

VALIDACIJA IN UPORABA METODE ZA DOLOČANJE STEROLOV V RIČKOVEM OLJU

Zala KOLENC²², Tanja POTOČNIK²³ in Iztok Jože KOŠIR²⁴

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 6. 11. 2017

Sprejeto / accepted: 23. 11. 2017

Izveček

Ričkovo olje ima ugodne prehranske in zdravstvene učinke zaradi svoje sestave maščobnih kislin, tokoferolov in glukozinolatov, kot tudi zaradi edinstvene sterolne sestave. V vzorcih ričkovega olja smo določili vsebnost sterolov s plinsko kromatografijo ob uporabi internega standarda (betulin). Ekstrakcija sterolov je potekala tako, da smo vključili saponifikacijo ter v nadaljevanju tudi ekstrakcijo na trdnem nosilcu (C18-E-SPE). Metodo smo validirali in rezultati kažejo, da je metoda specifična, selektivna, ponovljiva ter obnovljiva. Rezultati kažejo zelo visoko točnost (85 do 98 %) ter linearnost s korelacijskim koeficientom več kot 0,99 (tako za posamezne sterole kot betulin). Določili smo povprečne vsebnosti sterolov v vzorcih ričkovega olja, ki izvirajo iz Slovenije in določili, da so povprečne koncentracije brasikasterola 21,4 mg/100g olja, kampesterola 153,6 mg/100g olja, stigmasterola 3,9 mg/100g olja in β -sitosterola 447,0 mg/100g ričkovega olja.

Ključne besede: ričkovo olje, steroli, določanje sterolov, plinska kromatografija

VALIDATION OF METHOD FOR STEROL DETERMINATION AND ITS USE IN CAMELINA OIL

Abstract

Camelina oil has appropriate nutritional and health properties due to fatty acids, tocopherols and glucosinolates content and especially because of unique sterol composition. Sterols in camelina oil samples were determined by gas chromatography using internal standard (betulin). The method includes saponification step followed by solid phase extraction on C18-E-SPE. The method was validated and the results proved that the chosen method is specific, selective, repeatable and reproducible. Furthermore, results confirmed very good recovery (85% to 98 %) and linearity with the correlation coefficient of more than 0,99 for

²² Dr. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, Slovenija, e-pošta: zala.kolenc@ihps.si

²³ Dipl. inž. živ. teh., prav tam, Slovenija e-pošta: tanja.potocnik@ihps.si

²⁴ Dr., prav tam, e-pošta: izok.kosir@ihps.si

all sterols used and betulin as well. The quantitatively assessed average contents of sterols in camelina oil samples of Slovenian origin were 21.4 mg/100g for brassicasterol, 153.6 mg/100g for campesterol, 3.9 mg/100g for stigmasterol and 447.0 mg/100g for β -sitosterol.

Keywords: camelina oils, sterols, sterol determination, gas chromatography

1 UVOD

Riček (*Camelina sativa* (L.) Crantz) je v Sloveniji uveljavljen kot alternativna oljna poljščina z visoko prehransko vrednostjo semen (ali olj). Botanično spada riček v skupino *Brassicaceae* in je v Sloveniji imenovan tudi nepravi lan ("false flax") ali zlato radosti ("gold of pleasure") (Bavec, 2001). Rode (2002) navaja, da naj bi v Sloveniji imenovali navadni riček tudi "toter". Ričkovo olje je v zadnjem času vedno bolj popularno, saj ga uvrščamo med potencialna funkcionalna živila zaradi njegovih pozitivnih lastnosti na zdravje in ugodne kemijske sestave. Za funkcionalna živila se namreč lahko štejejo živila, za katera je dovolj trdno dokazano, da imajo razen svoje hranilne vrednosti še poseben vpliv na zdravje človeka, njegovo fizično in psihično storilnost ter na počutje. Po drugi strani se ričkovo olje ne uporablja le za prehrano, ampak tudi za proizvodnjo biodizla (z nižjimi proizvodnimi stroški kot oljna ogrščica) ter v kozmetični industriji za izdelke namenjene negi kože.

