</i>	0	13,9	1,6	2,4	69,8	10,8	0,6	0,4	0,3	0	0
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	0	4,8	0,2	1,7	60,8	19,8	9,3	0,6	1,6	0,3	0,7
Słonecznikowy — <i>Sunflower</i>	0	6,1	0,1	4,3	24,5	63,6	0,4	0,3	0,2	0,6	0
Sojowy — <i>Soybean</i>	0	9,8	0,1	3,5	33,1	45,9	7,8	0,4	0,6	0,3	0,3

Tabela 4

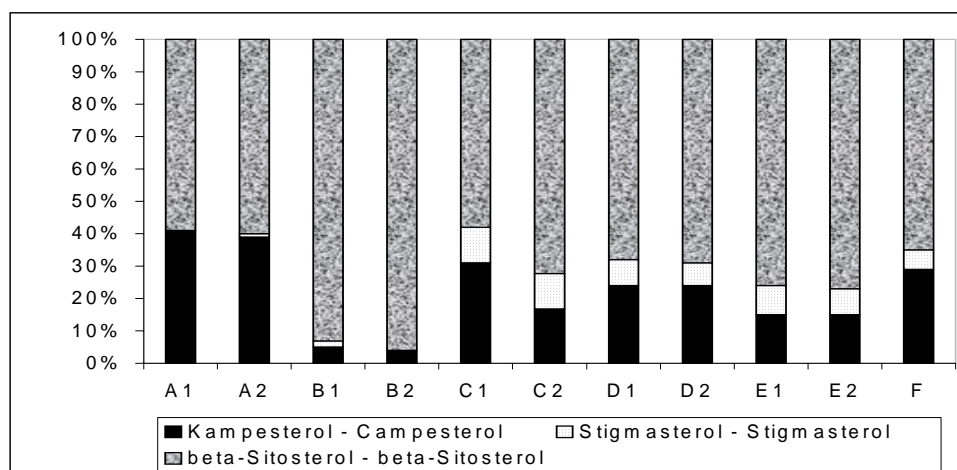
Zawartość fitosteroli w olejach roślinnych — *Contents of phytosterols in plant oils*

Oleje roślinne <i>Plant oils</i>	Zawartość steroli — <i>Contents of phytosterols</i> [mg/g oleju]					
	brassika-sterol <i>brassica-sterol</i>	kampe-sterol <i>campe-sterol</i>	stigma-sterol <i>stigma-sterol</i>	β -sito-sterol <i>β-sito-sterol</i>	awena-sterol <i>avena-sterol</i>	suma <i>sum</i>
<i>Oleje tłoczone na zimno — Cold pressed oils</i>						
Kukurydziany — <i>Corn</i>	nd	2,12	0,63	6,14	0,86	9,75
Lniany — <i>Flax</i>	nd	0,75	0,15	1,69	0,52	3,11
Oliwa z oliwek Extra Virgin <i>Extra Virgin Olive Oil</i>	nd	0,05	nd	1,14	0,24	1,42
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	1,04	2,52	0,06	3,82	0,25	7,69
Słonecznikowy — <i>Sunflower</i>	nd	0,44	0,24	2,37	0,20	3,25
Sojowy — <i>Soybean</i>	nd	0,49	0,32	2,16	0,26	3,23
<i>Oleje rafinowane — Refined oils</i>						
Kukurydziany — <i>Corn</i>	nd	1,65	0,57	4,73	0,73	7,68
Oliwa z oliwek — <i>Olive Oil</i>	nd	0,07	0,03	1,44	0,31	1,85
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	0,98	2,45	nd	3,52	0,30	7,25
Słonecznikowy — <i>Sunflower</i>	nd	0,47	0,29	2,44	0,29	3,49
Sojowy — <i>Soybean</i>	nd	1,21	0,42	2,26	0,30	4,19

nd — nie oznaczono — *not detected*

Rys. 1. Rozdział chromatograficzny steroli oleju rzepakowego tłoczonego na zimno: 1 — cholesterol; 2 — brassikasterol; 3 — kampesterol; 4 — stigmasterol; 5 — β -sitosterol; 6 — awenasterol; (IS) — 5 α -cholestan (standard wewnętrzny) — *Gas chromatogram of phytosterols from cold pressed rapeseed oil: 1 — cholesterol; 2 — brassicasterol; 3 — campesterol; 4 — stigmasterol; 5 — β -sitosterol; 6 — avenasterol; (IS) — 5 α -cholestane (internal standard)*

