

Magdalena Rudzińska, Czesław Muśnicki*, Erwin Wąsowicz

Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, *Katedra Uprawy Roli i Roślin

Fitosterole i ich pochodne utlenione w nasionach rzepaku ozimego*

Phytosterols and their oxidized derivatives in seeds of winter oilseed rape

Słowa kluczowe: fitosterole, oksyfitosterole, nasiona rzepaku, chromatografia gazowa

Key words: phytosterols, oxyphytosterols, rapeseed, gas chromatography

Celem niniejszej pracy była identyfikacja pochodnych utlenionych kampesterolu, stigmasterolu i β -sitosterolu techniką GC/MS oraz oznaczanie ich zawartości w dziesięciu odmianach nasion rzepaku ozimego. 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 – NH_2 , siliowano i analizowano techniką GC/MS. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że największą zawartością steroli charakteryzowały się nasiona odmiany Kronos – 6,29 mg/g, a najmniejszą nasiona odmiany Buffalo – 4,71 mg/g. Zastosowane metody analityczne pozwoliły na oznaczenie zawartości 14–18 pochodnych utlenionych fitosteroli w nasionach rzepaku. Zawartość tych związków wynosiła od 10 do 15 $\mu\text{g/g}$ nasion i dominowały wśród nich pochodne β -epoksy- oraz 7β -hydroksysterole.

The main goal of this work was the identification of campesterol, stigmasterol and β -sitosterol oxidation products by GC/MS technique and the analysis of their content in ten varieties of winter rapeseed. Ten varieties of winter rapeseed cultivated in Poland were analyzed. The content of phytosterols was determined by GC technique following saponification. To determine the content of oxyphytosterols, saponification was replaced by transesterification, then samples were cleaned on SPE – NH_2 , silylated and analyzed by GC/MS. The content of phytosterols was from 4,41 mg/g in seeds of Buffalo variety, to 6,29 mg/g in seeds of Kronos variety. The applied methods allowed to determine 14-18 oxyphytosterols in rapeseeds. Their content ranged from 10 to 15 $\mu\text{g/g}$ of seeds and β -epoxy- and 7β -hydroxy-sterols dominated.

Wprowadzenie

Szeroko prowadzone w świecie badania naukowe doprowadziły do zidentyfikowania w tkankach roślinnych ponad 60 fitosteroli, które są formami przej-

* Praca częściowo finansowana przez KBN w ramach grantu 6 P06T 076 21.

ściowymi lub końcowymi metabolizmu komórkowego (Hartmann 1998). Związki te znalazły zastosowanie jako substancje pomocnicze w walce z niedokrwinną chorobą serca. Zwiększenie spożycia fitosteroli jest efektywnym sposobem zwalczania hipercholesterolemii poprzez zmniejszenie stężenia cholesterolu we krwi (Moreau i in. 1999, Hicks i Moreau 2001). Jednocześnie najnowsze badania wskazują na przeciwpolimeryzacyjne działanie tych związków podczas smażenia produktów spożywczych (Boskou 1998, Blekas i Boskou 1999). Skład fitosteroli jest różny i charakterystyczny dla danego gatunku roślin oleistych. Najwięcej fitosteroli zawierają ziarna kukurydzy oraz nasiona rzepaku i bawełny — od 7,7 do 9,3 mg/g (Verleyen i in. 2002, Vlahakis i Hazebroek 2000). Związki te, podobnie jak cholesterol, ulegają procesom oksydacyjnym. Jednak stan wiedzy dotyczącej powstawania pochodnych utlenionych steroli roślinnych, zwanych oksyfitosterolami, jest bardzo skromny i opiera się głównie na analogii do cholesterolu. Badania naukowe dotyczące właściwości oraz powstawania pochodnych utlenionych cholesterolu były tematem wielu prac badawczych (Smith 1996, Wąsowicz 2003). Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano ponad 100 tych związków, którym przypisuje się działanie mutagenne, kancerogenne, cytotoksyczne i aterogenne. Podobieństwo w budowie chemicznej pochodnych utlenionych fitosteroli i pochodnych utlenionych cholesterolu sugeruje, że związki te mają analogiczny wpływ na organizm człowieka, a metabolizm ich przebiega tymi samymi drogami. W ostatnich latach opublikowano kilka prac wskazujących na obecność oksyfitosteroli w produktach spożywczych. Dutta (1997) badał pochodne utlenione fitosteroli w oleju słonecznikowym i palmowym zmieszonym z uwodornionym olejem rzepakowym oraz we frytkach i chipsach smażonych na tych olejach. Całkowita zawartość oksyfitosteroli w olejach wynosiła od 39,9 do 46,7 ppm, a we frytkach od 32,0 do 53,7 ppm. W żywności barowej smażonej na mieszanych tłuszczach roślinnych i zwierzęcych wykryto produkty utlenienia cholesterolu, sitosterolu i kampesterolu, takie jak: α i β -epoksysitosterol, 7-hydroksysitosterol i kampesterol, 7-ketositosterol i kampesterol oraz triol sitosterolu i kampesterolu (Dutta i Appelqvist 1997). Oehrl i in. (2001) analizowali straty fitosteroli oraz tworzenie się ich pochodnych utlenionych w olejach roślinnych ogrzewanych w warunkach modelowych przez 20 godzin w temperaturze 100, 150 i 180°C. Najwięcej oksyfitosteroli, a głównie pochodnych epoksydowych kampesterolu i sitosterolu, zawierał olej rzepakowy ogrzewany w 100°C — około 80 $\mu\text{g/g}$.