Posušena semena navadnega rička vsebujejo 30 – 40 % olja v suhi snovi, pri zimskih sortah se vsebnost olja v suhih semenih lahko dvigne tudi do 45 % (Zubr in Matthäs, 2002). Postopek proizvodnje ričkovega olja poteka tako, da najprej semena dobro zdrobimo in nato tako pridobljeno maso stiskamo pri temperaturi 100 °C. Tako dobimo ričkovo olje, ki je lepe rumene barve z značilnim vonjem in močnim okusom. Če olje uporabljamo v prehrani ljudi ali v kozmetične namene, se na koncu opravi še postopek deodorizacije.

Ričkovo olje vsebuje približno 50 % večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), delež linolne kisline (LA) je približno 15 %, delež α -linolenske kisline (ALA) pa približno 40 % (Zubr in Matthäus, 2002). Olje navadnega rička vsebuje 15 - 20 % oleinske kisline in tudi 15 - 20 % linolenske kisline, 10 - 15 % gondojske kisline in 3 % eruka kisline (Hratar, 2011). Idealno razmerje n:6/n:3 maščobnih kislin v oljih za uživanje znaša 5:1. Ker ima ričkovo olje visoko vsebnost n:3 maščobnih kislin, lahko zelo pozitivno vpliva na izboljšanje razmerja n:6/n:3. Ričkovo olje je bogato tudi z visoko vsebnostjo antioksidantov kot je tokoferol, ki ga je v povprečju 700 mg/kg ričkovega olja. Visoka vsebnost glukozinolatov je tudi značilna za ričkovo olje, kar je pomembno za povečanje oksidativne stabilnosti (García-Llatas in Rodríguez-Estrada, 2011).

Rastlinski steroli (fitosteroli) so prehransko zelo pomembni lipidi kot neumiljive komponente olj. Fitosteroli imajo veliko pozitivnih učinkov, zaradi česar lahko živila, ki imajo večjo vsebnost le-teh, štejemo med funkcionalna živila. Fitosteroli naj bi v optimalni kombinaciji z drugimi rastlinskimi metaboliti kazali antikancerogene učinke (Cañabate-Díaz in sod., 2007). Fitosteroli so po kemijski strukturi zelo podobni holesterolu, razlike so pri sintezi, intestinalni absorpciji in metabolizmu. Ravno zaradi tega fitosteroli "tekmujejo" za vezavo na iste receptorje v prebavnem traktu človeka kot holesterol, kar se kaže v zmanjšanju vsebnosti skupnega holesterola in LDL (low density) holesterola v krvi (Moghadasian in sod., 1999). Na takšen način lahko s povečanim uživanjem fitosterolov (2 g na dan uživanja sterolov in stanolov) zmanjšamo LDL holesterol do 10 %, medtem ko se uživanje večjih količin sterolov ne kaže v dodatnem znižanju vsebnosti LDL holesterola v krvi človeka.

Rastlinska olja so kompleksne mešanice neumiljivih komponent v lipidih ter kompleksnih matriksih, zato je določanje koncentracije sterolov zahtevno. Analitske tehnike za določanje sterolov tako vključujejo procese ekstrakcije, izolacije, separacije, purifikacije, detekcijske in kvantifikacije. V več raziskavah se je kombinacija ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) v kombinaciji s plinsko kromatografijo (GC) izkazala za najbolj primerno metodo za določanje koncentracije sterolov v oljih (Toivo in sod., 2001; Lagarda in sod., 2006; Al-Ismail in sod., 2010).

Namen raziskave je bil validirati metodo za določevanje koncentracije sterolov v ričkovem olju in jo preizkusiti na vzorcih ričkovega olja slovenskega izvora.

2 MATERIAL IN METODE

Uporaba GC kot analitične metode za določanje sterolov se kaže kot bolj natančna in občutljiva v primerjavi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (Abidi, 2001). Tako smo v naši raziskavi opravili najprej saponifikacijo sterolov (tako smo sterole sprostili), nato ekstrakcijo na trdni fazi, da smo sterole ločili iz vzorca. Sledila je analiza (detekcija) sterolov na GC (Povše, 2012).

