



Oxicholesterine in Milchprodukten

Christine ROSE-SALLIN, Jacques Olivier BOSSET und Robert SIEBER, Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM), CH-3097 Liebefeld-Bern
Raffaele TABACCHI, Institut du chimie, Université, CH-2000 Neuchâtel

Cholesterin ist ein natürlicher Bestandteil fetthaltiger tierischer Lebensmittel. Es kann durch Licht oder/und Luft wie auch bei hohen Temperaturen oxidiert werden. Die so gebildeten Oxicholesterine sind in Lebensmitteln unerwünscht, da sie für die menschliche Gesundheit schädliche Eigenschaften aufweisen. Mit einer neuentwickelten Methode, bei der die Bestimmung der Oxicholesterine mit Hilfe einer GC-MS-Analyse erfolgt, wurden verschiedene Milchprodukte analysiert. Unter normalen Bedingungen der Herstellung, der Lagerung und der Erhitzung werden keine Oxicholesterine gebildet.

In der gesamten Diskussion um die Lipidhypothese darf nicht ausser acht gelassen werden, dass das Cholesterin eine für den menschlichen wie auch tierischen Organismus unentbehrliche Substanz darstellt. Dank seiner Anwesenheit verleiht es den Membranen Stabilität, Fliesseigenschaften und Funktion. Zudem dient das Cholesterin in der Leber als Vorstufe in der Biosynthese von Gallensäuren, Steroidhormonen der Nebennierenrinde, männlichen und weiblichen Sexualhormonen. Der menschliche Organismus enthält ungefähr 90 bis 150 g Cholesterin und synthetisiert selber täglich zwischen 700 und 1500 mg Cholesterin. Als Bestandteil tierischer Lebensmittel wird das Cholesterin auch über die Nahrung aufgenommen (Gurr 1992).

Das Cholesterin ist jedoch nicht stabil. Es kann auf enzymatischem Wege, durch Autoxidation oder auch durch Einwirkung von Hitze, Licht und Bestrahlung oxidiert werden (Rose-Sallin *et al.* 1996b). Bis heute sind mehr als 60 Oxidationsprodukte des Cholesterins* im Blutplasma, in Extrakten von tierischem Gewebe und Lebensmitteln wie auch in Modellsystemen nachgewiesen worden (Smith 1981). Vermehrte Aufmerksamkeit von seiten der Medizin, Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaft haben sie erhalten, als ihnen verschiedene biologische Wirkungen zugesprochen wurden. So erzeugte die Verfütterung einer fünf Jahre alten Cholesterinprobe an Kaninchen schwere Schädigungen der Arterien, gereinigtes Cholesterin zeigte jedoch keine solche Wirkungen (Imai *et al.* 1976). Diese Unreinheiten

*auch als oxidierte Cholesterine oder wie im Text als Oxicholesterine bezeichnet.

enthielten als Verbindungen 25-Hydroxicholesterin, Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, 5,6-Epoxicholesterin, 7-Ketocholesterin sowie 7 α - und 7 β -Hydroxicholesterin (Taylor *et al.* 1979). Neben der Atherosklerose-fördernden Wirkung beeinflussten diese Substanzen auch den Cholesterinstoffwechsel und die Zellmembranen. Zudem zeigten sie zelltoxische und Mutationen-auslösende Wirkungen (Smith und Johnson 1989; Guardiola *et al.* 1996).

Empfindliche Analysenmethode notwendig

Die biologisch unerwünschten Wirkungen der Oxicholesterine haben in den letzten 15 Jahren dazu geführt, diese in Lebensmitteln nachzuweisen und deren Gehalt zu bestimmen. Sie wurden in verschiedenen tierischen Lebensmitteln wie Milchprodukten, Eipulver, Fleisch, Fischen und erhitzten tierischen Fetten aufgefunden. Dabei fördern gewisse Herstellungsverfahren und Lagerungsbedingungen deren Bildung (Addis und Park 1991). Da in tierischen Lebensmitteln die Oxicholesterine im Vergleich zum Cholesterin selber in kleinen Konzentrationen vorhanden sind, ist eine spezifische und empfindliche Analysenmethode unabdingbar. Es existieren bereits zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Oxicholesterine. Doch wurde eine breite Variation der gemessenen Werte für das gleiche Produkt festgestellt, was oft zu Diskussionen Anlass gab, da zudem meistens analytische Angaben wie Linearitätsbereich, Nachweisgrenze, Wiederholbarkeit, Wiederfindungsrate fehlten (McCluskey und Devery 1993). Es zeigte sich, dass die Analyse der Oxicholesterine nicht einfach ist.