W naszym laboratorium prowadzone są systematyczne badania dotyczące tworzenia się pochodnych utlenionych fitosteroli w czasie przechowywania i przetwarzania żywności. Efektem tych badań były prace opublikowane przez Rudzińską i in. (2001, 2002) dotyczące zawartości steroli roślinnych i ich pochodnych utlenionych w olejach roślinnych rafinowanych i tłoczonych na zimno oraz w rafinowanych olejach roślinnych ogrzewanych w warunkach modelowych. 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. Podczas ogrzewania zawartość tych związków wzrastała we wszystkich badanych olejach. Jednak do tej pory nie ukazała się żadna praca dotycząca obecności pochodnych utlenionych fitosteroli w nasionach roślin oleistych.

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie i oznaczenie ilościowe oksyfitosteroli w dziesięciu odmianach nasion rzepaku ozimego uprawianego w Polsce.

Material do badań

Z Zakładu Roślin Oleistych Katedry Uprawy Roli i Roślin Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu otrzymano nasiona dziesięciu odmian rzepaku (Bor, Buffalo, Capio, Contact, Kana, Kaszub, Kronos, Lisek, Mazur, Rasmus) ze zbioru w 2000 roku. Otrzymane do badań nasiona były dobrej jakości, z nieuszkodzoną okrywą nasienną, zdrowe, bez zanieczyszczeń. Wartość liczby nadtlenkowej była we wszystkich nasionach niska i wynosiła od 0,53 meq O_2/kg w odmianie Buffalo i Kronos do 0,76 meq O_2/kg w odmianie Bor, a analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między odmianami.

Skład kwasów tłuszczowych w badanych nasionach był wyrównany i typowy dla oleju rzepakowego. Najwięcej, bo ponad 60% stanowił kwas oleinowy (18:1), a drugi pod względem ilościowym był kwas linolowy (18:2), który stanowił około 20% zawartości kwasów tłuszczowych. Udział kwasu α -linolenowego (18:3) wynosił około 10% i był typowy dla tego oleju. Kwas erukowy występował w nasionach tylko trzech badanych odmian rzepaku — Bor, Kaszub, Kronos i stanowił około 0,1% wszystkich kwasów.

Odczynniki

Standardy 5α -cholestan i 19-hydroksy-cholesterol (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 sililujące BSTFA + 1% TMCS oraz Sylon HTP zakupiono w firmie SIGMA-ALDRICH.

Metody badań

Oznaczanie zawartości fitosteroli

W celu oznaczenia zawartości fitosteroli w nasionach rzepaku ekstrahowano frakcję lipidową metodą Folcha (Folch i in. 1957). Następnie 0,2 g tłuszczu poddawano zmydłaniu 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 zastosowano metodę opisaną przez Rudzińską i in. (2001). Frakcję lipidową ekstrahowano metodą Folcha z dodatkiem 0,006% BHT, a następnie poddawano transestryfikacji metanolanem sodu. Po ekstrakcji chloroformem próbę frakcjonowano na kolumnkach SEP-PAK NH₂, siliowano 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 min. Temperatura źródła jonów — 250°C, temperatura interfejsu GC/MS — 280°C, tryb pracy SCAN w zakresie mas 100–650, energia jonizacji 70eV. Jako standard wewnętrzny dodawano do próby 19-hydroksy-cholesterol w ilości 10 μg.

Omówienie wyników

Zawartość fitosteroli w nasionach rzepaku ozimego

W badanych olejach oznaczono zawartość steroli roślinnych, takich jak brassikasterol, kampesterol, stigmasterol, β-sitosterol i awenasterol, a uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

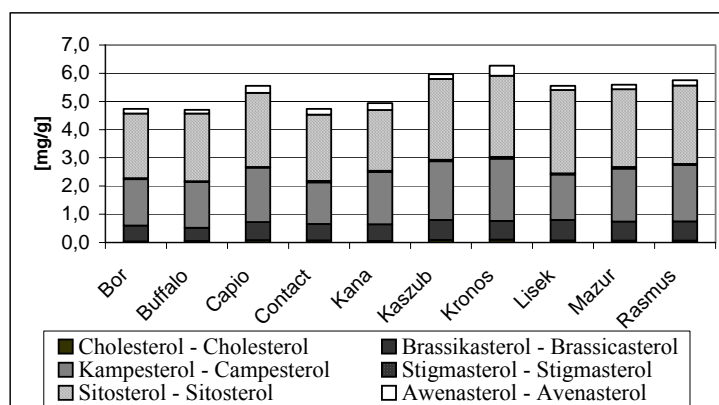
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zawartość steroli w tłuszczu wyekstrahowanym z nasion rzepaku wynosiła od około 4,7 mg/g nasion w odmianach Bor, Buffalo, Contact do 6,3 mg/g nasion w odmianie Kronos (rys. 1). Skład procentowy frakcji sterolowej badanych nasion rzepaku był wyrównany i charakterystyczny dla oleju rzepakowego. Dominującym sterolem był β-sitosterol,

Tabela 1
Zawartość steroli roślinnych w nasionach rzepaku [mg/g nasion]* — The content of phyosterols in rapeseeds [mg/g of seeds]