2.1 Vzorci v analizi

Uporabili smo vzorce ričkovega olja, katerih semena so bila nabrana pri pridelovalcih po Sloveniji. Olje iz tako pridobljenih semen je bilo iztisnjeno v laboratoriju Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

2.2 Reagenti

Uporabljeni reagenti etanol (99,8 %), betulin (97,5 %), kloroform (99,0 – 99,4 %), metanol (99,9 %), stigmasterol (95 %), kampesterol (65 %), brasikasterol (98 %), β -sitosterol (90 %) so bili vsi proizvodi podjetja Sigma-Aldrich (Nemčija), kalijev hidroksid pa podjetja Riedel-de-Haën (Švica). Standardi so bili pripravljene v raztopini metanol/kloroform (5 % v/v). Delovne raztopine standardov so bile v koncentracijah: kampesterol (1 mg/mL), β -sitosterol (5 mg/mL), stigmasterol (10 mg/mL) in brasikasterol (5 mg/mL).

2.3 Priprava vzorca

Priprava vzorca je eden kritičnih korakov v analizi. V naši raziskavi smo uporabili 0,74 g vzorca ričkovega olja, ki smo mu dodali 10 mL 0,5 M KOH v etanolu. Tako raztopino smo dobro premešali in za 20 minut pri 77 °C segrevali. Po ohlajanju smo dodali 10 mL 0,22 mg/mL betulina (interni standard) v kloroformu in mešali 5 minut. Nato smo pustili, da se je usedlina posedla in tekočo fazo prefiltrirali ter filtrat uporabili za nadaljnjo ekstrakcijo. Sledila je ekstrakcija na trdi fazi z nosilcem (cartridges condition strata) C18-E-SPE (55 μ m, 70A, Phenomenex). Nosilce smo pred ekstrakcijo izpirali z metanolom (5 mL), nato s kloroformom (5 mL), zatem pa smo dodali 1 mL saponificiranega vzorca z dodanim internim standardom. Sterole smo izprali z metanolom v kloroformu (5 % v/v). Zbran ekstrakt smo evaporirali (pri 35 °C) do suhega, sterolno frakcijo pa raztopili v 1 mL istega topila.

2.4 Plinska kromatografija

Plinsko kromatografijo smo opravili na napravi Agilent 6890 gas chromatograph (Santa Clara, USA), opremljenim s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Uporabili smo kapilarno kolono HP-5 (J&W Scientific, ZDA) dolžine 30 m, premera 0,32 mm in filmom debeline 0,25 μ m s stacionarno fazo 5 %fenil-metil polisiloksan, 95 % dimetil polisiloksan. Konstantni pretok nosilnega plina - helija smo nastavili na 1 mL/min, uporabljena temperatura injiciranja je bila 320 °C, temperatura detektorja pa 300 °C. Temperaturni program je naraščal od 220 °C do 350 °C in sicer za 3 °C/min, na koncu pa se je temperaturni profil ustavil pri temperaturi 350 °C za 6 minut. Za GC analizo smo injicirali 2 μ l vzorca. Identifikacija sterolov (brasikasterol, stigmasterol, β -sitosterol, kampesterol) je bila opravljena s primerjavo retenzijskih časov (t_r) standardov omenjenih sterolov glede na retenzijski čas internega standarda (betulina).

2.5 Validacija metode

Da smo metodo validirali smo najprej določili ponovljivost in obnovljivost metode. Tako smo v prvem delu optimizirali pogoje priprave vzorca in GC analize, nato smo z določenimi pogoji analizirali posamezne standarde, da smo jim določili t_r , nato pa smo analizirali tudi mešanico vseh standardov in poskrbeli, da smo dobili popolno ločljivost posameznih kromatografskih vrhov. Na takšen način smo določili specifičnost in selektivnost. Določili smo tudi ponovljivost in časovno obnovljivost metode tako, da smo dva zaporedna dni naredili 6 meritev na istem vzorcu ričkovega olja. Za določanje točnosti (recovery) smo v vzorec ričkovega olja dodali standardno mešanico sterolov (16,7 mg brasikasterola, 3,6 mg stigmasterola, 81,2 mg kampesterola in 16,6 mg β -sitosterola). Za določanje linearnosti metode smo izračunali korelacijski koeficient za posamezen sterol v delovnih koncentracijah. In sicer za betulin 0,058 – 0,220 g/L, za brasikasterol 0,00154 – 0,15 g/L, za kampesterol 0,00544 – 0,6 g/L, za stigmasterol 0,00307 – 0,3 g/L in za β -sitosterol 0,0082 – 0,8 g/L.

