

*Dorota Derewiaka, Mieczysław Obiedziński*

## OZNACZENIE ZAWARTOŚCI STEROLI ORAZ PRODUKTÓW UTLENIANIA STEROLI W WYBRANYCH JOGURTACH OWOCOWYCH

Zakład Oceny Jakości Żywności Wydziału Nauk o Żywności  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. *M. Obiedziński*

*Oznaczono zawartość steroli pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego oraz ich utlenionych pochodnych w wybranych jogurtach owocowych przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Stwierdzono, że jogurty zawierały głównie cholesterol oraz produkty utleniania cholesterolu. Sumaryczna zawartość oksysteroli była bardzo niska i wynosiła od 0,2 do 0,4 µg/g produktu.*

Hasła kluczowe: jogurty owocowe, sterole, oksysterole, GC-MS.

Key words: fruity yoghurts, sterols, oxysterols, GC-MS analysis.

Produkty mleczarskie, w tym jogurty stały się w ostatnich latach bardzo popularne wśród polskich konsumentów. W trakcie procesu produkcji jogurtów mleko jest poddawane pasteryzacji i zagęszczaniu, a następnie dodaje się szczepki bakterii fermentacji mlekowej m.in. *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus jogurti*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium* lub *Streptococcus thermophilus*. W wyniku fermentacji cukrów ww. szczepki produkują kwas mlekowy w ilości od 0,8 do 1,0%, nadając jogurtom specyficzny smak, zapach i trwałość (1). Posiadają one również zdolność zasiedlania przewodu pokarmowego człowieka, wpływając na zwiększenie odporności organizmu człowieka na kolonizację przez mikroflorę chorobotwórczą, obniżenie poziomu cholesterolu we krwi, stymulację systemu odpornościowego, zmniejszenie skutków nietolerancji laktozy poprzez wspomaganie jej hydrolizy oraz ochronę przed biegunkami i zaparciami. W związku z wymienionym działaniem bakterii probiotycznych spożywanie jogurtów jest zalecane m.in. dzieciom, alergikom, osobom cierpiącym na dolegliwości układu pokarmowego i osobom starszym (2).

Frakcja tłuszczowa jogurtów zawiera w swym składzie głównie kwasy tłuszczowe oraz cholesterol pochodzące z mleka. Podczas produkcji oraz przechowywania jogurtów cholesterol może ulegać utlenieniu. Na oksydację steroli mają wpływ takie czynniki jak: dostęp tlenu, światła, podwyższona temperatura, obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych, obecności wolnych rodników i nadtlenków, obecności enzymów, występowania jonów metali (szczególnie żelaza i miedzi), obecności barwników naturalnych, np. chlorofilu (3, 4). Powstające w wyniku oksydacji cholesterolu oksysterole wykazują negatywny wpływ na organizm ludzki, ponieważ

działają: mutagennie, kancerogennie, angiotoksycznie, cytotoksyczne, immunosupresyjne, ponadto hamują syntezę DNA oraz biosyntezę cholesterolu oraz zaburzają działanie błon komórkowych (3, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Pomimo, że jogurty charakteryzują się niską zawartością cholesterolu, mogą być źródłem produktów utleniania cholesterolu w diecie człowieka.

Celem pracy było oznaczenie zawartości cholesterolu i fitosteroli oraz produktów utleniania steroli w wybranych jogurtach owocowych.

## MATERIAŁ I METODY

W pracy analizowano produkty mleczne dostępne na rynku warszawskim w okresie od lutego do kwietnia 2007 roku. W doświadczeniu analizowano wybrane jogurty owocowe (produkt 3, 4, 5) oraz jogurty owocowe wzbogacane dodatkiem fitostanoli (produkt 1, 2).

Do wyekstrahowanego tłuszczu dodawano 2 ml heksanu oraz 100 µl roztworu standardu wewnętrznego 5 $\alpha$ -cholestanu (40 µg – oznaczenie ilościowe steroli) oraz 19-hydroksycholesterolu (10 µg – oznaczenie ilościowe produktów utleniania steroli), a następnie mieszano przez 1 minutę. Zmydlanie tłuszczu prowadzono w temperaturze pokojowej, dodając 0,5 ml 2M roztworu KOH w metanolu przez 1–2 godzin, wytrząsając okresowo probówkę. Następnie 200 µl roztworu frakcji niezmydlonej przenoszono do szklanej probówki. Po odparowaniu rozpuszczalników w strumieniu azotu, dodawano odczynniki sililujące (100 µl odczynnika BSTFA z 1% TCMS oraz 100 µl pirydyny), próbkę wytrząsano i prowadzono reakcję dearywatacji w temperaturze pokojowej przez 24 godz., a następnie dodawano 1 ml heksanu. Analizę prowadzono stosując chromatograf gazowy sprzężony z spektrometrem masowym firmy Shimadzu model GCMS-QP2010S, przy użyciu kolumny kapilarnej ze złożem fazy fenylsilikonowej typ DB5ms (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25 µm) firmy Zebron lub DB5 (20 m  $\times$  0,18 mm  $\times$  0,18 µm) firmy Zebron. Temperatura pracy kolumny kapilarnej: początkowa 50°C przez 2 min, wzrost temperatury w tempie 15°C/min do 230°C, następnie programowany wzrost temperatury w tempie 3°C/min do 310°C i izoterma końcowa przez 10 min. Temperatury komory nastrykowej i źródła jonów wynosiły odpowiednio 230°C i 220°C. Gazem nośnym był hel, a jego przepływ wynosił 0,9 ml/minutę z szybkością liniową stałą. Temperatura łącznika GC-MS wynosiła 240°C. Analizy zawartości steroli prowadzono w trybie przemiatań w zakresie 40–600 m/z lub 100–600 m/z, a produktów utleniania steroli w trybie analizowania wybranych jonów. Stosowano standardową energię jonizacji – 70eV. Identyfikacji steroli oraz produktów utleniania steroli dokonywano na podstawie porównania czasów retencji z czasami dostępnych standardów oraz posiadanych oraz utworzonych bibliotek widm masowych, jak również danych literaturowych.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu programu Statistica 7.1. Ocenę istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi sumarycznej zawartości oksysteroli dla poszczególnych jogurtów wykonano stosując test porównań wielokrotnych przy poziomie *istotności*  $p = 0,05$ .

