

Olívaolaj szterinfrakciójának gázkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálata

Molnár Jeannette¹⁾, Marco Vincenzo Piretti²⁾, Molnár Pál³⁾

Érkezett: 1993. július 29.

Az olívaolaj zsírsavösszetételére jellemző az olajsavtartalom, de ezenkívül többek között palmitinsavat és linolsavat is tartalmaz [1]. Mivel növényi zsiradékról van szó, hosszú idő óta az az általánosan elfogadott álláspont, hogy un. állati szterint olívaolaj egyáltalán nem tartalmaz [2, 3]. Koleszterin hosszú időn keresztül az állati zsírok indikátoraként szerepelt, és így az olívaolaj is eleve koleszterinmentes ételmiszernek minősült. Ezért gyakran úgy hivatkoznak az olívaolajra, mint a koleszterinmentes diéta egyik biztonságos alkotórészére [pl. 4].

Az analízistechnikák hatalmas léptékű fejlődése következtében az utóbbi időben azonban szaporodnak azok a jelzések, melyek tudományos megalapozottsággal revidiálják a korábban képviselt nézeteket a különböző ételmiszerek és más mezőgazdasági termékek összetételére vonatkozóan. Így például már egy 1972-ben megjelent japán tanulmány [5] jelzi, hogy több növényi eredetű ételmiszerben (burgonya, földimogyoró, szójabab stb.) előfordul a koleszterin. Más irodalmi forrás is utal arra, hogy egyes növényi olajok (pl. kukorica- és repceolaj) közel 1% szterinfrakcióval rendelkeznek és nyomokban tartalmazznak koleszterint is [6].

Közismert, hogy a tömegspektrometria gázkromatográfiával kombinálva igen érzékeny, pontos és megbízható módszer – többek között – ételmiszerek különböző komponenseinek kimutatására és molekulásúlyuk valamint fragmentációs mintájuk alapján azonosításukra.

Anyag és módszerek

Vizsgálati anyag:

Olaszországban forgalmazott finomított olívaolaj

¹⁾ Semmelweis Orvostudományi Egyetem posztgraduális TEMPUS ösztöndíjasa a University of Newcastle, University of Bologna és University of Glasgow egyetemeken

²⁾ Bolognai Egyetem Állatorvosi Biokémia Tanszék

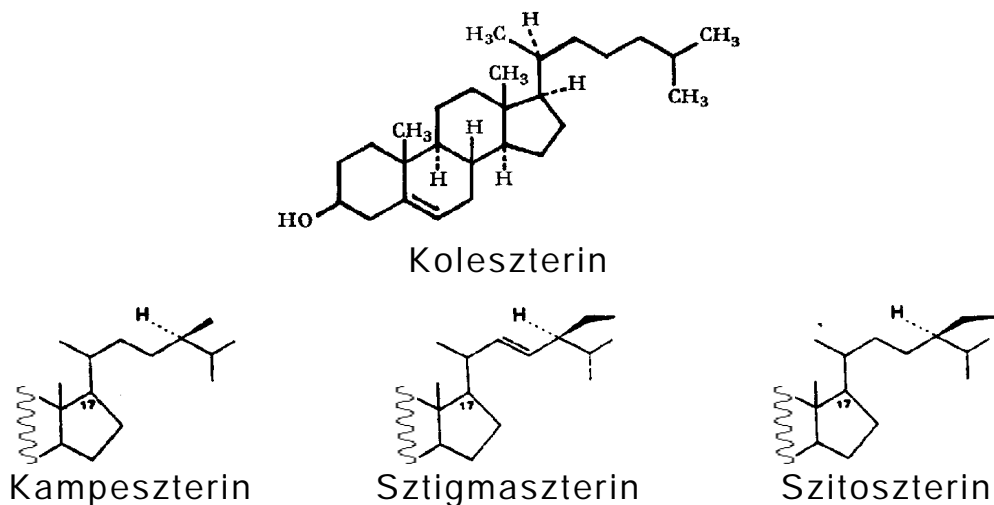
³⁾ Központi Ételmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Szterinfrakció kinyerése a vizsgálatokhoz:

