

DOROTA DEREWIAKA, MIECZYŚLAW W. OBIEDZIŃSKI

MODELOWE BADANIA NAD UTLENIANIEM STEROLI

Streszczenie

Celem podjętych badań było określenie wpływu fitosteroli na utlenianie cholesterolu w tłuszczu modelowym. Tłuszczem modelowym był smalec handlowy (I) oraz ten sam smalec z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II). Obróbkę termiczną tłuszczów prowadzono w temp. 150°C, przez 5, 20, 40 i 60 min. Oznaczenia jakościowe i ilościowe steroli oraz oksysteroli wykonano przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym.

Wykazano, że zawartość cholesterolu w próbkach smalcu: bez żadnych dodatków oraz z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli, poddanych obróbce termicznej w temp. 150°C, zmniejszała się wraz z wydłużaniem czasu ogrzewania. W smalcu początkowa zawartość cholesterolu wynosiła 55,4 mg/100 g, natomiast po 60 min ogrzewania obu modelowych tłuszczów zmniejszyła się do 44,8 mg/100 g (I) oraz 38,2 mg/100 g (II).

Wraz z wydłużaniem czasu obróbki termicznej łączna zawartość produktów utleniania cholesterolu w smalcu bez dodatków (I) zwiększała się od 1,5 mg/100 g w próbce ogrzewanej przez 5 min do 4,1 mg/100 g w próbce ogrzewanej przez 60 min. Sumaryczna zawartość produktów utleniania cholesterolu w smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II) początkowo wrastała podczas ogrzewania, osiągając 8,7 mg/100 g po 20 min obróbki. Po upływie 40 oraz 60 min ogrzewania zawartość ta zmniejszyła się, odpowiednio, do 5,5 oraz 2,1 mg/100 g. Zawartość 7-ketositosterolu ulegała dużym wahaniom podczas ogrzewania smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli. W okresie od 5 do 20 min ogrzewania tłuszczu II nastąpił ubytek 7-ketositosterolu z 7,5 do 3,7 mg/100 g, następnie po 40 min obróbki zawartość tego związku gwałtownie wzrosła do 12 mg/100 g, ostatecznie po 60 min obróbki termicznej osiągając 6,4 mg/100 g.

Dodatek preparatu fitosteroli do smalcu prowadzi do przyspieszenia procesu tworzenia się poszczególnych produktów utleniania cholesterolu. Maksymalna zawartość tych produktów w smalcu z dodatkiem preparatu fitosteroli (II) była dwukrotnie wyższa w porównaniu z zawartością w smalcu bez dodatków (I).

Słowa kluczowe: cholesterol, fitosterole, oksysterole, smalec, obróbka termiczna

Wprowadzenie

Sterole pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego są obecne w wielu produktach spożywczych. Przeciętne spożycie fitosteroli w zachodniej diecie kształtuje się na po-

Mgr D. Derewiaka, prof. dr hab. M.W. Obiedziński, Katedra Technologii Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

ziomie od 200–400 mg/dobę. Największy udział wśród spożywanych fitosteroli mają β -sitosterol, kampesterol i stigmasterol, stanowiące odpowiednio 65, 30 i 3% całkowitego ich spożycia. Głównym źródłem fitosteroli są oleje roślinne, owoce i orzechy [10]. Z kolei poziom spożywanego cholesterolu wynosi od 300–500 mg w codziennej diecie. Jego źródłem są mięso, jaja, wędliny, produkty mleczne oraz tłuszcze pochodzenia zwierzęcego. Podczas przetwarzania i przechowywania sterole obecne w produktach spożywczych ulegają przemianom, w wyniku których tworzą się m.in. produkty ich utlenienia [3].

Najczęściej powstającymi produktami utleniania steroli w żywności są: 7α - oraz 7β -hydroksysterole, $5,6\alpha$ - oraz $5,6\beta$ -epoksysysterole, 7-ketosterole oraz triole [7]. Do tychczas przeprowadzone badania wskazują, że produkty utlenienia steroli wykazują działanie: mutagenne, kancerogenne, angiotoksyczne, cytotoksyczne, immunosupresyjne. Związki te powodują zahamowanie syntezy DNA, biosyntezy cholesterolu, zaburzają funkcjonowanie błon komórkowych oraz są inhibitorami kalmoduliny [1, 2, 9, 13, 15, 19]. Należy zaznaczyć, iż bardziej szkodliwe są produkty utlenienia cholesterolu w porównaniu z produktami utlenienia fitosteroli [3].