Całkowita zawartość fitosteroli w badanych olejach tłoczonych na zimno wynosiła od 1,42 mg/g w oliwie z oliwek Extra Virgin do 9,75 mg/g w oleju kukurydzianym. Zawartość steroli w olejach rafinowanych była podobna i wynosiła od 1,85 mg/g w oliwie z oliwek do 7,68 mg/g w oleju kukurydzianym. Zarówno całkowita zawartość steroli, jak i skład procentowy frakcji sterolowej (rys. 2) odpowiednich olejów rafinowanych i tłoczonych na zimno były porównywalne. We wszystkich badanych olejach głównym sterolem był β -sitosterol, który stanowił od około 50% frakcji sterolowej oleju rzepakowego do około 80% frakcji sterolowej oliwy z oliwek.



Oleje rafinowane — *Refined oils*:

A1 — olej rzepakowy — *rapeseed oil* B1 — oliwa z oliwek — *olive oil* C1 — olej sojowy — *soybean oil*

D1 — olej kukurydziany — *corn oil* E1 — olej słonecznikowy — *sunflower oil*

Oleje tłoczone na zimno — *Cold pressed oils*:

A2 — olej rzepakowy — *rapeseed oil*; B2 — oliwa z oliwek — *Extra Virgin olive oil*

C2 — olej sojowy — *soybean oil* D2 — olej kukurydziany — *corn oil*

E2 — olej słonecznikowy — *sunflower oil* F — olej lniany — *flax oil*

Rys. 2. Skład procentowy frakcji sterolowej olejów roślinnych — *Phytosterols composition in plant oils*

Identyfikacja pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach roślinnych

Z powodu braku na rynku standardów pochodnych utlenionych fitosteroli przeprowadzono dodatkowe doświadczenie w celu uzyskania próby zawierającej te związki. Przygotowane 2,5% roztwory standardów fitosteroli w trioleinianie glicerolu poddano ogrzewaniu w 180°C przez 4 godziny w atmosferze tlenu. Następnie izolowano pochodne utlenione fitosteroli według opisanej metodyki i analizowano techniką GC/MS jako pochodne sililowe. W ten sposób uzyskano rozdział chromatograficzny pochodnych utlenionych kampesterolu, β -sitosterolu

oraz stigmasterolu. Uzyskane widma masowe posłużyły do opracowania dróg fragmentacji poszczególnych oksyfitosteroli. W tabeli 5 przedstawiono jony charakterystyczne i ich intensywności dla sześciu pochodnych utlenionych (7α - i 7β -hydroksy-, α i β -epoksy, triol-, 7-keto-) trzech głównych steroli roślinnych

Tabela 5

Jony charakterystyczne pochodnych siliowych utlenionych fitosteroli
Characteristic ions of silyl oxidation products of phytosterols