5 g olívaolajhoz hozzáadtunk 50 ml 2 mólos etanolos KOH-ot és az edényt 30 percre 100 °C-ra beállított szilikonfürdőbe helyeztük. A reakciót 50 ml desztillált víz hozzáadásával szakítottuk meg. A nem szappanosítható részt dietiléterrel extraháltuk és vízzel mostuk. Miután az elegy vízmentes Na₂SO₄ felett megszáradt, az éteres oldatot megszűrtük és az oldószert lepároltuk. A szterinfrakciót a többi nem szappanosítható résztől preparatív vékonyréteg-kromatográfián (VKR) különítettük el. A VKR lemezt benzol : acetone (8:2 arányú) elegyében helyeztük és a lemezt 2,7-diklor-fluoreszceinnel permetezzük be, hogy a szterinfoltok UV fényben jól láthatók legyenek. A lemezről lekapartuk a szterinsávot és a szterineket – dietiléterrel extrahálva – benzolban 1mg / 0,1ml-es koncentrációban oldottuk.

Szterinfrakció gázkromatográfiás vizsgálata:

Egy Carlo Erba 4200 típusú gázkromatográfjal (GC) választottuk szét a különböző komponenseket: koleszterin, kampezsterin, sztigmatsterin és szitoszterin (1.ábra). Az alkalmazott apoláros 30 m-es kapilláris oszlop (SE 54) 94%-ban metil-, 5%-ban fenil- és 1%-ban vinilszilikont tartalmazott. Az elválasztást izoterm körülmények között 300 °C-on végeztük.



1. ábra: A koleszterin szerkezeti képlete és a többi vizsgált szterin eltérő részletének képlete

Szterinfrakció gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) vizsgálata:

A vizsgálatokhoz QMD 1000 kvadrupol tömegspektrométert alkalmaztunk, amely egy elektronimpakt (EI) ionforrással volt felszerelve. Az elválasztásra ebben az esetben is 300 °C-on került sor. A különböző molekulatömegű pozitív ionok szétválasztása következtében létrejövő elektromos jelt egy LAB-BASE programcsomag segítségével azonosítottuk.

Eredmények

5 g olívaolaj elszappanosításakor 49 mg nem elszappanosítható anyagot nyertünk, melyből preparatív VRK segítségével 6,87 mg (0,14%) szterint (R_f értéke 0,42) különítettünk el. A VRK futtatás eredményeit az 1. táblázat tartalmazza.

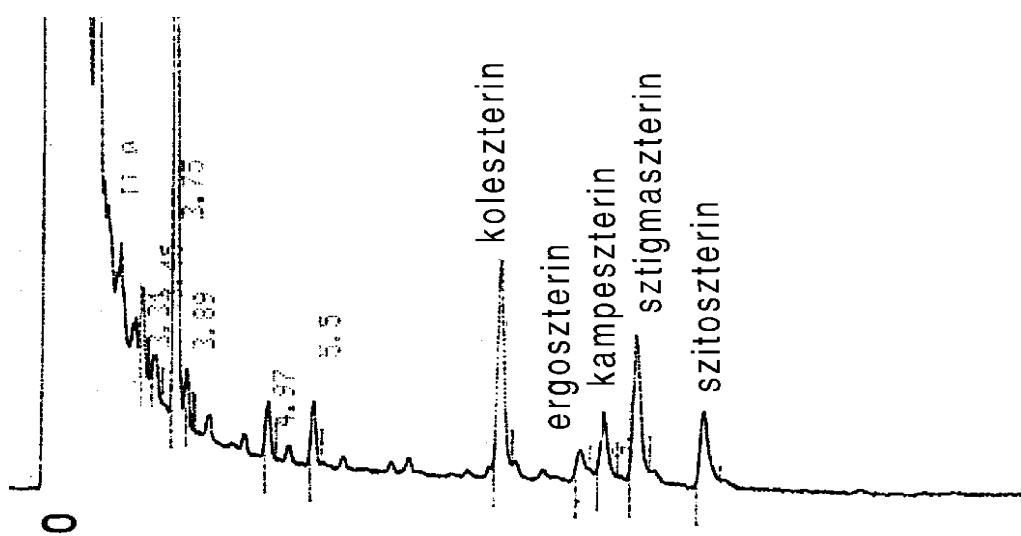
1. táblázat: A VKR elválasztás eredményei