Obecność oksysteroli została stwierdzona w wielu produktach żywnościowych. Surowe i smażone pulpety oraz hamburgery z mięsa wołowego i wieprzowego zawierały sześć różnych produktów utleniania cholesterolu, których zawartość ogółem wynosiła od 7 do 10 $\mu\text{g/g}$ tłuszczu [8]. Zaobserwowano, że w smażonych pulpetach zawartość oksysteroli zwiększała się wraz z wydłużaniem czasu ich przechowywania do 42 oraz 50 $\mu\text{g/g}$ tłuszczu, odpowiednio po 1 i 2 tygodniach [8]. Johnsson [5] oraz Johnsson i wsp. [6] wykazali, że podczas ogrzewania oleju z oliwki w temp. 180°C przez 2 godz. koncentracja produktów utleniania fitosteroli zwiększyła się z 7,7 do 17,6 $\mu\text{g/g}$, w oleju kukurydzianym zawartość oksysteroli zwiększyła się z 4,3 do 12,2 $\mu\text{g/g}$, natomiast w oleju z orzechów ziemnych nie zaobserwowano zmian zawartości danych związków. Ogrzewanie oleju rzepakowego w temp. 180°C przez 25 min spowodowało wzrost zawartości produktów utleniania fitosteroli z 25,1 do 197,1 $\mu\text{g/g}$. Zbliżony poziom tych związków zaobserwowano we frytkach smażonych przy użyciu oleju rzepakowego, zawierającego 147,6 $\mu\text{g/g}$ produktów utleniania fitosteroli [12]. Pomimo wielu badań nad zawartością cholesterolu, fitosteroli oraz ich produktów utleniania w produktach spożywczych, do chwili obecnej nie określono wpływu obecności fitosteroli na proces powstania produktów utleniania cholesterolu.

Celem podjętych badań było określenie wpływu fitosteroli na utlenianie cholesterolu podczas obróbki termicznej.

Materiał i metody badań

Materiałem do badań modelowych był smalec dostępny na rynku warszawskim oraz preparat fitosteroli firmy Neptune Biotechnologies and Bioresources zawierający

β -sitosterol (50%), kampesterol (30%), stigmasterol (10%), brassikasterol (10%). Badania wykonano na próbkach smalcu handlowego (I) oraz smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II).

Do oznaczenia zawartości steroli oraz produktów ich utleniania pobierano 0,1 g próbki tłuszczu i rozpuszczano w 2 ml heksanu, następnie dodawano standardy wewnętrzne: 5α -cholestan firmy Sigma, 19-hydroksycholesterol firmy Steraloids. Próbkę poddawano transestryfikacji, stosując 0,5 ml 2M KOH w metanolu w ciągu 1 godz., okresowo wytrząsając zawartość próbki. Następnie pobierano do oznaczenia 200 μ l warstwy heksanowej, zagęszczano w atmosferze azotu, dodawano odczynnik sililujący (BSTFA z 1% TCMS) firmy Sigma i prowadzono derywatyzację do estrów silylowych w temp. pokojowej w ciągu 18 godz. Następnie ponownie zagęszczano w atmosferze azotu i dodawano 1 ml heksanu [5, 13, 19].

Analizę prowadzono przy użyciu chromatografu gazowego firmy Shimadzu GC-2010 sprzężonego ze spektrometrem masowym Shimadzu GCMS-QP2010S, stosując kolumnę DB5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) Zebron firmy Phenomenex. Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 230°C, dzielnik strumienia 25:1. Temperatura pracy kolumny: początkowa 50°C przez 2 min, następnie wzrost temp. z szybkością 15°C/min do 250°C, utrzymywanie w tej temp. przez 1 min, ponowny wzrost temp. z szybkością 3°C/min do 310°C i izoterma końcowa przez 10 min. Gazem nośnym był hel, a jego przepływ wynosił 0,94 ml/min. Temperatura łącza GC/MS wynosiła 250°C, temp. źródła jonów - 220°C, widma masowe przemiatane w zakresie masowym - m/z 100-600 przy zastosowaniu energii jonizacji wynoszącej 70eV. Analiza produktów utleniania steroli przebiegała w trybie monitorowania wybranych jonów, dobierając jony selektywne charakterystyczne dla poszczególnych produktów utleniania steroli, przy energii jonizacji wynoszącej 70eV [5, 14, 19].