Odmiana Variety	Cholesterol Cholesterol	Brassikasterol Brassicasterol	Kampesterol Campesterol	Stigmasterol Stigmasterol	β -Sitossterol β -Sitossterol	Awenasterol Avenasterol	Suma Sum
Bor	0,04 ± 0,01 a	0,56 ± 0,05 bc	1,64 ± 0,17 a	0,04 ± 0,02 a	2,29 ± 0,27 a	0,16 ± 0,04 ab	4,74 ± 0,51 a
Buffalo	0,05 ± 0,01 a	0,47 ± 0,02 b	1,63 ± 0,09 a	0,03 ± 0,01 a	2,40 ± 0,17 a	0,13 ± 0,01 a	4,71 ± 0,31 a
Capio	0,08 ± 0,02 a	0,65 ± 0,27 c	1,93 ± 0,81 a	0,02 ± 0,01 a	2,63 ± 0,14 a	0,24 ± 0,07 b	5,55 ± 0,29 a
Contact	0,08 ± 0,03 a	0,59 ± 0,02 bc	1,47 ± 0,03 a	0,05 ± 0,02 a	2,36 ± 0,02 a	0,20 ± 0,03 b	4,74 ± 0,09 a
Kana	0,05 ± 0,01 a	0,59 ± 0,01 c	1,85 ± 0,01 a	0,04 ± 0,01 a	2,16 ± 0,01 a	0,24 ± 0,01 b	4,94 ± 0,01 a
Kaszub	0,09 ± 0,04 a	0,71 ± 0,03 c	2,09 ± 0,11 a	0,05 ± 0,01 a	2,86 ± 0,23 a	0,17 ± 0,11 b	5,96 ± 0,45 a
Kronos	0,10 ± 0,02 a	0,67 ± 0,11 c	2,21 ± 0,36 a	0,06 ± 0,01 a	2,88 ± 0,44 a	0,36 ± 0,01 c	6,29 ± 0,93 a
Lisek	0,07 ± 0,03 a	0,72 ± 0,03 c	1,61 ± 0,08 a	0,04 ± 0,01 a	3,00 ± 0,08 a	0,15 ± 0,01 a	5,55 ± 0,17 a
Mazur	0,06 ± 0,01 a	0,64 ± 0,14 a	1,88 ± 0,05 a	0,06 ± 0,02 a	2,76 ± 0,10 a	0,15 ± 0,05 a	4,97 ± 0,27 a
Rasmus	0,06 ± 0,02 a	0,69 ± 0,01 c	1,99 ± 0,01 a	0,04 ± 0,01 a	2,79 ± 0,02 a	0,18 ± 0,04 ab	5,75 ± 0,06 a

* — dane w tabeli stanowią średnią z trzech powtórzeń ± odchylenie standardowe — means of three duplicates ± standard deviation

a, b... — jednakowe oznaczenia literowe w kolumnach — brak statystycznie istotnych różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$
values in the columns marked with the same letters do not differ significantly ($\alpha \leq 0,05$)



Rys. 1. Zawartość steroli w nasionach rzepaku ozimego [mg/g nasion] — *The content of sterols in ten varieties of winter rapeseed [mg/g of seeds]*

którego zawartość wahała się od 2,16 mg/g nasion w odmianie Kana do 2,95 mg/g nasion w odmianie Lisek, co stanowiło około 43–55% frakcji sterolowej. Natomiast zawartość kampesterolu wynosiła od 1,62 mg/g nasion w odmianie Lisek do 2,22 mg/g nasion odmiany Kronos i stanowiła około 30–35% frakcji sterolowej. W badanych nasionach rzepaku oznaczono także zawartość brassikasterolu, typowego sterolu roślin z rodziny krzyżowych. Stanowił on około 11% sumy wszystkich steroli, a jego zawartość wahała się od 0,46 mg/g nasion w odmianie Buffalo do 0,72 mg/g nasion w odmianie Lisek. Pozostałe sterole występowały w dużo mniejszych ilościach. Zawartość awenasterolu wynosiła około 0,2 mg/g nasion, stigmasterolu — około 0,02–0,06 mg/g nasion, a cholesterolu około 0,04–0,09 mg/g nasion.

Analiza statystyczna wykazała tylko zróżnicowanie między odmianami w zawartości brassikasterolu i awenasterolu. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości sumy fitosteroli.

Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w nasionach rzepaku ozimego

W nasionach 10 odmian rzepaku ozimego oznaczano zawartość sześciu pochodnych utlenionych (7α -hydrokso-, 7β -hydrokso-, β -epokso-, α -epokso-, triol i 7-keto-) trzech steroli roślinnych kampesterolu, stigmasterolu i sitosterolu. W pracy nie oznaczano zawartości pochodnych utlenionych brassikasterolu ze względu na duże trudności analityczne i metodyczne w zidentyfikowaniu tych związków techniką GC/MS. Uzyskane szczegółowe wyniki przedstawiono w tabelach 2–4 oraz na rysunkach 2, 3 i 4. Przykładowy rozdział chromatograficzny pochodnych utlenionych fitosteroli w tłuszczu wyekstrahowanym z nasion rzepaku odmiany Rasmus ilustruje rysunek 5.

Tabela 2

Zawartość pochodnych utlenionych kampesterolu w nasionach rzepaku [$\mu\text{g/g}$ nasion]*
The content of campesterol oxidation products in rapeseeds [$\mu\text{g/g}$ of seeds]

Odmiana <i>Variety</i>	7 α -hydroksy-K <i>7α-hydroxy-C</i>	7 β -hydroksy-K <i>7β-hydroxy-C</i>	β -epoksy-K <i>β-epoxy-C</i>	α -epoksy-K <i>β-epoksy-C</i>	triol-K <i>triol-C</i>	7-keto-K <i>7-keto-C</i>	Suma <i>Sum</i>
Bor	0,04 \pm 0,01 a	2,19 \pm 0,29 c	0,45 \pm 0,10 a	0,12 \pm 0,02 a	0,03 \pm 0,01 a	0,24 \pm 0,08 a	3,07 b
Buffalo	Nw. a	2,22 \pm 0,18 c	0,65 \pm 0,16 ab	0,03 \pm 0,01 a	0,09 \pm 0,02 b	0,50 \pm 0,04 b	3,49 b
Capio	0,03 \pm 0,01 a	1,58 \pm 0,85 b	0,25 \pm 0,05 a	0,25 \pm 0,06 b	0,07 \pm 0,01 b	0,40 \pm 0,05 b	2,58 a
Contact	Nw. a	1,61 \pm 0,21 b	0,60 \pm 0,27 ab	0,03 \pm 0,01 a	Nw. a	0,50 \pm 0,83 b	2,74 ab
Kana	0,05 \pm 0,01 a	1,25 \pm 0,25 b	0,28 \pm 0,05 a	0,27 \pm 0,05 b	0,06 \pm 0,03 b	0,42 \pm 0,06 b	2,33 a
Kaszub	0,10 \pm 0,02 b	2,25 \pm 0,31 c	1,18 \pm 1,14 b	0,37 \pm 0,12 c	0,08 \pm 0,02 b	0,69 \pm 0,10 c	4,97 d
Kronos	0,04 \pm 0,02 a	1,79 \pm 0,20 bc	1,18 \pm 0,23 b	0,12 \pm 0,37 a	0,12 \pm 0,04 c	1,17 \pm 0,23 d	4,42 c
Lisek	Nw. a	0,86 \pm 0,06 a	0,64 \pm 0,27 ab	0,05 \pm 0,01 a	0,14 \pm 0,05 c	0,67 \pm 0,17 c	2,36 a
Mazur	Nw. a	1,23 \pm 0,44 b	0,87 \pm 0,18 b	0,09 \pm 0,02 a	Nw. a	0,77 \pm 0,92 c	2,96 b
Rasmus	Nw. a	1,83 \pm 0,59 bc	1,83 \pm 0,24 c	0,26 \pm 0,34 b	0,05 \pm 0,02 ab	1,31 \pm 0,58 d	5,28 d