Valószínűsíthető komponens	Natív olívaolaj	Transzmetilált olívaolaj	R_f-érték
Alkohol		x	0,58
Metilészter		x	0,50
Koleszterin		x	0,42
Triglicerid	x		0,30
Erősen poláris lipid		x	0,00

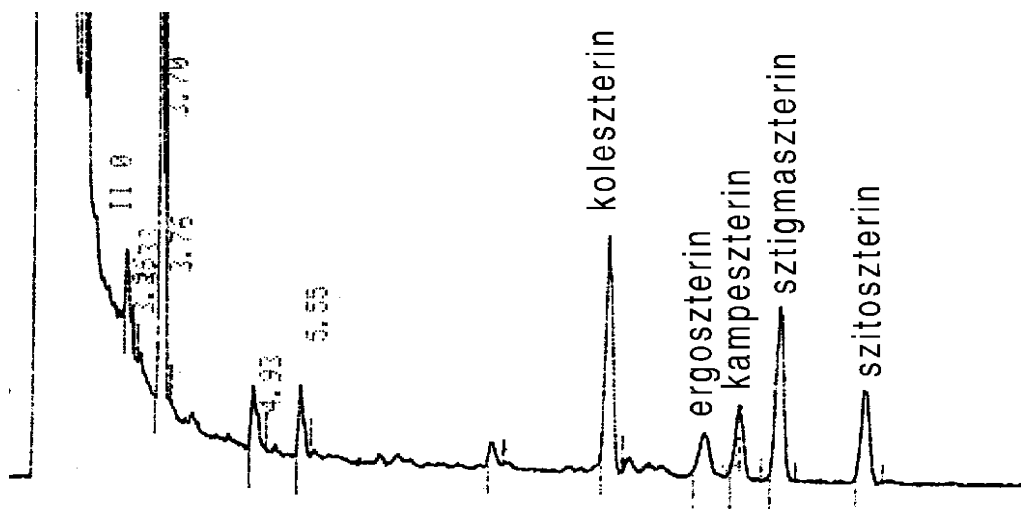
A gázkromatográfiás vizsgálatok eredményeként a 2., 3. és 4. ábrán öt szterin standard (koleszterin, ergoszterin, kampezterin, sztigmatsterin és szitoszterin) szabad, acetilált és trimetilszililált állapotban láthatók.

Nem mutatható ki szignifikáns különbség a retenciós idők (RT) vonatkozásában, de a szililezett szterinek élesebb csúcsai jól észlelhetők. Az 5. ábra mutatja az olívaolaj szterinfrakciójának kismértékű elválaszthatóságát a szililezés előtt. A szililezés után az elválasztás nagy mértékben javul, ami a 6. ábrán látható. Összehasonlítva a 6. ábrán látható retenciós időket a standard szililezett szterinfrakcióéval (4. ábra), az a következtetés vonható le, hogy olívaolajban β -szitoszterin mutatható ki a legnagyobb mennyiségben (~ 83 %), de nyomokban koleszterin (~ 0,7 %), kampezterin (~ 3,4 %) és sztigmatsterin (~ 1 %) is előfordul.