Analizy każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach. Identyfikacji steroli oraz produktów utleniania steroli dokonano na podstawie porównania czasu ich retencji z dostępnymi standardami oraz widm masowych analizowanych związków z biblioteką NIST 147 oraz Wiley 175. Do obliczeń ilościowych zastosowano technikę dodatku standardów: 5α -cholestanu firmy Sigma i 19-hydroksycholesterolu firmy Steraloids.

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą programu Statistica 6.0.

Wyniki i dyskusja

Zawartość cholesterolu w próbkach modelowych tłuszczów przedstawiono w tab. 1. Zawartość cholesterolu w smalcu (I) poddanym obróbce termicznej w temp. 150°C zmniejszała się wraz z wydłużaniem czasu obróbki, z 55,4 mg/100 g produktu w próbce wyjściowej do 44,76 mg/100 g po 60 min ogrzewania, tj. o 19%. W smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II), po 60 min ogrzewania, zawartość cholesterolu zmniejszyła się o 31%, tj. do 38,2 mg/100 g. Wyniki analiz niniejszej pracy są podobne

do rezultatów uzyskanych przez Osadę i wsp. [9]. Podczas obróbki termicznej standardu cholesterolu, prowadzonej w temp. 150°C przez 60 min, uzyskali oni 10% ubytek zawartości cholesterolu. Wyniki te dowodzą, że wraz z wydłużeniem czasu obróbki termicznej standardu cholesterolu lub tłuszczu pochodzenia zwierzęcego postępuje degradacja cholesterolu. Równocześnie mogą wskazywać, że modyfikujący wpływ na degradację oraz oksydację cholesterolu może mieć dodatek preparatu fitosteroli, jednak wyjaśnienie tego wpływu wymaga dalszych badań.

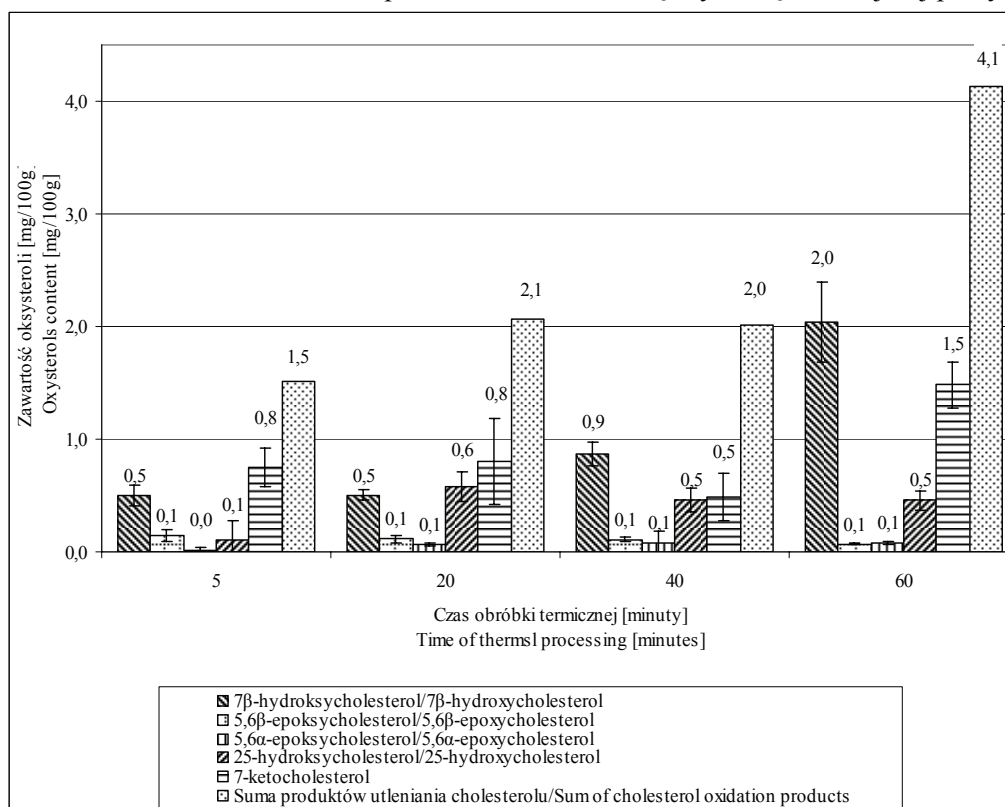
Tabela 1

Zawartość cholesterolu w próbkach smalcu ogrzewanych w temp. 150°C.
Content of cholesterol in the lard samples heated at a temperature of 150°C.