Sie erfordert deshalb mehrere Stufen der Reinigung und der Aufarbeitung, während denen es möglich ist, dass diese Verbindungen umgewandelt werden, oder dass sie durch eine zufällige Oxidation des Cholesterins entstehen können. Die aufgetrennten Verbindungen müssen deshalb mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt und, wenn möglich, mit Hilfe von markiertem Cholesterin überprüft werden (siehe Kasten: Bestimmung der Oxicholesterine).

Kaum Oxidation von Cholesterinen

In verschiedenen Studien wurden Oxicholesterine in tierischen Lebensmitteln, unter anderem in Milch und Milchprodukten, aber auch in mit tierischem Fett hergestellten pflanzlichen Lebensmitteln wie Pommes frites bestimmt (Addis und Park 1991). Mit der neu entwickelten GC-MS-Methode* haben wir verschiedene Milchprodukte auf Oxicholesterine untersucht. Dabei wurde vor allem dem Einfluss der Herstel-

*GC-MS: Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie

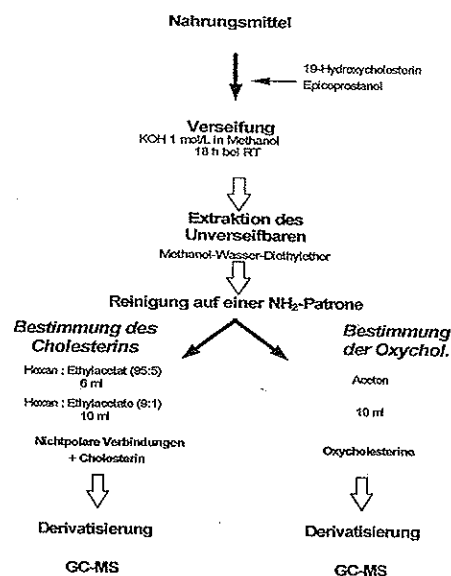


Abb. 1. Schema des Reinigungsverfahren zur Bestimmung von Cholesterin und Oxicholesterinen (19-Hydroxycholesterin und Epicoprostanol sind interne Standards).

Bestimmung der Oxicholesterine

Als Techniken zur Bestimmung der Oxicholesterine sind die Dünnschicht(DC)-, die Hochdruck-Flüssigkeits(HPLC)- (Nachweis im UV-Bereich) sowie die Gas-Chromatographie(GC) mit Flammenionisation(FID) und Massenspektrometrie(MS) zu erwähnen. Die DC weist folgende Vorteile auf: einfache Durchführung und tiefe Kosten, spezifische Färbung und tiefe Nachweisgrenze (0,1 µg reiner Standard) der Oxicholesterine. Jedoch trat auf den Platten ein bräunlicher Streifen als Hintergrund wegen Glyceridrückständen auf, womit eine quantitative Analyse erschwert wurde (Rose-Sallin *et al.* 1993). Mit der «reversed phase»-HPLC mit UV-Detektion bei 204 nm und für das 7-Ketocholesterin bei 242 nm können die Oxicholesterine quantitativ aufgetrennt werden. Jedoch war die Nachweisgrenze von reinen Standardlösungen mit ca. 1 µg/ml relativ schlecht, und mit einer Matrix wie Butter beeinträchtigten zahlreiche interferierende Bestandteile und/oder Artefakte die Analyse. Zudem können nur UV-adsorbierende Verbindungen (Chromophore) nachgewiesen werden (Sallin *et al.* 1993). In einem weiteren Schritt wurde sodann die Gaschromatographie (Rose-Sallin *et al.* 1994) mit anschließender MS (Rose-Sallin *et al.* 1995) als analytische Methode evaluiert. Ihre Vorteile sind die Empfindlichkeit, die Selektivität, Wiederholbarkeit, schonender Charakter und die breite Linearität des Signals bei der Zugabe von Oxicholesterinen. Diese Methode ist jedoch relativ zeit- und arbeitsaufwendig, so sind für den Reinigungsschritt von acht bis zwölf Proben 36 Stunden erforderlich, dazu kommt noch die eigentliche Analysenzeit. Für die Bestimmung der Oxicholesterine in Milchprodukten wurde jedoch die GC-MS bevorzugt (Rose-Sallin *et al.* 1994, 1995).