Fitosterol <i>Phytosterol</i>	Jony charakterystyczne pochodnych siliowych utlenionych fitosteroli <i>Characteristic ions silyl oxidation products of phytosterols</i>
7α -OH-Kampesterol <i>7\alpha-OH-Campesterol</i>	M^+ (jon molekularny) — 560 (1), 470 (100), 429 (14), 380 (16), 355 (8), 281 (22), 207 (22), 129 (10)
7α -OH-Sitosterol <i>7\alpha-OH-Sitosterol</i>	M^+ — 574 (1), 484 (100), 469 (3), 394 (1), 355 (1), 297 (1), 281 (3), 207 (4), 129 (13)
7α -OH-Stigmasterol <i>7\alpha-OH-Stigmasterol</i>	M^+ — 572 (10), 482 (100), 377 (1), 351 (1), 282 (2), 253 (3), 207 (5), 129 (13)
7β -OH-Kampesterol <i>7\beta-OH-Campesterol</i>	M^+ — 560 (1), 470 (100), 380 (18), 355 (9), 341 (6), 281 (9), 267 (6), 207 (13)
7β -OH-Sitosterol <i>7\beta-OH-Sitosterol</i>	M^+ — 574 (2), 484 (100), 469 (3), 429 (1), 394 (4), 379 (1), 281 (14), 207 (46)
7β -OH-Stigmasterol <i>7\beta-OH-Stigmasterol</i>	M^+ — 572 (10), 482 (100), 467 (3), 377 (3), 355 (2), 341 (2), 251 (3), 129 (10)
β -epoksy-Kampesterol <i>\beta-epoxy-Campesterol</i>	M^+ — 488 (49), 470 (100), 459 (27), 455 (9), 398 (38), 370 (63), 355 (41), 197 (70)
β -epoksy-Sitosterol <i>\beta-epoxy-Sitosterol</i>	M^+ — 502 (45), 207 (100), 487 (32), 473 (33), 412 (45), 384 (75), 369 (45), 281 (60)
β -epoksy-Stigmasterol <i>\beta-epoxy-Stigmasterol</i>	M^+ — 500 (55), 157 (100), 482 (10), 471 (5), 410 (22), 382 (50), 367 (24), 253 (70)
α -epoksy-Kampesterol <i>\alpha-epoxy-Campesterol</i>	M^+ — 488 (58), 129 (100), 473 (27), 459 (24), 398 (64), 380 (44), 370 (18), 253 (27)
α -epoksy-Sitosterol <i>\alpha-epoxy-Sitosterol</i>	M^+ — 502 (6), 129 (100), 412 (42), 394 (6), 355 (7), 283 (7), 221 (9), 197 (55)
α -epoksy-Stigmasterol <i>\alpha-epoxy-Stigmasterol</i>	M^+ — 500 (31), 253 (100), 485 (18), 482 (14), 440 (7), 410 (57), 392 (31), 349 (44), 281 (45)
Triol-Kampesterolu <i>Campesterol-triol</i>	M^+ — brak, 417 (100), 560 (18), 470 (62), 381 (4), 335 (48), 282 (13), 271 (3), 209 (13)
Triol-Sitosterolu <i>Sitosterol-triol</i>	M^+ — brak, 431 (100), 574 (26), 545 (2), 484 (60), 394 (14), 349 (45), 207 (10), 129 (69)
Triol-Stigmasterolu <i>Stigmasterol-triol</i>	M^+ — brak, 429 (100), 572 (24), 557 (80), 543 (17), 482 (98), 355 (24), 253 (78), 129 (82)
7keto-Kampesterol <i>7keto-Campesterol</i>	M^+ — 486 (100), 471 (32), 396 (50), 381 (50), 355 (20), 281 (18), 228 (3), 147 (38)
7keto-Sitosterol <i>7keto-Sitosterol</i>	M^+ — 500 (100), 483 (25), 410 (59), 395 (80), 369 (2), 281 (6), 269 (14), 187 (18), 174 (16)
7keto-Stigmasterol <i>7keto-Stigmasterol</i>	M^+ — 498 (100), 455 (27), 408 (19), 386 (73), 359 (60), 347 (61), 296 (20), 281 (35), 269 (50)

* — w tabeli podano masy (m/z) charakterystycznych jonów i ich intensywności — *in the table presented weight of characteristic ions (m/z) and their intensity*

(kampesterolu, β -sitosterolu i stigmasterolu). Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że fragmentacja cząsteczek pochodnych utlenionych kampesterolu i β -sitosterolu zachodzi analogicznie do odpowiednich pochodnych cholesterolu (tab. 6). Natomiast w przypadku stigmasterolu następuje łatwiejsze oddzielenie łańcucha bocznego. Jon o masie cząsteczkowej 129 występował w większości badanych widm i świadczył on o odłączeniu się z pierścienia A cząsteczki sterolowej fragmentu C₁, C₃ (Yanishlieva, Schiller, Marinowa 1980).

Tabela 6

Jony charakterystyczne fragmentacji pochodnych silylowych 7-hydroksy-steroli
Ion characteristic for the fragmentation of silyl derivatives of 7-hydroxy-sterols

Fragmentacja <i>Fragmentation</i>	Cholesterol <i>Cholesterol</i>	Sitosterol <i>Sitosterol</i>	Kampesterol <i>Campesterol</i>	Stigmasterol <i>Stigmasterol</i>
M (jon molekularny — <i>molecular ion</i>)	546	574	560	572
M — TMSOH*	456 (100)	484 (100)	470 (100)	482 (100)
M — 2TMSOH	366	394	380	—
M — (CH ₃ + 2TMSOH)	—	—	—	377
M — (łańcuch boczny + 2TMSOH) <i>(side chain + 2TMSOH)</i>	253	281	267	—
M — (łańcuch boczny + C ₁₆ , C ₁₇ ** + TMSOH) <i>(side chain + C₁₆, C₁₇** + TMSOH)</i>	—	—	—	341
M — (łańcuch boczny + C ₁₆ , C ₁₇ + 2TMSOH) <i>(side chain + C₁₆, C₁₇ + 2TMSOH)</i>	—	—	—	251

* TMSOH — reszta silylowa przyłączona w miejscu grupy hydroksylowej do cząsteczki oksyfitosteroli
TMS moiety adducted to oxyphytosterol in hydroxyl group position

** C₁₆, C₁₇ — pęknięcie wiązania między węglem C₁₆ i C₁₇ w cząsteczce oksyfitosteroli
bond cleavage between C₁₆, C₁₇ carbons in oxyphytosterol molecule

Uzyskane widma masowe wraz z analizą czasów retencji poszczególnych związków i danymi literaturowymi pozwoliły na zidentyfikowanie analizowanych oksyfitosteroli w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno.