* — dane w tabeli stanowią średnią z trzech powtórzeń \pm odchylenie standardowe — *means of three duplicates \pm standard deviation*

a, b... — jednakowe oznaczenia literowe w kolumnach — brak statystycznie istotnych różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$
values in the columns marked with the same letters do not differ significantly ($\alpha \leq 0,05$)

Nw. — nie wykryto — *not detected*

Tabela 3

Zawartość pochodnych utlenionych stigmasterolu w nasionach rzepaku [$\mu\text{g/g}$ nasion]*
The content of stigmasterol oxidation products in rapeseeds [$\mu\text{g/g}$ of seeds]

Odmiana <i>Variety</i>	7 α -hydroksy-St <i>7α-hydroxy-St</i>	7 β -hydroksy-St <i>7β-hydroxy-St</i>	β -epoksy-St <i>β-epoxy-St</i>	α -epoksy-St <i>α-epoxy-St</i>	triol-St <i>triol-St</i>	7-keto-St <i>7-keto-St</i>	Suma <i>Sum</i>
Bor	0,05 \pm 0,01 a	0,29 \pm 0,02 c	0,17 \pm 0,02 a	0,15 \pm 0,05 a	0,09 \pm 0,01 c	0,14 \pm 0,01 a	0,89 a
Buffalo	0,02 \pm 0,01 a	0,14 \pm 0,05 a	0,19 \pm 0,06 ab	0,14 \pm 0,01 a	0,06 \pm 0,02 b	0,19 \pm 0,03 ab	0,74 a
Capio	0,03 \pm 0,01 a	0,26 \pm 0,09 c	0,21 \pm 0,04 b	0,15 \pm 0,05 a	0,03 \pm 0,01 a	0,14 \pm 0,01 a	0,82 a
Contact	Nw. a	0,10 \pm 0,02 a	0,28 \pm 0,05 b	0,25 \pm 0,01 b	Nw. a	0,23 \pm 0,05 b	0,86 a
Kana	0,04 \pm 0,01 a	0,12 \pm 0,04 a	0,14 \pm 0,01 a	0,14 \pm 0,04 a	0,04 \pm 0,01 a	0,12 \pm 0,05 a	0,60 a
Kaszub	0,06 \pm 0,02 a	0,23 \pm 0,09 b	0,46 \pm 0,03 c	0,32 \pm 0,02 c	0,07 \pm 0,02 bc	0,26 \pm 0,16 b	1,40 b
Kronos	0,03 \pm 0,01 a	0,22 \pm 0,06 b	0,50 \pm 0,03 c	0,38 \pm 0,06 c	0,09 \pm 0,01 c	0,19 \pm 0,05 ab	1,41 b
Lisek	0,01 \pm 0,01 a	0,26 \pm 0,02 c	0,20 \pm 0,02 ab	0,11 \pm 0,02 a	0,04 \pm 0,01 a	0,10 \pm 0,06 a	0,72 a
Mazur	Nw. a	0,19 \pm 0,07 b	0,28 \pm 0,02 b	0,20 \pm 0,02 b	Nw. a	0,11 \pm 0,02 a	0,78 a
Rasmus	Nw. a	0,26 \pm 0,05 c	0,38 \pm 0,04 bc	0,34 \pm 0,05 c	0,05 \pm 0,02 b	0,26 \pm 0,06 b	1,29 b

* — dane w tabeli stanowią średnią z trzech powtórzeń \pm odchylenie standardowe — *means of three duplicates \pm standard deviation*

a, b... — jednakowe oznaczenia literowe w kolumnach — brak statystycznie istotnych różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$
values in the columns marked with the same letters do not differ significantly ($\alpha \leq 0,05$)

Nw. — nie wykryto — *not detected*

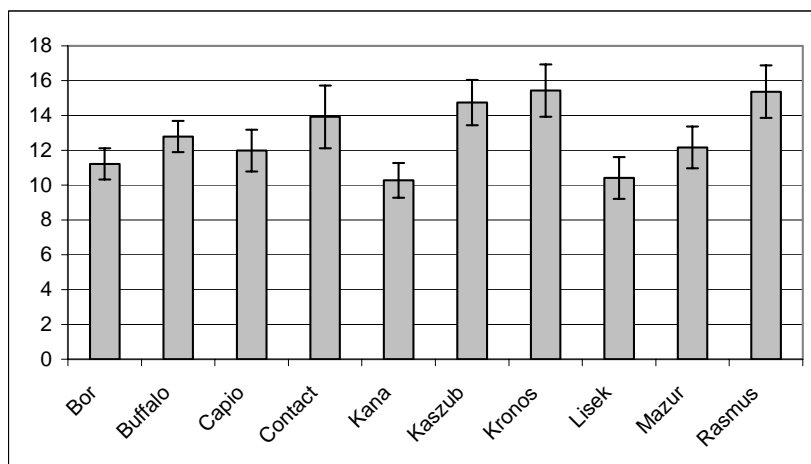
Tabela 4

Zawartość pochodnych utlenionych β -sitosterolu w nasionach rzepaku [$\mu\text{g/g}$ nasion]*
The content of sitosterol oxidation products in rapeseeds [$\mu\text{g/g}$ of seeds]