Beschreibung der GC-MS-Methode

In tierischen Lebensmitteln, die auf Oxicholesterine untersucht werden, ist das Cholesterin in bedeutenden Mengen vorhanden. Dieses kann in Gegenwart von Luft, Licht, Peroxiden in Lösungsmitteln wie auch durch eine Hitzebehandlung oxidiert werden. Auch der pH-Wert beeinflusst die Stabilität einiger Oxicholesterine. Deshalb erfordert die Analyse der Oxicholesterine ein sehr mildes Reinigungsverfahren, damit das Auftreten von Artefakten verhindert werden kann (Abb. 1). Hinzu kommt noch, dass neben dem Cholesterin meist noch Triglyzeride, Phospholipide und andere Lipide vorhanden sind, die ebenfalls die Analyse stören können. Bei der Aufarbeitung muss die Probe sehr schonend verseift werden, der unverseifbare Anteil abgetrennt und die erhaltene Lösung auf einer Aminopropyl-Säule von anderen lipidhaltigen Komponenten getrennt werden. Gleichzeitig werden dabei

die Oxicholesterine genügend angereichert. Mit der Behandlung auf der Aminopropyl-Säule kann das Cholesterin quantitativ abgetrennt werden, womit es ohne zusätzliche Reinigungsstufen bestimmt werden kann.

Für die gaschromatographische Auftrennung müssen die Oxicholesterine in flüchtige und stabile Trimethylsilyletherderivate umgewandelt werden. Bei den sechs Oxicholesterinen 25-Hydroxicholesterin, 7-Ketocholesterin, 5 α ,6 α -Epoxicholesterin, Cholestantriol (unter der Form des di-Trimethylsilyletherderivates), 7 α - und 7 β -Hydroxicholesterin, die hauptsächlich in Lebensmitteln gebildet werden, konnte eine vollständige Silylierung der Hydroxylgruppen erreicht werden. Die GC-MS-Analyse erfolgte im «selected ion monitoring»(SIM)-Modus. Dadurch können die entsprechenden Massen bestimmt und die Nachweisgrenze der Oxicholesterine in einer Standardlösung auf 0,1 bis 0,3 ng/ml gesenkt werden.

Bei der Bestimmung der Oxicholesterine ist das Auftreten von Artefakten nicht auszuschließen. Mit Hilfe eines bekannten Zusatzes von mit Deuterium markiertem Cholesterin (heptadeuteriert) wurde deshalb die Bildung von Artefakten bei jedem Analysenschritt überprüft. Dabei wurde eine Artefaktbildung von Oxicholesterinen beobachtet (Rose-Sallin *et al.* 1995). In der Folge konnte durch gewisse Vorsichtsmaßnahmen während den verschiedenen Analysenstufen (Eisbad, Lichtschutz, schnelle Ausführung der Analyse) wie auch durch eine grössere Erfahrung in der Ausführung der Methode diese Artefaktbildung vermieden werden.

Validierung der GC-MS-Methode

Die Validierung ist ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung einer neuen Methode. Darauf haben McCluskey und Devery (1993) für die chromatographische Bestimmung der Oxicholesterine in getrockneten Lebensmitteln hingewiesen. Bei den Kriterien, die dabei zu berücksichtigen sind, handelt es sich um die Spezifität, die Repeitierbarkeit und Reproduzierbarkeit, die Genauigkeit, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, die Linearität des Signals nach der Zugabe von Oxicholesterinen sowie die Wiederfindungsrate.

Die GC-MS-Methode wurde zuerst für Milchpulver (Rose-Sallin *et al.* 1995) und dann auch für andere Lebensmittel wie Eigelb, Schweineschmalz, Käse und Bratbutter validiert (Rose-Sallin *et al.* 1996a). Es konnte eine gute Wiederholbarkeit (Variationskoeffizienten von 1 bis 6 %) sowie Wiederfindungsraten von 79 bis 113 % in Käsen und Schweineschmalz sowie von 60 bis 88 % in Eipulver ermittelt werden. Als Beispiele werden in Tabelle 1 der Linearitätsbereich, die Bestimmungskoeffizienten und die Wiederfindungsrate für die sechs häufigsten Oxicholesterine in Käsen vorgestellt.