Czas obróbki [min] Time of processing [min]	Zawartość cholesterolu w smalcu handlowym (I) Content of cholesterol in the commercial lard (I)	Zawartość cholesterolu w smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II) Content of cholesterol content in the lard with 10% of phytosterols added (II)
0	55,4 ± 4,7	55,4 ± 4,7
20	55,5 ± 3,6	53,2 ± 5,2
40	46,1 ± 2,8	50,8 ± 4,7
60	44,8 ± 2,4	38,2 ± 2,0

Zawartość produktów utleniania cholesterolu i fitosteroli w próbkach modelowych tłuszczów przedstawiono na rys. 1., 2. oraz 3. W próbkach smalcu (I) poddanych obróbce termicznej w temp. 150°C, trwającej 5, 20, 40 i 60 min, zidentyfikowano następujące produkty utleniania cholesterolu: 7 β -hydroksycholesterol, 5,6 β -epoksycholesterol, 5,6 α -epoksycholesterol, 25-hydroksycholesterol oraz 7-ketocholesterol. Sumaryczna zawartość produktów utleniania cholesterolu wzrastała wraz z wydłużeniem czasu obróbki termicznej próbek. Smalec ogrzewany przez 5 min zawierał 1,5 mg oksysteroli w 100 g, natomiast po 60 min ogrzewania – 4,1 mg/100 g (rys. 1). Produkty utleniania cholesterolu stanowiły od 2,7 do 7,4% zawartości cholesterolu. Spośród wszystkich produktów utleniania cholesterolu, w ogrzewanym smalcu największą zawartość wykazywały: 7-ketocholesterol oraz 7 β -hydroksycholesterol, natomiast zawartość 5,6 β -epoksycholesterolu, 5,6 α -epoksycholesterolu oraz 25-hydroksycholesterolu utrzymywała się na mniejszym i stałym poziomie podczas całego okresu obróbki termicznej. W badaniach innych autorów [17, 18] stwierdzono, że głównym produktem utleniania cholesterolu jest 7-ketocholesterol. Osada i wsp. [9] podczas ogrzewania standardu cholesterolu w temp. 150°C, w okresie od 1 do 24 godz., zidentyfikowali takie same, jak w niniejszym eksperymencie, produkty utleniania cholesterolu, jednak w odmiennych proporcjach, co najprawdopodobniej mogło wynikać z różnic w matrycach tłuszczowych. W innych badaniach [16] zaobserwowano, że ogrzewanie standar-

du cholesterolu w temp. 150°C przez 20 min spowodowało powstanie o 20% większej zawartości 7-ketocholesterolu w porównaniu z wartością uzyskaną w niniejszej pracy.