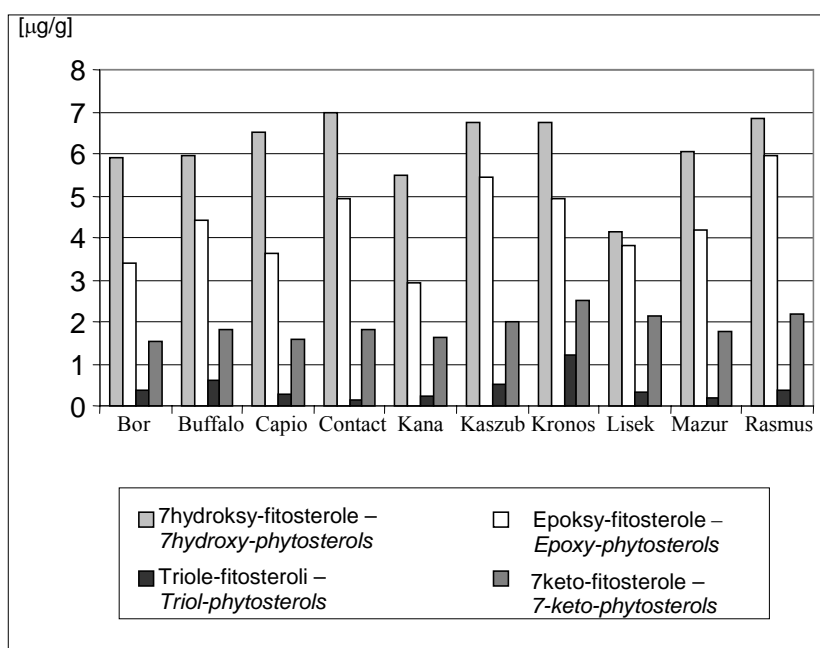
Odmiana <i>Variety</i>	7 α -hydroksy-Sito <i>7α-hydroxy-Sito</i>	7 β -hydroksy-Sito <i>7β-hydroxy-Sito</i>	β -epoksy-Sito <i>β-epoxy-Sito</i>	α -epoksy-Sito <i>α-epoxy-Sito</i>	triol-Sito <i>triol-Sito</i>	7-keto-Sito <i>7-keto-Sito</i>	Suma <i>Sum</i>
Bor	0,19 \pm 0,03 a	3,17 \pm 0,26 a	2,26 \pm 0,12 a	0,25 \pm 0,04 a	0,25 \pm 0,05 b	1,14 \pm 0,12 b	7,26 a
Buffalo	0,14 \pm 0,01 a	3,44 \pm 0,43 ab	3,14 \pm 0,15 c	0,26 \pm 0,04 a	0,45 \pm 0,05 c	1,13 \pm 0,10 b	8,56 b
Capio	0,20 \pm 0,03 a	4,41 \pm 0,20 c	2,41 \pm 0,14 b	0,34 \pm 0,08 a	0,19 \pm 0,06 a	1,03 \pm 0,08 b	8,58 b
Contact	0,29 \pm 0,03 ab	5,00 \pm 0,89 d	2,88 \pm 0,39 b	0,91 \pm 0,08 b	0,14 \pm 0,05 a	1,10 \pm 0,06 b	10,32 c
Kana	0,18 \pm 0,03 a	3,75 \pm 0,27 b	1,83 \pm 0,10 a	0,28 \pm 0,06 a	0,11 \pm 0,02 a	1,10 \pm 0,12 b	7,35 a
Kaszub	0,38 \pm 0,04 ab	3,43 \pm 1,91 ab	2,04 \pm 0,19 a	1,09 \pm 0,09 c	0,36 \pm 0,08 c	1,07 \pm 0,09 b	8,37 b
Kronos	0,76 \pm 0,09 b	3,91 \pm 0,89 b	1,99 \pm 0,07 a	0,78 \pm 0,10 b	1,00 \pm 0,09 d	1,16 \pm 0,08 b	9,60 bc
Lisek	0,22 \pm 0,01 ab	2,80 \pm 0,19 a	2,45 \pm 0,15 b	0,37 \pm 0,03 a	0,14 \pm 0,03 a	1,35 \pm 0,09 c	7,33 a
Mazur	0,18 \pm 0,02 a	4,44 \pm 0,75 c	2,12 \pm 0,14 a	0,64 \pm 0,09 b	0,18 \pm 0,04 a	0,87 \pm 0,07 a	8,43 b
Rasmus	0,25 \pm 0,05 ab	4,50 \pm 0,18 c	2,09 \pm 0,14 a	1,05 \pm 0,14 c	0,29 \pm 0,09 b	0,62 \pm 0,06 a	8,80 b

* — dane w tabeli stanowią średnią z trzech powtórzeń \pm odchylenie standardowe — *means of three duplicates \pm standard deviation*