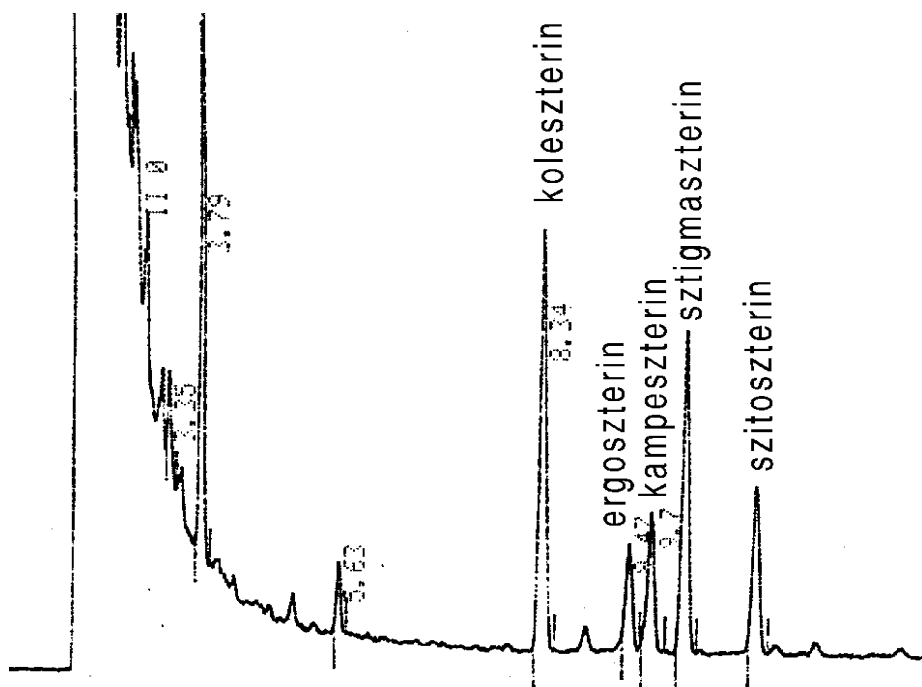
Az ezt követően alkalmazott GC-MS technikával a következő komponenseket sikerült azonosítani (retenciós idő percben): koleszterin (7,92), kampezterin (10,47), sztigmatsterin (11,93) és β -szitoszterin (12,48), amit a 7. ábra mutat. Legnagyobb mennyiségben a β -szitoszterin van jelen, a többi szterin csak nyomokban mutatható ki. Előfordulásuk azonban a tömegspektrogrammal igazolható.



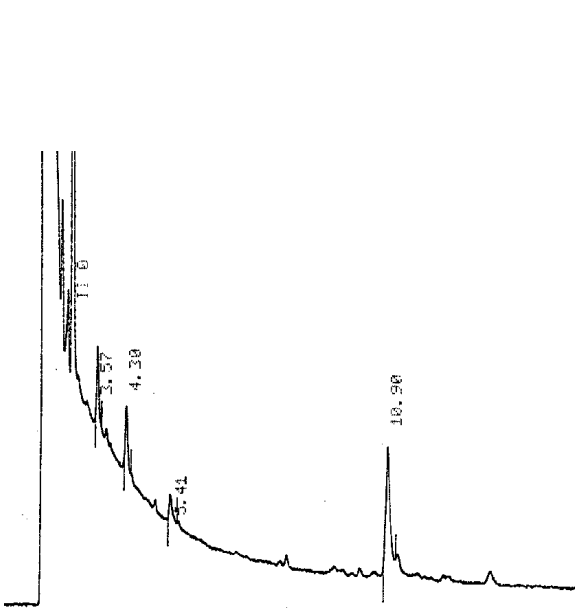
2. ábra: A szabad standard szterinek elválasztása



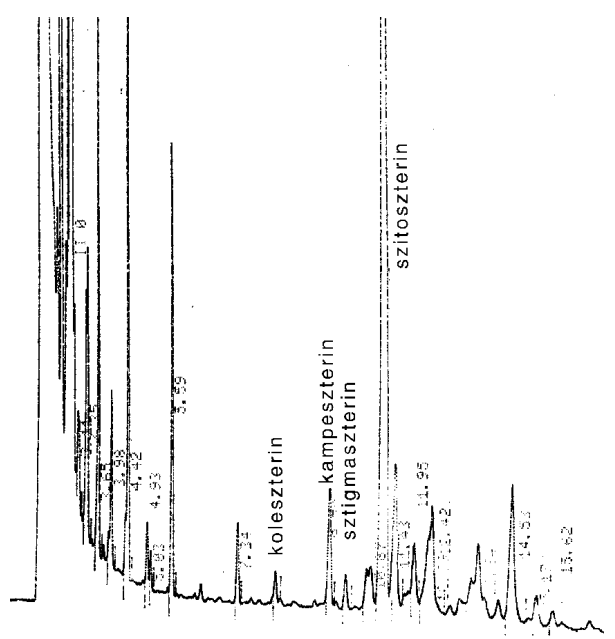
3. ábra: Acetilált standard szterinek elválasztása