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno

W badanych olejach wykrywano i zidentyfikowano sześć pochodnych utlenionych: 7 α i 7 β -hydroksy-, α - i β -epoksy-, triol- i 7-keto-sterole, trzech głównych steroli roślinnych: kampesterolu, stigmasterolu i β -sitosterolu. Na rys. 3 przedstawiono przykładowy chromatogram rozdziału pochodnych utlenionych fitosteroli w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno. Analizę jakościową wykonano techniką GC/MS, a oznaczenia ilościowe — techniką chromatografii gazowej GC z detektorem FID. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 7 i 8. Stanowią one średnią z trzech powtórzeń, a współczynnik zmienności wynosił średnio 5,9%.

Tabela 7

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach roślinnych tłoczonych na zimno
Contents of phytosterol oxidation products in cold pressed plant oils

Fitosterol <i>Phytosterol</i>	Zawartość oksyfitosteroli [$\mu\text{g/g}$ oleju] — <i>Oxyphytosterol contents [$\mu\text{g/g}$ of oil]</i>						
	7 α -OH	7 β -OH	β -epoksy	α -epoksy	triol	7-keto	suma — <i>sum</i>
<i>Olej kukurydziany — Corn oil</i>							
Kampesterol	0,65	0,46	nd	nd	0,73	0,47	2,31
Stigmasterol	nd	nd	nd	0,67	nd	0,71	1,38
β -sitosterol	0,31	0,84	1,09	0,76	0,32	1,52	4,84
<i>Olej lniany — Flax oil</i>							
Kampesterol	4,68	2,08	nd	nd	nd	5,88	12,64
Stigmasterol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β -sitosterol	1,99	5,66	nd	5,64	3,16	5,93	22,38
<i>Oliwa z oliwek Extra Virgin — Extra Virgin olive oil</i>							
Kampesterol	0,65	nd	0,67	nd	nd	nd	1,32
Stigmasterol	0,26	1,16	nd	nd	nd	0,64	2,06
β -sitosterol	0,45	1,03	1,83	4,65	0,47	2,45	10,88
<i>Olej rzepakowy — Rapeseed oil</i>							
Kampesterol	0,74	0,45	nd	nd	nd	0,56	1,75
Stigmasterol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β -sitosterol	1,68	1,11	0,80	0,91	0,34	1,23	6,07
<i>Olej słonecznikowy — Sunflower oil</i>							
Kampesterol	0,45	1,11	0,56	0,65	1,24	1,64	5,65
Stigmasterol	0,26	0,99	0,35	0,52	1,20	1,38	4,70
β -sitosterol	0,60	2,45	1,10	3,91	0,77	4,00	12,83
<i>Olej sojowy — Soybean oil</i>							
Kampesterol	0,73	0,70	0,83	0,76	0,72	1,53	5,27
Stigmasterol	nd	0,85	nd	0,29	0,70	0,64	2,48
β -sitosterol	0,85	2,05	1,46	4,77	0,86	3,32	13,31

nd — nie oznaczono — *not detected*

Najwyższą zawartość oksyfitosteroli wśród olejów tłoczonych na zimno stwierdzono w oleju lnianym (35 $\mu\text{g/g}$ oleju), a najniższą w oleju rzepakowym (8 $\mu\text{g/g}$ oleju). Zawartość pochodnych utlenionych kampesterolu i β -sitosterolu w oleju lnianym była również najwyższa wśród olejów tłoczonych na zimno i wynosiła odpowiednio 13 i 22 $\mu\text{g/g}$ oleju. W oleju tym nie oznaczono pochodnych utlenionych stigmasterolu. Także w oleju rzepakowym nie stwierdzono obecności pochodnych utlenionych stigmasterolu, a zawartość pochodnych utlenionych kampesterolu i β -sitosterolu wynosiła odpowiednio 1,75 i 6,07 $\mu\text{g/g}$ oleju. W oleju tym nie oznaczano pochodnych utlenionych brassikasterolu, które