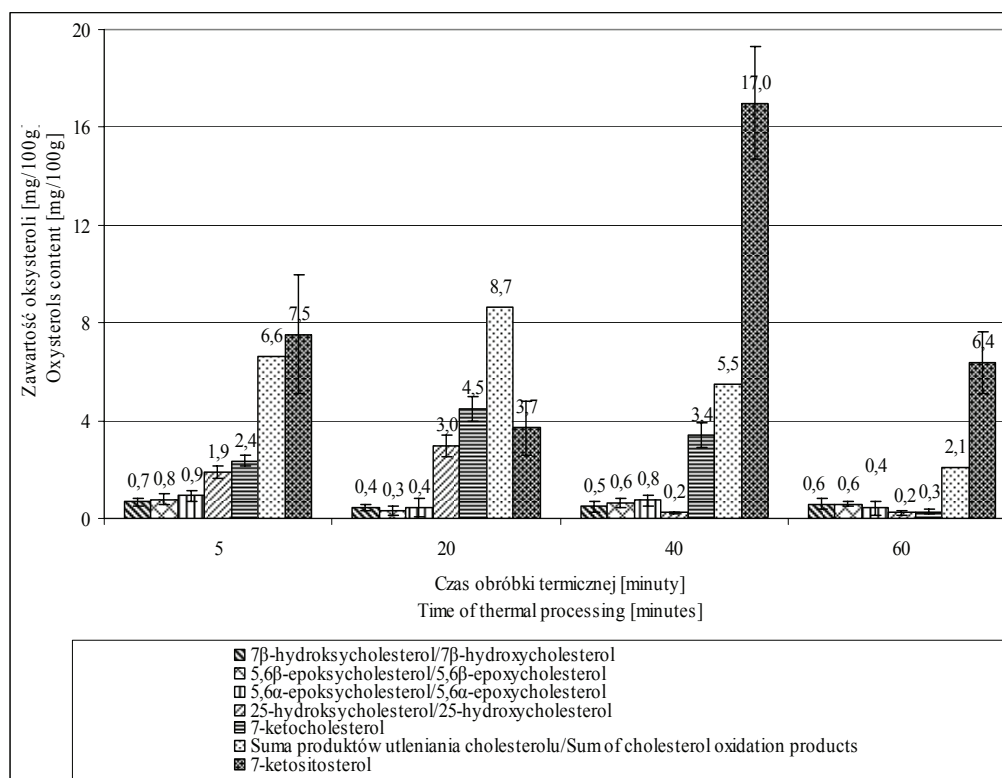


Rys. 1. Zawartość produktów utleniania cholesterolu w próbkach smalcu (I) ogrzewanych w temp. 150°C.

Fig. 1. Content of cholesterol oxidation products in the lard samples (I) heated at a temperature of 150°C.

W próbkach smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II) poddanych działaniu temp. 150°C stwierdzono obecność takich produktów utleniania cholesterolu, jak: 7β-hydroksy-cholesterol, 5,6β-epoksycholesterol, 5,6α-epoksycholesterol, 25-hydroksy-cholesterol, 7-ketocholesterol. Spośród produktów utleniania fitosteroli zidentyfikowano jedynie 7-ketositosterol. Łączna zawartość produktów utleniania cholesterolu zwiększyła się podczas pierwszych 20 min z 6,6 mg/100 g po 5 min i do 8,7 mg/100 g po 20 min, a następnie po upływie 40 oraz 60 min obróbki termicznej zaczęła zmniejszać się do poziomu 5,5 oraz 2,1 mg/100 g (rys. 2). Zawartość 7-ketositosterolu ulegała dużym wahaniom podczas ogrzewania smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli. Po 5 min ogrzewania zawartość 7-ketositosterolu wynosiła 7,5 mg/100 g, po 20 min zmniejszyła się do 3,7 mg/100 g. Po upływie 40 min ogrzewania zawartość

7-ketositosterolu gwałtownie wzrosła do 12 mg/100 g, a następnie, po 60 min obróbki, zmniejszyło się do 6,4 mg/100 g.

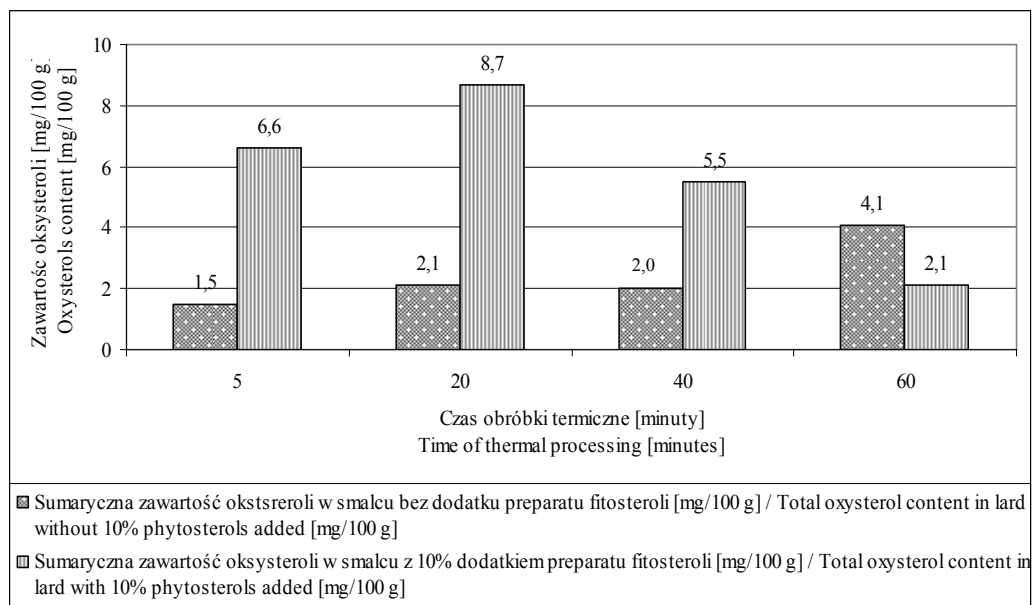


Rys. 2. Zawartość produktów utleniania cholesterolu oraz β -sitosterolu w próbkach smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II), ogrzewanych w temp. 150°C.