2.6 Analiza vzorcev

V analizo smo vključili 21 vzorcev ričkovega olja (kot je opisano v točki 2.1) slovenskega porekla. Izračunali smo povprečne vrednosti, standardno deviacijo ter relativno standardno deviacijo za posamezen sterol.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za validacijo metode, smo najprej določili t_r za vse standarde, ki smo jih v analizi uporabili, vključno z betulinom, ki nam je služil kot interni standard. Tako smo pridobili vrednosti za brasikasterol (6,03 min), kampesterol (6,23 min), stigmasterol (6,33 min), β -sitosterol (6,65 min) in betulin (8,19 min). Rezultati kažejo, da je metoda specifična in selektivna, saj smo dosegli popolno ločbo kromatografskih vrhov.

V nadaljevanju smo določali ponovljivost in obnovljivost metode, rezultati so prikazani v preglednici 1. Meritve so bile izvedene v 6. ponovitvah. Nobena izmed meritev ni bila mimobežnik. Rezultate meritev prvega in drugega dne smo primerjali s t-testom in ugotovili, da so med sabo primerljivi (preglednica 1). Relativni standardna deviacija meritev za posamezen sterol je bil 4,9 % za brasikasterol, 6,6 % za kampesterol, 38,1 % za stigmasterol in 7,0 % za β -sitosterol. Iz rezultatov lahko zaključimo, da je metoda ponovljiva in obnovljiva.

Preglednica 1: Rezultati za določanje ponovljivosti in obnovljivosti metode

Sterol	Vsebnost sterolov 1. dan (mg/100 g)*	Vsebnost sterolov 2. dan (mg/100 g)*	F- izračunan	t- izračunan
Brasikasterol	18,3 ^a ± 0,9 ^b	18,8 ± 0,9	0,861	1,02
Kampesterol	175,2 ± 11,5	179,8 ± 12,4	0,849	0,66
Stigmasterol	5,5 ± 2,1	4,8 ± 2,4	0,802	0,45
β-sitosterol	501,7 ± 35,6	540,4 ± 26,1	1,862	2,15

^apovprečje; ^bstandardna deviacija; za primerjavo F-testa in t-testa izračunanih vrednosti uporabimo teoretične (F- teoretična vrednost je 5,829 in t-teoretična vrednost je 2,23).

Za določanje točnosti (recovery) smo vzorcu ričkovega olja (s predhodno določeno koncentracijo sterolov) dodali znano količino sterolov, jih ponovno pomerili in določili izkoristek. Rezultati kažejo zelo dober izkoristek in sicer za brasikasterol 85,7 %, za kampesterol 90,0 %, za stigmasterol 85,1 % in za β-sitosterol 98,1 % (preglednica 2).

Preglednica 2: Rezultati meritev izkoristka za posamezne sterole s standardnim dodatkom vzorcu ričkovega olja

Ime vzorca	Koncentracija sterolov (mg/100 mL)			
	Brasikasterol	Kampesterol	Stigmasterol	β-sitosterol
Vzorec brez dodatka	22,2	134,7	5,0	474,9
Vzorec z dodatkom*	33,3	146,4	7,3	482,3
Standardni dodatek (%)	85,7	90,0	85,1	98,1

*dodana je bila znana koncentracija sterolov (16,7 mg brasikasterola, 3,6 mg kampesterola, 1,2 mg stigmasterola in 16,6 mg β-sitosterola)

Linearnost metode smo določali v območju, ki smo da uporabljali v metodi. Rezultati kažejo, da je metoda linearna v delovnih koncentracijah, ki smo jih uporabili, s korelacijskimi koeficienti med 0,991 in 0,997. V preglednici 3 so podani rezultati določanja linearnosti, s korelacijskimi koeficienti in enačbami umeritvenih krivulj.

Na podlagi vseh pridobljenih rezultatov smo opisano in validirano metodo za določanje sterolov uporabili za določitev sterolov v realnih vzorcih ričkovega olja. V preglednici 4 so prikazane povprečne vrednosti posameznih sterolov, standardni in relativni standardni odklik in minimalne ter maksimalne vsebnosti posameznih sterolov.