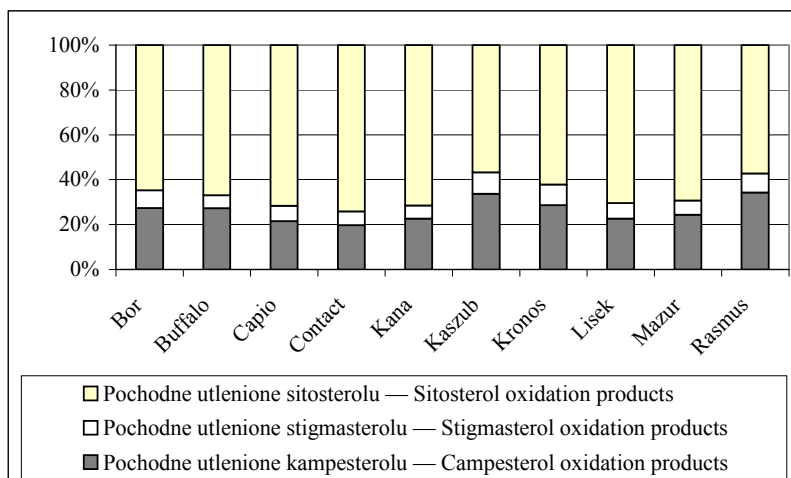
a, b... — jednakowe oznaczenia literowe w kolumnach – brak statystycznie istotnych różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$
values in the columns marked with the same letters do not differ significantly ($\alpha \leq 0,05$)



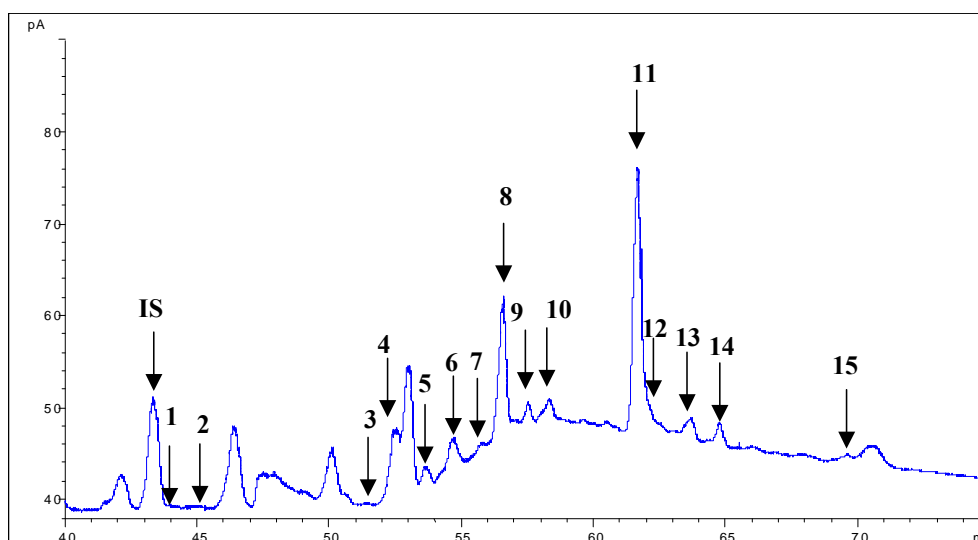
Rys. 2. Całkowita zawartość oksyfitosteroli w nasionach rzepaku ($\mu\text{g/g}$ nasion) — *The total content of oxyphytosterols in rapeseeds ($\mu\text{g/g}$ of seeds)*



Rys. 3. Zawartość pochodnych utlenionych fitosteroli w nasionach różnych odmian rzepaku ($\mu\text{g/g}$ nasion) — *The content of different classes of oxyphytosterols in ten varieties of rapeseeds ($\mu\text{g/g}$ of seeds)*



Rys. 4. Skład procentowy frakcji oksyfitosterolowej nasion różnych odmian rzepaku
The percentage composition of oxyphytosterol fraction in ten varieties of rapeseeds



Rys. 5. Rozdział chromatograficzny pochodnych utlenionych fitosteroli w tłuszczu wyekstrahowanym z nasion rzepaku odmiany Rasmus — *GC chromatogram of oxyphytosterols in lipids extracted from Rasmus variety seeds:*

IS – standard wewnętrzny, 1 – miejsce występowania 7 α -OH-K, 2 – miejsce występowania 7 α -OH-St, 3 – 7 α -OH-Sito, 4 – 7 β -OH-K, 5 – 7 β -OH-St, 6 – β -epoksy-K, 7 – α -epoksy-K, 8 – 7 β -OH-Sito, 9 – β -epoksy-St, 10 – α -epoksy-St, 11 – β -epoksy-Sito, 12 – triol-K, 13 – α -epoksy-Sito, 14 – triol-St, 15 – 7keto-K
IS – internal standard, 1 – the place of occurrence 7 α -OH-C, 2 – the place of occurrence 7 α -OH-St, 3 – 7 α -OH-Sito, 4 – 7 β -OH-C, 5 – 7 β -OH-St, 6 – β -epoxy-C, 7 – α -epoxy-C, 8 – 7 β -OH-Sito, 9 – β -epoxy-St, 10 – α -epoxy-St, 11 – β -epoxy-Sito, 12 – triol-C, 13 – α -epoxy-Sito, 14 – triol-St, 15 – 7keto-C

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność pochodnych utlenionych fitosteroli w nasionach wszystkich badanych odmian rzepaku, która wahała się od 10,28 $\mu\text{g/g}$ w nasionach odmiany Kana do 15,43 $\mu\text{g/g}$ w nasionach odmiany Kronos. Analiza statystyczna wykazała istotne zróżnicowanie zawartości sumy oksyfitosteroli w zależności od odmiany. Badane nasiona można podzielić na trzy grupy: pierwsza — gdzie zawartość sumy oksyfitosteroli wynosi około 15 $\mu\text{g/g}$ nasion (odmiany Kaszub, Kronos, Rasmus), druga — około 12–13 $\mu\text{g/g}$ nasion (odmiany Buffalo, Contact i Mazur) i trzecia grupa o zawartości około 10–11 $\mu\text{g/g}$ nasion (odmiany Bor, Capio, Kana i Lisek) — rysunek 2.