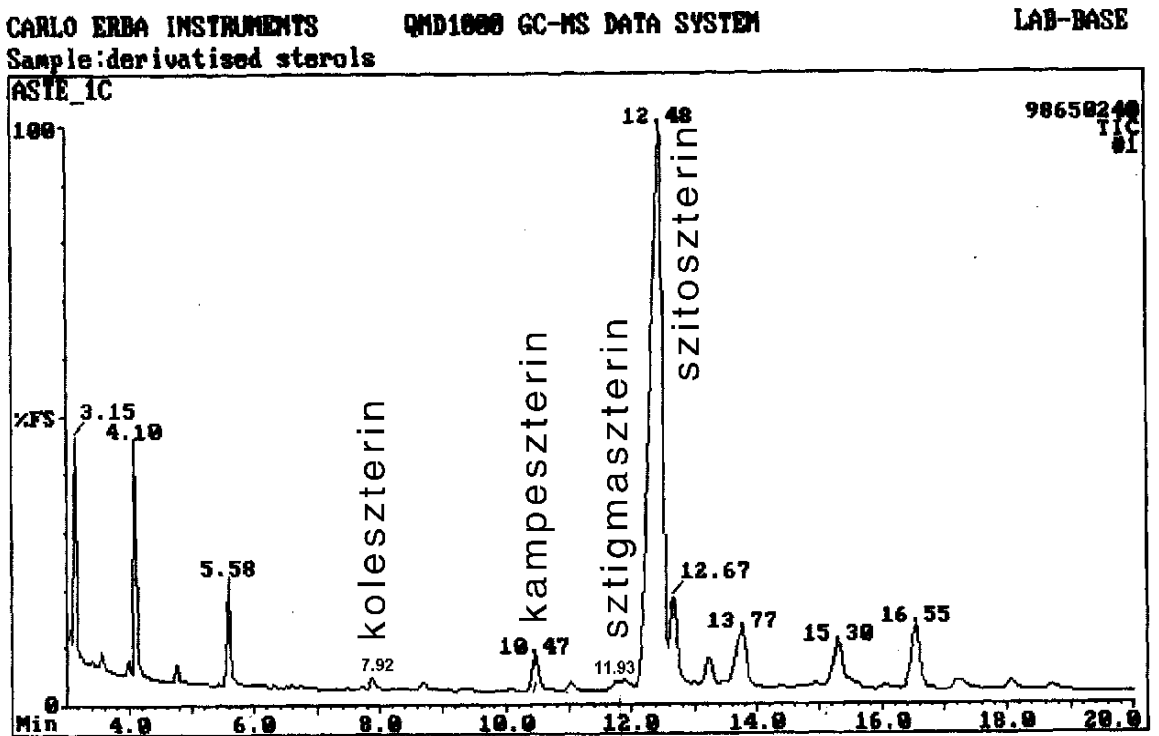
4. ábra: Trimetilszililált standard szterinek elválasztása