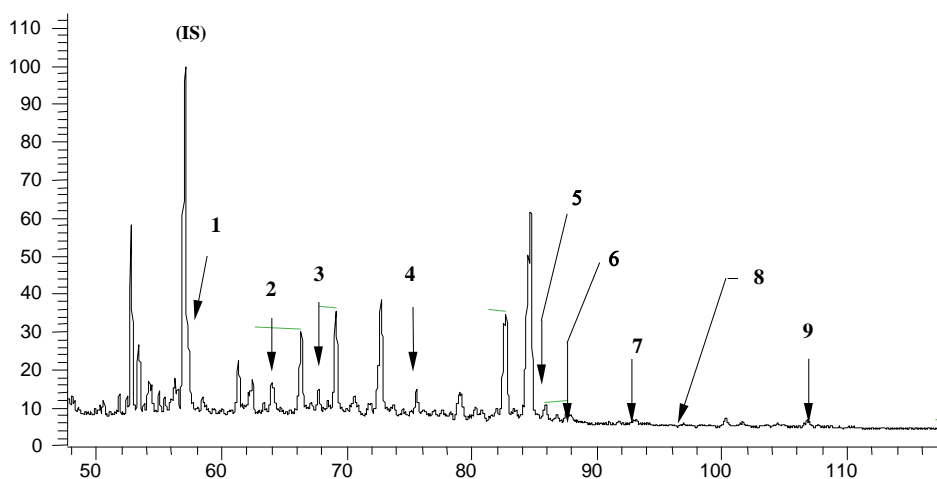
należałoby uwzględnić w dalszych badaniach. W oleju słonecznikowym i sojowym zawartość i skład pochodnych utlenionych fitosteroli były bardzo podobne. Olej słonecznikowy zawierał 23 µg oksyfitosteroli/g oleju, a olej sojowy — 21 µg/g oleju. Analizując skład frakcji oksyfitosterolowej poszczególnych olejów tłoczonych na zimno stwierdzono, że pochodne 7-hydroksylowe stanowiły około 50% frakcji oksyfitosterolowej oleju rzepakowego i około 40% oleju lnianego. W pozostałych olejach zawartość tych pochodnych stanowiła około 25% frakcji oksyfitosterolowej. Najwięcej pochodnych epoksydowych stwierdzono w oliwie z oliwek Extra Virgin (około 50%), a najmniej w oleju lnianym (16%). Udział pochodnych 7-keto-steroli stanowił od 22% w oliwie z oliwek do 33% w oleju lnianym. Natomiast zawartość trioli była bardzo zróżnicowana i stanowiła od 3% (oliwa z oliwek Extra Virgin) do 14% (olej słonecznikowy) frakcji oksyfitosterolowej.

Tabela 8

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w rafinowanych olejach roślinnych
Content of phytosterol oxidation products in refined plant oils

Fitosterol <i>Phytosterol</i>	Zawartość oksyfitosteroli [µg/g oleju] — <i>Oxyphytosterol contents [µg/g of oil]</i>						
	7α-OH	7β-OH	β-epoksy	α-epoksy	triol	7-keto	suma — <i>sum</i>
<i>Olej kukurydziany — Corn oil</i>							
Kampesterol	0,87	2,73	1,96	1,51	1,07	0,62	8,76
Stigmasterol	0,69	0,91	0,97	1,15	1,09	1,25	6,06
β-sitosterol	1,23	6,41	2,12	10,10	0,74	2,57	23,12
<i>Oliwa z oliwek — Olive oil</i>							
Kampesterol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Stigmasterol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-sitosterol	5,55	2,76	nd	6,18	4,70	5,24	24,23
<i>Olej rzepakowy — Rapeseed oil</i>							
Kampesterol	1,07	1,88	1,08	1,97	0,32	0,64	6,96
Stigmasterol	0,33	nd	nd	nd	nd	nd	0,33
β-sitosterol	1,14	3,06	1,14	1,15	0,47	2,78	9,74
<i>Olej słonecznikowy — Sunflower oil</i>							
Kampesterol	8,45	10,20	0,47	nd	1,49	1,48	22,09
Stigmasterol	1,28	0,66	2,49	1,54	1,06	2,13	9,16
β-sitosterol	2,09	5,84	0,28	3,99	1,06	4,25	17,51
<i>Olej sojowy — Soybean oil</i>							
Kampesterol	0,32	2,36	1,28	0,43	0,65	0,51	5,55
Stigmasterol	0,11	1,07	0,35	0,40	0,44	0,29	2,66
β-sitosterol	1,14	6,01	0,63	20,09	0,23	1,26	29,36