Preglednica 3: Rezultati določitve linearnosti s pripadajočim korelacijskim koeficientom, umeritveno krivuljo in koncentracijskim območjem

	Korelacijski koeficient (R^2)	Linearna enačba
Betulin	0,993	$y = 2719x + 6,890$
Brasikasterol	0,994	$y = 1827x - 6,345$
Kampesterol	0,997	$y = 2588x - 19,050$
Stigmasterol	0,991	$y = 2381x - 3,831$
β -sitosterol	0,996	$y = 2181x - 32,730$

Preglednica 4: Povprečna vsebnost posameznih sterolov v vzorcih ričkovega olja

Sterol	Povprečje (mg/100g)*	SD (mg/100g)	RSD (%)	min-max (mg/100g)
Brasikasterol	21,4	4,5	21,0	15,9 – 34,5
Kampesterol	153,6	21,1	13,7	121,8 – 199,4
Stigmasterol	3,9	1,7	43,6	1,4 – 6,9
β -sitosterol	447,0	68,2	15,3	324,1 – 552,8

*n= 21, SD= standardna deviacija, RSD= relativna standardna deviacija

Povprečna vrednost vsebnosti brasikasterola v ričkovem olju je 21,4 mg/100 g, kar je primerljivo z raziskavo Schwartz in sod. (2008), ki so koncentracijo brasikasterola v ričkovem olju določili 27 mg/100 g. Vsebnost kampesterola smo določili v ričkovem olju v povprečju 153,6 mg/100g, medtem ko so v raziskavi Schwartz in sod. (2008) vsebnosti kampesterola 117 mg/100 g. Prav tako smo primerljivo določili tudi vsebnost stigmasterola v ričkovem olju in sicer smo določili povprečno vrednost 3,9 mg/100 g, medtem ko so Schwartz in sod. (2008) določili 5,6 mg/100 g vsebnost kampesterola. Povprečna koncentracija β -sitosterola je bila v naši raziskavi določena 447,0 mg/100 g, medtem ko so Schwartz in sod. (2008) določili vsebnost istega sterola v malo nižji koncentraciji in sicer 300 mg/100 g, vendar še vedno primerljivo.

4 ZAKLJUČEK

Rezultati raziskave kažejo, da je mogoče opisano metodo (kombinacija ekstrakcije na trdnem nosilcu in plinske kromatografije) primerno validirati. Poleg tega smo ugotovili tudi, da lahko to metodo uporabljamo za določitev vsebnosti sterolov v ričkovem olju, kjer dobimo primerljive rezultate z drugimi že objavljenimi študijami.

5 VIRI IN LITERATURA

- Abidi S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in food and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 2001; 935(1–2): 173–201.
- Al-Ismail K.M., Alsaed A.K., Ahmad R., Al-Dabbas M. Detection of olive oil adulteration with some plant oils by GLC analysis of sterols using polar column. *Food Chemistry*. 2010; 121: 1255–1259.
- Bavec M. Ekološko kmetijstvo. *Kmečki glas*. 2001; 210–213.
- Cañabate-Díaz B., Carretero S, Fernández-Gutiérrez A., Belmonte Vega A., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L., Duran Martos J. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 2007; 102: 593–598.
- García-Llatas G., Rodríguez-Estrada M.T. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem Phys Lipids*. 2011. 164: 607–624.
- Hrastar R. Karakterizacija, deodorizacija in ugotavljanje pristnosti ričkovega olja (*Camelina sativa* (L.) *crantz*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 2011: 78 str.
- Lagarda M. J., García-Llatas, Farré R. Analysis o phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006; (41) 5: 1486–1496.
- Moghadasian M. H., Frolich J. J. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence. *American Journal of Medicine*. 1999; (107)6: 588–594.
- Povše R. Določanje sterolne sestave olja navadnega rička (*Camelina sativa* (L.) *Crantz*). Magisterska naloga, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. 2012. 85 s.
- Rode J. Study of autochthon *Camelina sativa* (L.) *Crantz* in Slovenia. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2002; (9)4: 313–318.
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.-M. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; (21)2: 152–161.
- Toivo J., Phillips K., Lampi A.M., Piironen V. Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2001; 14: 631–643.
- Zubr J., Matthäus B. Effects of growth conditions on fatty acids and tocopherols in *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products*. 2002; (15) 2: 155–162.