Dominującymi związkami we wszystkich odmianach nasion były pochodne 7 β -hydroksy- oraz β -epoksysterolu. Udział pochodnych 7 β -hydroksysterolu we frakcji oksyfitosterolowej wynosił od 38% (odmiana Kronos i Lisek) do 52% (odmiana Capio), a β -epoksysterolu — od 22% (odmiana Kana) do 32% (odmiana Lisek). W nasionach rzepaku odmiany Kronos stwierdzono największą zawartość pochodnych trioli (1,21 $\mu\text{g/g}$, co stanowiło 8% frakcji oksyfitosterolowej) i 7-ketosteroli (2,52 $\mu\text{g/g}$, 16% frakcji oksyfitosterolowej).

W nasionach odmiany Kaszub i Rasmus suma pochodnych utlenionych kampesterolu stanowiła około 34% frakcji oksyfitosterolowej wyekstrahowanego tłuszczu, natomiast w nasionach odmiany Contact ich udział wynosił tylko 20%. Pochodne utlenione stigmasterolu stanowiły od 6% (odmiana Buffalo, Contact, Kana, Mazur) do 9% (odmiana Kaszub, Kronos) sumy wszystkich pochodnych utlenionych. W większości nasion dominowały jednak pochodne utlenione β -sitosterolu, które stanowiły od około 57% (odmiany Kaszub, Kronos) do 74% (odmiana Contact).

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono istotne korelacje pomiędzy zawartością pochodnych utlenionych fitosteroli a zawartością fitosteroli ($R^2 = 0,5366$, $\alpha \leq 0,05$), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ($R^2 = 0,6927$, $\alpha \leq 0,05$) i liczbą nadtlenkową ($R^2 = 0,5283$, $\alpha \leq 0,05$).

Dyskusja

Otrzymane do badań nasiona były dobrej jakości, posiadały niską liczbę nadtlenkową i charakterystyczny dla rzepaku skład kwasów tłuszczowych. Zawartość fitosteroli wynosiła od 4,71 do 6,29 mg/g nasion i była zgodna z danymi literaturowymi. Różnice w zawartości tych związków między poszczególnymi odmianami wynikają z odmienności genetycznej, warunków zbioru i przechowywania oraz wilgotności badanych nasion (Vlahakis i Hazebroek 2000). Wymienieni autorzy podają, że dojrzewanie nasion w wysokiej temperaturze przyczyniło się do 2,5-krotnego wzrostu zawartości w nich fitosteroli, powodując jednocześnie większy przyrost zawartości kampesterolu niż stigmasterolu i β -sitosterolu. Bod-

naryk i in. (1997) wykazali wpływ fungicydów na poziom fitosteroli w rzepaku. Biologiczna rola tych związków nie została do dziś dokładnie zbadana. Hartmann (1998) opisał ich wpływ na membrany komórkowe roślin i stwierdził, że ich zawartość może stać się przedmiotem modyfikacji genetycznych, gdyż ich obecność wpływa na trwałość i odporność termiczną błon komórkowych. Jednocześnie właściwości fitosteroli związane z obniżaniem zawartości cholesterolu we krwi mogą sprzyjać badaniom hodowlanym zwiększającym poziom tych związków w nasionach rzepaku. Jednak należy zwrócić uwagę na obecność w nich pochodnych utlenionych fitosteroli, które mogą tworzyć się w procesach enzymatycznych zachodzących w nasionach.

Przedstawione w niniejszej pracy dane wskazują na obecność oksyfitosteroli we wszystkich badanych odmianach nasion rzepaku ozimego, natomiast w literaturze światowej brak jest jakichkolwiek danych na ten temat. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność od 14 do 18 oksyfitosteroli w zależności od odmiany. Zawartość tych związków wynosiła od 10 do 15 $\mu\text{g/g}$ nasion i dominowały wśród nich pochodne β -epoksy- oraz 7β -hydroksysterole. Udział pochodnych 7β -hydroksysteroli we frakcji oksyfitosterolowej wynosił od 38% do 52%, a β -epoksysteroli — od 22 do 32%. Dane te są zgodne z badaniami Chicoye i in. (1968), Lee i in. (1985) oraz Smith (1996), którzy stwierdzili, że pochodne 7β -OH są bardziej stabilne niż pochodne 7α -OH, co może wpływać na ich dominację we frakcji oksyfitosterolowej. Największa zawartość pochodnych trioli wynosiła 1,21 $\mu\text{g/g}$, co stanowiło 8% frakcji oksyfitosterolowej, a 7-ketosteroli 2,52 $\mu\text{g/g}$ — 16% frakcji oksyfitosterolowej. Dane te zasługują na szczególną uwagę, gdyż pochodne epoksydowe fitosteroli, mimo że ich negatywna aktywność biologiczna jest o połowę niższa od aktywności odpowiednich trioli, to charakteryzują się najwyższą cytotoksycznością wśród przebadanych oksyfitosteroli (5-hydroksy-6-chloro-sitosterolu i diepoksy-stigmasterolu) (Meyer i in. 1998). Autorzy stwierdzili także, że właściwości cytotoksyczne pochodnych α -epoksy- i β -epoksy-fitosteroli są takie same.

Stwierdzono również stosunkowo duży udział we frakcji oksyfitosterolowej, pochodnych utlenionych stigmasterolu. Związki te stanowiły od 3 do 11% frakcji oksyfitosterolowej, podczas gdy udział stigmasterolu we frakcji sterolowej wynosił około 1%. Uzyskane dane mogą świadczyć o tym, że proces utleniania stigmasterolu jest inny niż pozostałych fitosteroli. Prawdopodobnie powodem tego jest obecność wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym stigmasterolu i prooksydatywne właściwości jego pochodnych utlenionych (Blekas i Boskou 1987).