nd — nie oznaczono — *not detected*

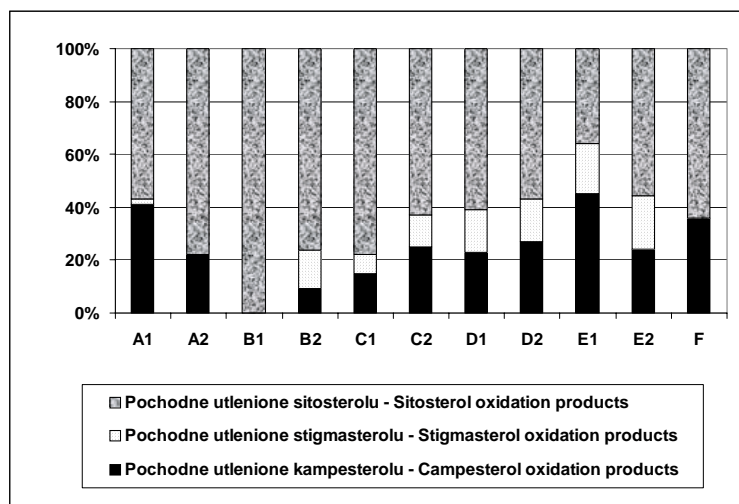


Rys. 3. Chromatogram GC/MS pochodnych utlenionych fitosteroli w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno: 1 — 7α -hydroksy-kampesterol; 2 — 7α -hydroksy-sitosterol; 3 — 7β -hydroksy-kampesterol; 4 — 7β -hydroksy-sitosterol; 5 — β -epoksy-sitosterol; 6 — α -epoksy-sitosterol; 7 — 7keto-kampesterol; 8 — triol-sitosterolu; 9 — 7keto-sitosterol; (IS) — 19-hydroksy-cholesterol (standard wewnętrzny) — *GC/MS chromatogram of phytosterol oxidation products in cold pressed rapeseed oil: 1 — 7α -hydroxy-kampesterol; 2 — 7α -hydroxy-sitosterol; 3 — 7β -hydroxy-kampesterol; 4 — 7β -hydroxy-sitosterol; 5 — β -epoxy-sitosterol; 6 — α -epoxy-sitosterol; 7 — 7keto-kampesterol; 8 — sitosterol-triol; 9 — 7keto-sitosterol; (IS) — 19-hydroxy-cholesterol (internal standard)*

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach rafinowanych była około 2,5 razy wyższa niż w olejach tłoczonych na zimno. Najwyższą zawartość oksyfitosteroli wśród olejów rafinowanych stwierdzono w oleju słonecznikowym (49 $\mu\text{g/g}$ oleju), a najniższą w oleju rzepakowym (17 $\mu\text{g/g}$ oleju). Epimery 7-hydroksy-fitosteroli stanowiły około 30–40% frakcji oksyfitosterolowej badanych olejów rafinowanych, za wyjątkiem oleju słonecznikowego (60%). Natomiast udział pochodnych epoksydowych był bardziej zróżnicowany i wynosił od 7% w oleju słonecznikowym do 60% w oleju sojowym. Triole-fitosteroli stanowiły od 2% w oleju sojowym do około 20% frakcji oksyfitosterolowej oliwy z oliwek.

We frakcji oksysterolowej badanych olejów pochodne utlenione β -sitosterolu stanowiły od około 36% w rafinowanym oleju słonecznikowym do 100% w rafinowanym oleju z oliwek. Pomimo, że skład procentowy frakcji sterolowej badanych olejów rafinowanych i tłoczonych na zimno był podobny (rys. 2), to skład procentowy frakcji oksysterolowej był różny (rys. 4). Olej słonecznikowy rafinowany i tłoczony na zimno zawierał około 15% kampesterolu, 8–9% stigma-

sterolu i 76–77% β -sitosterolu. Natomiast skład frakcji oksysterolowej tych olejów był inny i wynosił dla oleju rafinowanego 45% pochodnych utlenionych kampesterolu, 19% pochodnych utlenionych stigmasterolu i 36% pochodnych utlenionych β -sitosterolu, a dla oleju tłoczonego na zimno odpowiednio: 24%, 20% i 55%.