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zawartość tłuszczu w produktach wynosiła od 0,8% do 2,2%. W jogurtach zawartość cholesterolu w przeliczeniu na 100 g tłuszczu była bardzo zróżnicowana i wynosiła od 2,0 do 6,3 mg/100 g produktu. Ogólna zawartość fitosteroli w produktach wzbogacanych w fitosterole, tj. jogurtach 1 i 2, wynosiła odpowiednio 1,5 oraz 0,15 mg w przeliczeniu na 100 g produktu. Przyczyną tak dużych wahań zawartości steroli w poszczególnych produktach były różnice związane z recepturami badanych produktów oraz zawartością tłuszczu (tab. I).

Tab e l a I. Zawartość tłuszczu (g/100 g), cholesterolu oraz fitosteroli (mg/100 g produktu) i zawartość produktów utleniania cholesterolu ( $\mu\text{g/g}$  tłuszczu) w jogurtach

Table I. Content of fat (g/100 g), cholesterol and phytosterols (mg/100 g produktu) and content of cholesterol oxidation products ( $\mu\text{g/g}$  tłuszczu) in fruity yoghurts

Zawartość poszczególnych składników	n	Produkt				
		1	2	3	4	5
Tłuszcz	3	2,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	2,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	2,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Cholesterol	3	2,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	5,1 $\pm$ 1,8 <sup>bc</sup>	6,3 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>
Fitosterole	3	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	nw	nw	nw
Suma PUC	3	13,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	18,1 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	19,4 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	31,6 $\pm$ 4,0 <sup>c</sup>	17,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
7 $\beta$ -hydroksycholesterol	3	7,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	4,5 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	6,5 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>	3,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksycholesterol	3	3,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	nw	6,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	13,8 $\pm$ 2,7 <sup>c</sup>	6,3 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
25-hydroksycholesterol	3	nw	14,3 $\pm$ 1,7	nw	nw	nw
triol	3	1,7 $\pm$ 0,2	nw	nw	nw	nw
7-ketocholesterol	3	nw	nw	8,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	11,3 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	7,4 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>
Suma PUF	3	nw	nw	nw	nw	nw

<sup>a,b</sup>... – jednakowe oznaczenia w wierszach – brak istotnie statystycznie różnic na poziomie  $\alpha \leq 0,05$  między produktami

nw – nie wykryto

W badanych jogurtach stwierdzono obecność następujących produktów utleniania cholesterolu: 7 $\beta$ -hydroksycholesterolu, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksycholesterolu, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksycholesterolu, triolu cholesterolu, 25-hydroksycholesterolu. Sumaryczna zawartość tych związków stanowiła od 13,0 do 31,6  $\mu\text{g}$  w przeliczeniu na 1 g tłuszczu. Wszystkie produkty zawierały w swym składzie 7 $\beta$ -hydroksycholesterol, jest to pochodna utleniania cholesterolu, która powstaje w początkowym etapie oksydacji cholesterolu. Różnice w zawartości pozostałych produktów utleniania cholesterolu wskazują na fakt, że proces oksydacji w każdym z tych produktów miał inny przebieg. Bardziej intensywne utlenianie cholesterolu wystąpiło w produktach 3, 4, 5, o czym świadczy obecność 7-ketocholesterolu, który jest jednym z końcowych produktów

utleniania cholesterolu. Jogurty charakteryzowały się brakiem obecności produktów utleniania fitosteroli, pomimo znacznego dodatku fitosteroli w produkcie 1 oraz 2 (tab. 1).