Fig. 2. Content of cholesterol and β -sitosterol oxidation products in the lard samples with 10% of phytosterols added (II) and heated at a temperature of 150°C.

Porównując sumaryczną zawartość oznaczonych produktów utleniania cholesterolu podczas obróbki termicznej w obydwu tłuszczach modelowych stwierdzono, że dodatek preparatu fitosteroli zwiększył tempo tworzenia produktów utleniania cholesterolu podczas ogrzewania przez 5, 20 i 40 min, na co wskazuje większa zawartość produktów utleniania (rys. 3). W próbkach smalcu z dodatkiem preparatu fitosteroli, w których zawartość β -sitosterolu była 100-krotnie wyższa od cholesterolu, zawartość produktów utleniania cholesterolu stanowiła od 3,8 do 15,7% jego wartości wyjściowej, a zawartość 7-ketositosterolu stanowiła od 0,07 do 0,33% wartości wyjściowej β -sitosterolu, co dowodzi, że fitosterole ulegały w znacznie mniejszym stopniu utlenianiu niż cholesterol w danym układzie modelowym. Zhang i wsp. [19] stwierdzili, że ogrzewanie standardu β -sitosterolu w temp. 150°C powodowało utworzenie 7-keto-

sitosterolu, który po 5 min stanowił 2% β -sitosterolu, a po 60 min 10% β -sitosterolu. W cytowanej pracy [19] stwierdzono, że spośród wszystkich oznaczonych produktów utleniania β -sitosterolu zawartość 7-ketocholesterolu była największa. Ponadto wykazano [19], że po 60 min ogrzewania oleju oliwkowego i słonecznikowego w temp. 150°C powstający 7-ketositosterol stanowił, odpowiednio, 7 i 4%.



Rys. 3. Sumaryczna zawartość produktów utleniania cholesterolu w próbkach smalcu handlowego (I) oraz smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli (II).

Fig. 3. Total content of cholesterol oxidation products in the samples of commercial lard (I) and of the lard with 10% of phytosterols added (II).

Wnioski

- Obróbka termiczna smalcu handlowego oraz smalcu z 10% dodatkiem preparatu fitosteroli prowadzona w temp. 150°C powoduje zmniejszenie zawartości cholesterolu i powstanie produktów ich utleniania.
- Produktami utleniania cholesterolu w obydwu tłuszczach modelowych były: 7-ketocholesterol, 7 β -hydroksycholesterol, 25-hydroksycholesterol, 7-ketocholesterol oraz 25-hydroksycholesterol, natomiast w smalcu z dodatkiem fitosteroli także 7-ketositosterol.
- Sumaryczna zawartość produktów utleniania cholesterolu w smalcu z dodatkiem preparatu fitosteroli była dwukrotnie większa w porównaniu z zawartością tych związków w smalcu handlowym (bez dodatku fitosteroli).

Praca była prezentowana podczas XII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Lublin, 23–24 maja 2007 r.