Oleje rafinowane — *Refined oils*:

A1 — olej rzepakowy — *rapeseed oil* B1 — oliwa z oliwek — *olive oil* C1 — olej sojowy — *soybean oil*
 D1 — olej kukurydziany — *corn oil* E1 — olej słonecznikowy — *sunflower oil*

Oleje tłoczone na zimno — *Cold pressed oils*:

A2 — olej rzepakowy — *rapeseed oil*; B2 — oliwa z oliwek — *Extra Virgin olive oil*
 C2 — olej sojowy — *soybean oil* D2 — olej kukurydziany — *corn oil*
 E2 — olej słonecznikowy — *sunflower oil* F — olej lniany — *flax oil*

Rys. 4. Skład procentowy frakcji oksysterolowej badanych olejów roślinnych — *Oxyphytosterols composition in analysed plant oils*

Dyskusja

Metody oznaczania związków powstających podczas utleniania steroli są skomplikowane i pracochłonne. Wymagają one łączenia kilku technik chromatograficznych (TLC, GC, HPLC) oraz zachowania odpowiednich warunków analizy (temperatura pokojowa, brak dostępu tlenu i światła).

Stosowany jednak przez wielu autorów (Dutta 1997, Nourooz-Zadeh, Appelqvist 1992, Yanishlieva i in. 1980) etap zmydlania frakcji lipidowej w celu przeprowadzenia hydrolizy wiązań estrowych, zachodzi w podwyższonej temperaturze lub przez długi okres czasu. Powoduje to powstawanie artefaktów, które utrudniają identyfikację oznaczanych związków. W pracy zastąpiono ten etap procesem transestryfikacji, który zachodzi w temperaturze pokojowej przez

1 godzinę, bez dostępu światła i tlenu (Przygoński i in. 2000, Schmarr i in. 1996). Następnie próbę oczyszczano metodą ekstrakcji do fazy stałej SPE na kolumnkach aminowych. Procedura ta została opisana przez Przygońskiego (Przygoński i in. 2000) do oznaczania pochodnych utlenionych cholesterolu. Uzyskane przez tego autora odzyski wynosiły od 94,2% dla 7 β -hydroksy-cholesterolu do 99,9% dla 7 α -hydroksy-cholesterolu. Limit detekcji kształtował się na poziomie od 21 ng 7 α -hydroksy-cholesterolu/g tłuszczu do 34 ng α -epoksy-cholesterolu/g tłuszczu. Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują na to, że zastosowane metody transestryfikacji i frakcjonowania mogą być również stosowane do oznaczania pochodnych utlenionych fitosteroli.

Brak na rynku standardów oksyfitosteroli spowodował konieczność przeprowadzenia dodatkowego doświadczenia. Yanishleva i in. (1980) stwierdzili, że ogrzewanie β -sitosterolu w formie 5% roztworu w trioleinianie glicerolu umożliwia uzyskanie mieszaniny jego produktów utlenienia. W tej pracy 2,5% roztwory β -sitosterolu (który zawierał kampesterol) i stigmasterolu w trioleinianie glicerolu poddano ogrzewaniu w 18°C przez 4 godziny w atmosferze tlenu, co pozwoliło na uzyskanie pożądanej mieszaniny ich pochodnych utlenionych.

Uzyskane widma masowe pochodnych utlenionych kampesterolu i β -sitosterolu różniły się nieznacznie od opublikowanych przez Dutta i Appelqvista (Dutta, Appelqvist 1997; Dutta 1997) oraz Grandgirarda i in. (1999). Stwierdzono również analogię dróg fragmentacji tych związków z odpowiednimi produktami utleniania cholesterolu. Następowало jedynie zwiększenie masy m/z o 14 jednostek (kampesterol) lub 28 jednostek (β -sitosterol). Natomiast fragmentacja pochodnych utlenionych stigmasterolu wskazywała na łatwiejsze odzestanie łańcucha bocznego niż w pozostałych związkach. Może to być związane z obecnością wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym cząsteczki, przy węglu C₂₂.

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach roślinnych była przedmiotem badań Dutty (1997), który oznaczył całkowitą zawartość oksyfitosteroli w oleju rzepakowym zmieszonym z olejem palmowym (41 ppm), w oleju słonecznikowym (39,9 ppm) i w oleju słonecznikowym wysokooleinowym (46,7 ppm). W badaniach przeprowadzonych w ramach tej pracy porównywano zawartość oksyfitosteroli w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno. Stwierdzono, że olej rzepakowy zawierał najmniej tych związków, zarówno wśród olejów rafinowanych (17 ppm) jak i tłoczonych na zimno (8 ppm). Natomiast najwyższą zawartość oksyfitosteroli stwierdzono w rafinowanym oleju słonecznikowym i wynosiła ona około 49 ppm.