5. ábra: Olívaolaj izolált szterinfrakciójának elválasztása szililezés előtt

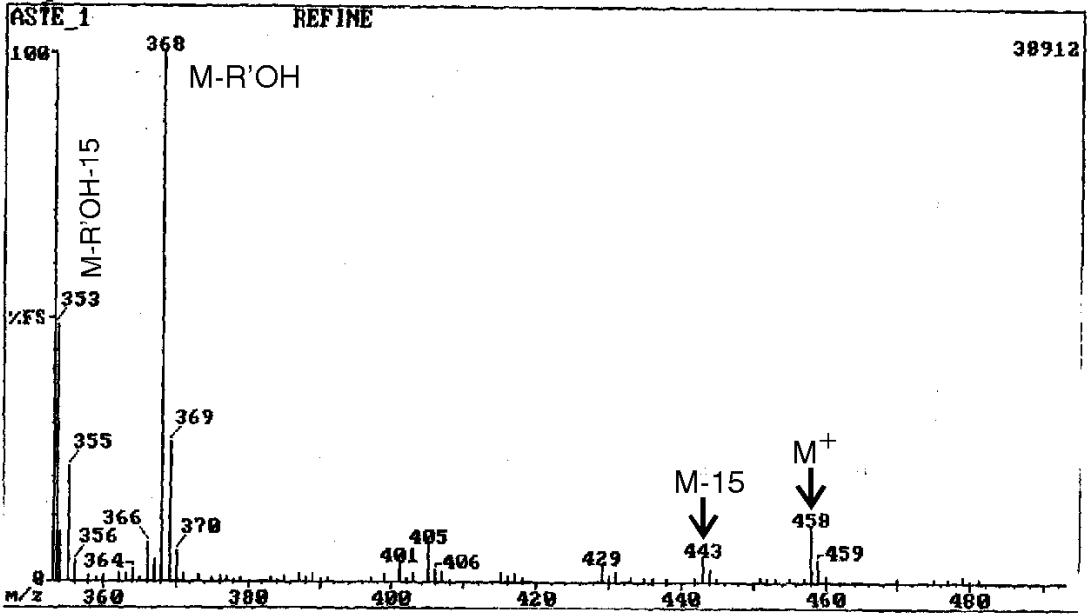


6. ábra: Olívaolaj izolált szterinfrakciójának elválasztása szililezés után



7. ábra: Olívaolaj izolált szterinfrakciójának szililezés utáni GC-MS totálionkromatogramja

A 8. ábra mutatja a koleszterinként azonosított csúcs tömegspektrumát, jelölve a molekuláris iont (458) és további jellemző fragmenseit. A 3. táblázat összefoglalja a koleszterin, a kampezterin, a sztigmatsterin és a szitoszterin tömegspektrometriás azonosításánál felhasznált jellemző fragmensek értékeit.



8. ábra: Az olívaolaj izolált, szililezett szterinfrakciójában koleszterin-ként azonosítható csúcs tömegspektrumának jellemző részlete

2. táblázat: A szililezett szterinek tipikus tömegspektrometriás fragmensei

	Koleszterin	Kampe- szterin	Sztigma- szterin	Szito- szterin
M	458	472	484	486
M-15	443	457	469	471
M-R OH	368	382	394	396
M-15 -R'OH	353	367	379	381
M-67 -R'OH	–	315	327	329

R' - trimetil-szilil

Az alkalmazott módszerrel kimutatott előfordulást és az aránybecs-
léseket igazolják a rendelkezésre álló irodalmi adatok is (3. táblázat).

3. táblázat: Olívaolaj szterinfrakciójának összetétele a
szterinfrakció %-ában

Olívaolaj szterinfrakciója	Mérési eredmény %	Irodalmi adat [6] %
Koleszterin	0,7	nyomok
Kampeszterin	3,4	3,9
Sztigmaszterin	1,0	2,1
Szitoszterin	83,0	85,4

Értékelés és következtetések

A korábbi, de több új irodalmi forrás is az olívaolajat koleszterinmentesnek tekinti, amire már a bevezetőben utaltunk. Ennek oka minden valószínűség szerint abban rejlik, hogy a hagyományos analitikai módszerek nem elég érzékenyek a koleszterin kimutatására ilyen csekély mennyiségben.

A gázkromatográfia és a vele kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) alkalmasnak bizonyult:

- a koleszterin, a kampezterin és a sztigmaszterin azonosítására az alacsony koncentráció ellenére;
- az azonosított csekély koncentrációjú szterinek arányának becslésére.

A vizsgálat sorozat eredményei, melyek megerősítik a koleszterin olívaolajban való előfordulását jelző egyes irodalmi források helyességét, felhívják a figyelmet a koleszterinmentesség definíciójának pontosítására is. Az alkoholmentesnek minősülő gyümölcslevekhöz hasonlóan, melyek esetében az alkoholtartalom csak egy bizonyos határérték alatti koncentrációja engedhető meg, tudományos alapokon kellene meghatározni egy határértéket a koleszterinmentességre is. Ez a határérték pl. növényi zsiradékokra és olajokra azt a koncentrációértéket rögzítené, amely alatt a zsiradék koleszterinmentesnek minősíthető. A konkrét koleszterinkoncentráció ismerete egyébként igen lényeges lenne a koleszterinmentes diéták összeállításához is. Az ilyen csekély koncentrációk meghatározására, azaz a későbbiek során meghatározandó határérték betartásának ellenőrzésére a kísérletek során alkalmazott módszer megfelelő belső standarddal jól használható.