Od około dwudziestu lat odnotowuje się znaczący wzrost zainteresowania żywnością pochodzenia roślinnego. Jest to trend związany między innymi z wpływem cholesterolu, jako sterolu pochodzenia zwierzęcego, na choroby cywilizacyjne. Konsumpcja żywności pochodzenia roślinnego wiąże się ze zwiększonym spożyciem fitosteroli, które mają budowę chemiczną podobną do cholesterolu

i ulegają tak jak cholesterol procesom utleniania, tworząc oksyfitosterole. Rezultaty badań przedstawione w pracy jednoznacznie wskazują, że oksyfitosterole występują w nasionach rzepaku, a przyczyną ich powstawania mogą być procesy enzymatyczne.

Podsumowanie

- Spośród dziesięciu przebadanych odmian rzepaku najwyższą zawartość steroli stwierdzono w odmianach Kronos (6,29 mg/g) i Kaszub (5,96 mg/g), a najniższą w odmianie Buffalo (4,71 mg/g).
- Zawartość oksyfitosteroli w nasionach rzepaku stanowiła około 0,02% w stosunku do zawartości fitosteroli i wynosiła od 10,28 $\mu\text{g/g}$ nasion w odmianie Kana do 15,43 $\mu\text{g/g}$ nasion w odmianie Kronos.
- Dominującymi oksyfitosterolami we wszystkich odmianach nasion były pochodne 7β -hydrokso- (38–52% frakcji oksyfitosterolowej) i β -epoksy-fitosteroli (22–32% frakcji oksyfitosterolowej).
- Pochodne utlenione kampesterolu stanowiły od 20 do 34%, pochodne utlenione stigmasterolu — od 6 do 9%, a pochodne utlenione sitosterolu od 57 do 74% frakcji oksyfitosterolowej w zależności od odmiany.

Results

- The highest content of phytosterols was in Kronos variety seeds (6.29 mg/g) and Kaszub variety seeds (5.96 mg/g), and the lowest was in Buffalo variety seeds (4.71 $\mu\text{g/g}$).
- The content of oxyphytosterols in rapeseeds was about 0.02% of phytosterols and ranged from 10.28 $\mu\text{g/g}$ seeds in Kana variety to 15.43 $\mu\text{g/g}$ seeds in Kronos variety.
- 7β -Hydroxy-sterols (38–52% of oxyphytosterol fraction) and β -epoxy-sterols (22–32% of oxyphytosterol fraction) were dominated oxyphytosterols in all varieties of rapeseed.
- Depending on the variety of rapeseeds, the content of campesterol oxidation products were 20–34%, stigmasterol oxidation products — 6–9% and sitosterol oxidation products — 57–74% of oxyphytosterols fraction.

Literatura

- Blekas G., Boskou D. 1987. Effect of β -sitosterol and stigmasterol on the rate of deterioration of heated triacylglycerols. In: Frontiers of flavor. Proc. Int. 5th Flavor Conf., Porto Karras, Greece 1-3 July 1987. G. Charalambous ed., Elsevier, Amsterdam.
- Blekas G., Boskou D. 1999. Phytosterols and stability of frying oils. In: Frying of food. oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants biologically active compounds and high temperatures. Technomic Publishing Co. Inc., 205-221.
- Bodnaryk R.P., Luo M., Kudryk L. 1997. Effect of modifying the phytosterol profile of canola, *Brassica napus* L., on growth, development, and survival of the bertha armyworm, *Manestra configurata* Walker, the feal beetle, *Phyllotreta cruciferae* and the aphids, *Lipaphis erysimi* and *Myzus persicae*. Can. J. Plant Sci., 77 (4): 677-683.
- Boskou D. 1998. Frying temperatures and minor constituents of oils and fats. Grasas Aceites, 49: 326-330.
- Chicoye E., Powrie W.D., Fennema D. 1968. Isolation and characterization of cholesterol-5 β , 6 β -oxide from an aerated aqueous dispersion of cholesterol. Lipids, 3 (4): 335-339.
- 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.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 726: 497.
- Grandgirard A., Sergiel J.P., Nour M., Demaison-Meloche J., Giničs 1999. Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats. Lipids, 34: 563-570.
- Hartmann M.A. 1998. Plant sterols and the membrane environment. Trends Plant Sci., 3: 170-175.
- Hicks K.B., Moreau R.A. 2001. Phytosterol and phytostanols. Functional food cholesterol busters. Food Technol., 55: 63-67.
- Lee K., Herian A.M., Highley N.A. 1985. Sterol oxidation products in french fries and in stored potato chips. J. Food Prot., 48 (2): 158-161.
- Meyer W., Jungnickel H., Jandke M., Dettner K., Spiteller G. 1998. On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*. Phytochemistry, 47: 789-797.
- Moreau R.A., Norton R.A., Hicks K.B. 1999. Phytosterols and phytostanols lower cholesterol. Inform 10: 572-577.
- Oehrl L.L., Hansen A.P., Rohrer C.A., Fenner G.P., Boyd L.C. 2001. Oxidation of phytosterols in a test food system. JAOCS, 78: 1073-1078.
- PN-ISO 3960. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlencowej.
- Rudzińska M., Jeleń H., Wąsowicz E. 2002. The content of phytosterols and their oxidized derivatives in heated plant oils. Pol. J. Food Nutr. Sci., 11/52: 129-134.
- Rudzińska M., Kuzuś T., Wąsowicz E. 2001. Sterols and their oxidized derivatives in refined and cold pressed seed oils. Rośliny Oleiste, XXII: 477-494.
- Smith L.L. 1996. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. Lipids, 31 (5): 453-487.
- Verleyen T., Forcades M., Verhe R., Dewettinck K., Huyghebeart A., De Greyt W. 2002. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. JAOCS, 78: 117-122.

- 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. 2003. Cholesterol and phytosterols. In: *Chemical and functional properties of food lipids*. Z.E. Sikorski, A. Kołakowska eds., CRC Press LLC: 93-107.