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w olejach rafinowanych była o 2–2,5 razy wyższa niż w olejach tłoczonych na zimno. Jednocześnie skład procentowy frakcji oksyfitosterolowej w olejach rafinowanych i tłoczonych na zimno był różny. Dotychczas w literaturze brak jest danych dotyczących porównania zawartości oksyfitosteroli w olejach roślinnych tłoczonych na zimno i rafinowanych.

Podsumowanie

1. Zastosowane metody analityczne pozwoliły na określenie zawartości sześciu pochodnych utlenionych (7α -hydroksy-, 7β -hydroksy-, β -epoksy-, α -epoksy-, triol- i 7-keto-) trzech głównych steroli roślinnych (kampesterolu, stigmatsterolu i β -sitosterolu) w olejach roślinnych.
2. W olejach tłoczonych na zimno całkowita zawartość oksyfitosteroli wynosiła od 8 do 35 $\mu\text{g/g}$ oleju, a w olejach rafinowanych od 17 do 49 $\mu\text{g/g}$ oleju.
3. Skład procentowy frakcji sterolowej i oksysterolowej w badanych olejach był różny.

Results

1. Applied analytical methods allowed the quantitation of six oxygenated (7α -hydroxy-, 7β -hydroxy-, β -epoxy-, α -epoxy-, triol and 7-keto-) derivatives of three main plant phytosterols (campesterol, stigmasterol, β -sitosterol) in plant oils.
2. In cold pressed oils the total contents of oxyphytosterols ranged from 8 $\mu\text{g/g}$ to 35 $\mu\text{g/g}$, whereas in refined oils it was in a range from 17 $\mu\text{g/g}$ to 49 $\mu\text{g/g}$.
3. Percentage composition of sterols and oxyphytosterols fractions differed from each other.

Acknowledgment

Authors would like to thank prof. dr P. Dutta from Swedish University of Agricultural Science in Uppsala for valuable discussions of oxyphytosterols mass spectra.

Literatura

- Dutta P.Ch., Appelqvist L. 1997. Studies on phytosterol oxides. I: Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *JAOCS* 74: 647-657.
- Dutta P.Ch. 1997. Studies on phytosterol oxides. II: Content in some vegetable oils and in french fries prepared in these oils. *JAOCS* 74: 659-666.
- Finocchiaro E.T., Richardson T. 1983. Sterol oxides in foodstuffs: A review. *J. Food Prot.* 46: 917-925.

- Grandgirard A., Sergiel J.P., Nour M., Demaison-Meloche J., Giničs 1999. Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats. *Lipids* 34: 563-570.
- Kochhar S.P. 1983. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Prog. Lipid Res.* 22: 161-188.
- Krygier K., Wroniak M., Wódka M., Grzeškiewicz S., Obiedziński M. 2000. Badania wpływu czasu tłoczenia na jakość oleju rzepakowego tłoczonego na zimno. *Żywność – Nauka, Technologia, Jakość* 23: 39-48.
- Niewiadomski H., Sawicki J. 1965. Przemiany steroli w czasie rafinacji olejów roślinnych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 53: 175-186.
- Nourooz-Zadeh J., Appelqvist L. 1992. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: Soybean oil and wheat flour. *JAOCS* 69: 288-293.
- Pie J.E., Spahis K., Seillan Ch. 1991. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 39: 250-254.
- Przygoński K., Jeleń H., Wąsowicz E. 2000. Determination of cholesterol oxidation products in milk powder and infant formulas by gas chromatography and mass spectrometry. *Nahrung* 44: 122-125.
- Schmarr H.G., Gross H.B., Shibamoto T. 1996. Analysis of polar cholesterol oxidation products: Evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 44: 512-517.
- Vlahakis Ch., Hazebroek J. 2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *JAOCS* 77: 49-53.
- Wąsowicz E. 1984. Szybka metoda oznaczania kwasu erukowego w nasionach rzepaku. *Przemysł Spożywczy* 38: 353-355.
- Wąsowicz E. 1997. Produkty utleniania cholesterolu wykrywane w żywności i ich biologiczne znaczenie. *PTTŻ o/Wielkopolski* 17: 17-53.
- Yanishlieva N., Schiller H., Marinowa E. 1980. Autoxidation of sitosterol. II: Main products formed at ambient and high temperature treatment with oxygen. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* LVII: 572-576.