Literatura

- [1] Baggio S.R., Bragagnolo N.: The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products. *Food Chem.* 2006, **95**, 611-619.
- [2] Chang Y. H., Abdalla D.S.P., Sevanian A.: Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radical Biol. Med.*, 1997, **23**, 2, 202-214.
- [3] Dean L.O., Boyd L.C.: Chemistry, analysis and occurrence of phytosterol oxidation products in foods. Phytosterol as functional food components and nutraceuticals. Ed. Marcel Dekker, New York 2004, pp. 419-430.
- [4] Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Refecas M., Boatella J.: Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxic.* 1996, **2**, 193-211.
- [5] Johnsson L.: Phytosterol oxidation products. Formation, analysis and occurrence. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004, pp. 46-47.
- [6] Johnsson L., Dutta P.C.: Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chem.* 2006, **97**, 606-613.
- [7] Lampi A.-M., Juntunen L., Toivo J., Piironen V.: Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *J. Chrom. B*, 2002, **777**, 83-92.
- [8] Larkenson B., Dutta P.C., Hansson I.: Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. *JAOAC* 2000, **77**, 6, 675-680.
- [9] Osada K., Kodama T., Yamada K., Sugano M.: Oxidation of cholesterol by heating. *J. Agric. Food Chem.* 1993, **41**, 1198-1202.
- [10] Patel D.M., Thompson P.D.: Phytosterols and vascular disease. Review. *Atherosclerosis* 2006, **186**, 12-19.
- [11] Piironen V., Lampi A.-M.: Occurrence and levels of phytosterols in foods. Phytosterols as functional food components and nutraceuticals. Ed. Marcel Dekker, New York 2004, pp. 1-32.
- [12] Rudzińska M., Korczak J., Wąsowicz E.: Changes in phytosterols and their oxidation products during frying of French fries in rapeseed oil. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2005, **14/55**, 4, 381-387.
- [13] Ryan E., Chopra J., McCarthy F., Maguire A.R., O'Brien N.M.: Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br. J. Nutr.* 2005, **94**, 443-451.
- [14] Santos R., Limas E., Sousa M., da Conceição Castilho M., Ramos F., Noronha da Silveira M.I.: Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Food Chem.* 2007, **102**, 113-117.
- [15] Schmarr H-G, Gross H.B., Shibamoto T.: Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1996, **44**, 512-517.
- [16] Wilczak J., Kulasek G.: Produkty utleniania cholesterolu w produktach pochodzenia zwierzęcego – wpływ na zdrowie zwierząt i ludzi. *Życie Wet.* 2004, **79**, 9, 1-11.
- [17] Xu Z., Zhang T., Prinyawiwatkul W., Godber J.S.: Capabilities of different cooking oils in prevention of cholesterol oxidation during heating. *JAOCS*, 2005, **82**, 4, 243-248.
- [18] Yan P.S., White P. J.: Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. *JAOCS*, 1990, **67**, 12, 927-931.

- [19] Zhang T.: Cholesterol oxidation in roasted salmon fish with different cooking oils. Master of Science Thesis. Louisiana State University, May 2005.

THE PROPERTIES OF EXTRUDED POTATO STARCH MODYFIED BY GLICYNE

S u m m a r y

The studies conducted aimed at the determination of the effect exerted by phytosterols on the oxidation of cholesterol in a model fat. The model fat was commercial lard (I) and the same lard with 10% of phytosterols added (II). The fats were thermally processed at a temperature of 150°C during 5, 20, 40, and 60 min periods. The quantitative and qualitative determinations of sterols and their oxidation products were performed using a gas chromatograph conjugated with a mass spectrometer (GC-MS).

It was found that the content of cholesterol in thermally processed lard samples without any additions and with 10% of phytosterols added decreased with prolonging the time of heating the samples. In the pure lard, the initial content of cholesterol was 55.4 mg/100 g, and it decreased to 44.8 mg/100 g (I) and to 38.2 mg/100 g (II) after the both model samples were heated during a period of 60 min.

Along with prolonging the time of thermal processing, the total content of cholesterol oxidation products (COP's) in lard without the phytosterols added (I) increased from 1.5 mg/100 g in the sample heated during 5 min to 4.1 mg/100 g in the sample processed during 60 min. The total content of cholesterol oxidation products in the lard with 10% of phytosterols added increased at the beginning of the heating and reached a level of 8.7 mg /100 g after 20 min of being processed. After 40 and 60 min of heating, the COP's content decreased to 5.5 mg /100 g and 2.1 mg/100 g, respectively. The content of 7-ketositosterol strongly fluctuated while the lard with 10% of phytosterols added was heated. While the fat (II) was heated during a period from 5 to 20 min, the content of 7-ketositosterol decreased from 7.5 mg/100 g to 3.7 mg/100 g; then, after the 40 min heating, it drastically increased to 12 mg/100 g, and after the 60 min heating, it reached a level of 6.4 mg/100 g.

The addition of phytosterols to the lard causes the formation process of particular cholesterol oxidation products to accelerate. The maximum content of these products in the lard with phytosterols added (II) was twice as high as in the lard without phytosterols added (I).

Key words: cholesterol, phytosterols, oxysterols, lard, thermal processing ☒