Uzyskane wyniki są zgodne z opisanymi przez *Hur'a* i współpr. (11), którzy podają, że w jogurcie waniliowym zidentyfikowano obecność następujących pochodnych utleniania cholesterolu: 7 $\beta$ -hydroksycholesterolu, 7 $\alpha$ -hydroksycholesterolu, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoksycholesterolu, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoksycholesterolu, triolu cholesterolu, 7-ketocholesterolu. Ich sumaryczna zawartość była wysoka i wynosiła 13  $\mu\text{g/g}$  produktu. Cenną informacją jest fakt, że we wcześniejszych badaniach stwierdzono, że świeże mleko nie zawierało oksysteroli (12). Natomiast *Zunin* i współpr. (13) oraz *Lercker i Rodriguez-Estrada* (14) oznaczyli zawartość produktów utleniania cholesterolu w mleku w proszku, potwierdzając obecność 7-ketocholesterolu w tym produkcie. Jego zawartość była różna i wynosiła odpowiednio 0,3–0,7  $\mu\text{g/g}$  produktu w mleku w proszku badanym przez *Zunina* i współpr. (13) oraz 2,9–10,4  $\mu\text{g/g}$  w mleku analizowanym przez *Lercker i Rodriguez-Estrada* (14). Przytoczone wyniki doświadczeń jednoznacznie potwierdzają, że obróbka technologiczna jogurtów oraz mleka w proszku przyczyniają się do procesu oksydacji cholesterolu oraz wskazują na znaczne różnice zawartości PUC w produktach. Zastosowane wysokiej temperatury pasteryzacji mleka, kontakt z tlenem atmosferycznym oraz suszenie prowadzi do powstawania produktów utleniania cholesterolu.

Należy zwrócić uwagę, że zawartość sumy PUC w przeliczeniu na masę jogurtów była bardzo niska (od 0,2 do 0,4  $\mu\text{g/g}$  produktu), zatem nie mogą stać się istotnym źródłem pobrania tych wraz z dietą.

## WNIOSKI

Zawartość tłuszczu w analizowanych jogurtach owocowych była niska (od 0,8% do 2,2%). Produkty zawierały głównie cholesterol, którego zawartość wynosiła od 2,0 do 6,3 mg/100 g produktu. Dwa z analizowanych jogurtów zawierały dodatek fitosteroli. We wszystkich produktach stwierdzono obecność produktów utleniania cholesterolu, a ich sumaryczna zawartość w przeliczeniu na 1 g produktu wynosiła poniżej 1  $\mu\text{g}$ , dlatego też jogurty owocowe można uznać za znikome źródło oksysteroli w diecie człowieka.

D. Derewiaka, M. Obiedziński

### DETERMINATION OF STEROLS AND OXYSTEROLS IN SELECTED FRUITY YOGHURTS

#### Summary

The aim of the study was to determine content of cholesterol and phytosterols and sterol oxidation products in selected fruity yoghurts. Cholesterol content in yoghurts was very diverse and ranged from 2.0 to 6.3 mg/100 g of product. Two analyzed yoghurts from five were enriched in phytosterols and their content was from 0.15 to 1.50 mg/100 g of product. Following cholesterol oxidation products were found in yoghurts: 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholesterol, triol, 25-hydroxycholesterol. Total content of these products was very low and was between 0.2–0.4  $\mu\text{g}$  in 1 g of the product.

## PIŚMIENICTWO

1. *Duszkiewicz-Reinhard W., Grzybowski R., Sobczak E.*: Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej, 2003, Wydawnictwo SGGW. – 2. *Socha J., Stolarczyk A.*: Probiotyki i prebiotyki jako przykład żywności funkcjonalnej. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 2002; 4: 1, 15-182. – 3. *Johnsson L., Rolf E., Andersson, Dutta P.C.*: Side-chain autoxidation of stigmasterol and analysis of a mixture of phytosterol oxidation products by chromatographic and spectroscopic methods. *JAOCS* 2003; 80: 777- 783. – 4. *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. – 5. *Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Refecas M., Boatella J.*: Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Tox.* 1996; 2: 193-211. – 6. *Chang Y. H., Abdalla D.S.P., Sevanian A.*: Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23: 202- 214. – 7. *Johnsson L.*: Phytosterol oxidation products. Formation, analysis and occurrence. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004: 46-47. – 8. *Wilczak J., Kulasek G.*: Produkty utleniania cholesterolu w produktach pochodzenia zwierzęcego – wpływ na zdrowie zwierząt i ludzi. *Życie Weterynaryjne* 2004; 79: 1-11. – 9. *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. *Brit. J. Nutr.* 2005; 94: 443-451. – 10. *Zhang T.*: Cholesterol oxidation in roasted salmon fish with different cooking oils. Master of Science Thesis. Louisiana State University, May 2005.
11. *Hur S.J., Park G.B., Joo S.T.*: Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food control* 2007; 18: 939-947. – 12. *Sieber R.*: Oxidized cholesterol in milk and dairy products. *International Dairy Journal* 2005; 15: 191-206. – 13. *Zumin, P., Calcagno C., Evangelisti F.*: Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *Journal of Dairy Research* 1998; 65: 591–598. – 14. *Lercker G., Rodrigues-Estrada M.T.*: Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. Review. *Journal of Chromatography A* 2000; 881: 105-129.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166.