Irodalom:

1. Gasztonyi Kálmán és Lásztity Radomir: Élelmiszer-kémia 1., Mezőgazda Kiadó, Budapest, 1992.
2. Souci, Fachmann, Kraut: Food Composition and Nutrition Tables 1989/90, 4th revised and completed edition, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1989.
3. McCance és Widdowson's: The composition of foods, The Royal Society of Chemistry, 5th edition, 1991.
4. Experimental atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free diets. Comparison of peanut and olive oils. Kritchevsky, D., Tepper S.A., Klurfeld D.M., Vesselinovitch D., Wissler R.W., *Atherosclerosis*, **50** (1984) 253–259
5. Oka, Y., Kiriya, S., Yoshida, A.: Sterol composition of Japanese vegetable foodstuffs. II. Sterol composition of cereals, potatoes, seeds, nuts and pulses. *Journal of the Japanese Society of Food and Nutrition*, **25** (1972), 7, 543–549
6. H.-D. Belitz és W. Grosch: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1982.

Olívaolaj szterinfrakciójának gázkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálata

Molnár, J., Piretti, M.V. és Molnár, P.

Olívaolaj vékonyréteggromatográfiával előzetesen elválasztott szterinfrakcióját vizsgálták kapilláris gázkromatográfia és egy elektronimpakt ionforrással felszerelt tömegspektrométerrel. A legnagyobb mennyiségben β -szitoszterint sikerült kimutatni, de a kísérletek bizonyították koleszterin, kampesterin és sztigmaszterin kis mennyiségű előfordulását is. Az alkalmazott GC-MS módszer más szakirodalmi jelzésekkel összhangban megerősítette koleszterin előfordulását olívaolajban, amit mértékadó szakirodalmi források általában még jelenleg is kizárnak. Mindez felveti egyúttal a koleszterinmentesség határértékének tudományos megállapítását és jogszabályi rögzítését is.

Investigation of the sterol fraction of olive oil by gaschromatography and mass spectrometry

Molnár, J., Piretti, M.V. and Molnár, P.

Sterol fraction of olive oil separated previously by TLC was analysed by capillary gas chromatography and by a mass spectrometer equipped with an electron impact ion source. The results indicate a relatively high amount of β -sitosterol whereas the experiments also confirmed the presence of cholesterol, campesterol and stigmasterol in low quantities. Although generally still refused by competent references, the presence of cholesterol in olive oil could be verified applying GC-MS which had been previously indicated by recent publications. It is concluded that these findings require a scientific determination and legal definition the cholesterol limit of vegetable oils to be labelled of cholesterol free.

Untersuchung der Sterinfraktion von Olivenöl mit Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Molnár, J., Piretti, M.V. und Molnár, P.

Dünnschichtchromatographisch separierte Sterinfraktion des Olivenöls wurde kapillargaschromatographisch und mit einem Massenspektrometer, der mit einer Elektronimpakt Ionenquelle ausgerüstet ist, untersucht. β -Sitosterin konnte in relativ grosser Menge nachgewiesen werden, wobei die Versuche auch das Vorkommen von Cholesterin, Stigmasterin und Kampesterin in geringer Menge bestätigt haben. Mit der angewandten GC-MS Methode konnte somit in Übereinstimmung mit anderen Literaturhinweisen das Vorkommen von Cholesterin in Olivenöl bekräftigt werden, was die maßgeblichen Literaturquellen im allgemeinen auch heute noch verneinen. Diese Tatsache wirft gleichzeitig die wissenschaftlich begründete Ermittlung des Grenzwertes für die Cholesterinfreiheit sowie auch seine gesetzliche Festlegung auf.