Tab. 1. Linearitätsbereich, Bestimmungskoeffizient und Wiederfindungsrate von Oxicholesterinen in verschiedenen Käsen, berechnet mit Hilfe der linearen Regression auf der Basis von bekannten Zusätzen (Anzahl der Bestimmungen = 6) (Rose-Sallin *et al.* 1996a)

| Oxicholesterin | Linearitätsbereich mg/kg | Schmelzkäse | | Parmesan | | Raclettekäse | |
|--|-----------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| | | R ² | Wiederfindungsrate % | R ² | Wiederfindungsrate % | R ² | Wiederfindungsrate % |
| 7 α -Hydroxicholesterin | 0,0-5,3 | 0,9987 | 101 | 0,9983 | 102 | 0,9983 | 104 |
| 7 β -Hydroxicholesterin | 0,0-4,9 | 0,9993 | 104 | 0,9983 | 100 | 0,9993 | 103 |
| 5 α ,6 α -Epoxicholesterin | 0,0-5,4 | 0,9997 | 97 | 0,9993 | 109 | 0,9993 | 103 |
| 3 β ,5 α ,6 β -Cholestantriol | 0,0-2,2 | 0,9875 | 88 | 0,9946 | 83 | 0,9952 | 79 |
| 25-Hydroxicholesterin | 0,0-2,3 | 0,9996 | 103 | 0,9992 | 105 | 0,9997 | 104 |
| 7-Ketocholesterin | 0,0-7,3 | 0,9994 | 99 | 0,9991 | 95 | 0,9994 | 100 |

R² = Bestimmungskoeffizient

lungsschritte, den Bedingungen während der Lagerung und Erhitzung Beachtung geschenkt. Unter diesen Produkten wurden jene ausgewählt, die während der Herstellung, Lagerung und bei der küchentechnischen Zubereitung am ehesten einer Oxidation ausgesetzt sind wie Milchpulver, Kindernährmittel, Käse (geschmolzen, gerieben, Raclette) und Bratbutter (Rose-Sallin *et al.* 1996c).

Bei frischen Milchprodukten und bei sol-

chen, die unter «schonenden» Bedingungen (niedrige Temperatur, Abwesenheit von Sauerstoff und Licht) hergestellt wurden, zeigte sich praktisch keine Oxidation des Cholesterins. In Milchpulver und Kindernährmittel, die unter einer reaktions-trägen Atmosphäre aufbewahrt wurden, konnten keine oder nur geringe Mengen an Oxicholesterinen festgestellt werden. Die Herstellungsschritte bei der Schmelzkäsefabrikation erzeugten ebenfalls keine

Oxicholesterine. Auch die Erhitzung in einem Infrarotofen (Raclette) stellte kein besonderes Risiko dar.

Dagegen bildete sich bei der Erhitzung von Bratbutter während 30 Minuten auf Temperaturen von 205 bis 210 °C eine gewisse Menge an diesen Verbindungen (Tab. 2). Ebenso bewirkte eine verlängerte Lagerung von Käsen eine starke Oxidation: die Käse waren in einer durchsichtigen und sauerstoffdurchlässigen Folie



Tab. 2. Gehalt an Oxicholesterinen in Käse und Bratbutter nach verschiedenen Bedingungen der Lagerung und der Erhitzung (Rose-Sallin *et al.* 1996c)

| Oxicholesterin mg/kg Probe | Halbhartkäse | | Schmelzkäse in Tranchen | | Bratbutter | |
|--|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | 2 Monate 6 °C im Dunkeln | 2 Monate 6 °C im Licht | 2 Monate 6 °C im Dunkeln | 2 Monate 6 °C im Licht | 2 1/2 Jahre bei -24 °C | 30 Min. bei 210 °C |
| | 7 α -Hydroxicholesterin | 0,11 | 0,36 | <0,10 | 22,95 | <0,20 |
| 7 β -Hydroxicholesterin | 0,17 | 0,47 | <0,10 | 23,14 | <0,20 | 6,49 |
| 5 α ,6 α -Epoicholesterin | n.n. | <0,10 | n.n. | 3,15 | n.n. | 2,81 |
| 3 β ,5 α ,6 β -Cholestantriol | n.n. | n.n. | n.n. | 0,24 | <0,20 | n.n. |
| 25-Hydroxicholesterin | n.n. | <0,10 | n.n. | 1,50 | <0,20 | 0,36 |
| 7-Ketocholesterin | 0,29 | 1,12 | 0,11 | 27,30 | 0,28 | 5,68 |

n.n. = nicht nachweisbar; Nachweisgrenze: 0,10 mg/kg Käse und 0,20 mg/kg Butter
Die Bestimmung der Oxicholesterine wurde doppelt ausgeführt (n=2); Mittelwerte sind angegeben

verpackt und standen unter einer längeren Einwirkung von weiskaltem Licht. Auch Milchpulver, das in Anwesenheit von Sauerstoff (bei Luft oder unter einer mit Sauerstoff angereicherten Atmosphäre) gelagert wurde, war eine wichtige Quelle an Oxicholesterinen. Dies traf insbesondere dann zu, wenn eine niedrige Wasseraktivität ($a_w < 0,22$) vorlag.

In diesen Untersuchungen wurden bewusst Testbedingungen ausgewählt, die eine beschleunigte Wirkung zur Folge hatten, womit sich das «maximale» Risiko einer Bildung von Oxicholesterinen besser ermitteln lässt. Die dabei erreichten maximalen Gehalte stellen eine Oxidation von 10 bis 15 % des gesamten Cholesterins dar. Dabei wurden vor allem 7-Ketocholesterin, 7 α - und 7 β -Hydroxicholesterin gebildet, was nach den Theorien über die Mechanismen der Oxidation von Cholesterin zu erwarten war (Rose-Sallin *et al.* 1996b). Insgesamt zeigten unsere Untersuchungen mit Hilfe von «beschleunigten Tests», dass einzig bei Bedingungen, bei denen Faktoren wie «Sauerstoff und Licht» oder «Sauerstoff und niedrige Wasseraktivität» zusammentreffen oder bei denen über längere Zeit eine hohe thermische Behandlung erfolgt, eine signifikante Bildung von Oxicholesterinen festgestellt werden konnte (Rose-Sallin *et al.* 1996c).

Bedeutung für die menschliche Ernährung

Es ist anzunehmen, dass der Mensch Oxicholesterine aus seiner Nahrung absorbiert: Untersuchungen von Emanuel *et al.* (1991) zeigen einen Anstieg an Oxicholesterinen im Plasma nach einer Mahlzeit mit oxicholesterinhaltigem Eipulver. Auch wurden im menschlichen Blut schon verschiedene Oxicholesterine nachgewiesen, was auf eine Absorption aus der Nahrung hinweisen würde (Sevanian *et al.* 1994). Dies könnte jedoch auch damit erklärt werden, dass die Oxicholesterine direkt im mensch-

lichen Organismus gebildet werden. Nach der Oxidationshypothese, die neuerdings zur Erklärung der Entstehung der Atherosklerose diskutiert wird, werden die Lipoproteine geringer Dichte (LDL) oxidativ verändert und als solche von den Makrophagen aufgenommen. Dies führt zur Bildung von lipidhaltigen Schaumzellen, die Bestandteile der Plaques sind. Diese Oxidation hängt von einer durch freie Radikale verursachten Lipidperoxidation ab (Frei 1995). Dass in diesen Lipoproteinen auch Oxicholesterine vorhanden sein können, zeigten *in vitro*-Versuche, in denen die Anwesenheit von Kupfer oder der Lipoxygenase die Bildung von Oxicholesterinen in den Lipoproteinen geringer Dichte förderte (Dzeletovic *et al.* 1995). Zudem beeinträchtigen Lipoproteine geringer Dichte, die Oxicholesterine enthalten, die normale Schutzfunktion der innersten Zellschicht der Blutgefäße (Boissonneault *et al.* 1991).

Versuche an Tieren, denen Oxicholesterine im Futter verabreicht wurden, zeigten widersprüchliche Resultate in bezug auf eine Absorption. Ratten und Affen sind offensichtlich in der Lage, Oxicholesterine zu absorbieren (Peng *et al.* 1982; Fornas *et al.* 1984; Bascoul *et al.* 1986; Emanuel *et al.* 1991; Osada *et al.* 1994). Auch wurden dabei verschiedene Parameter des Fettstoffwechsels beeinflusst (Osada *et al.* 1994). Dagegen zeigte die Verfütterung von Oxicholesterinen (5,6-Epoicholesterin, 25-Hydroxicholesterin, Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol) an Miniaturschweine keine Wirkungen auf Futterverzehr, Gewichtsentwicklung und Futterverwertung, und auch die Endotheloberfläche wurde nicht verändert (Sandner *et al.* 1990).

Folgerungen

Unsere Studien haben frühere Ergebnisse bestätigt (Cleveland und Harris 1987; Nourooz-Zadeh und Appleqvist 1988; Pie

et al. 1990, Nielsen *et al.* 1995) mit Ausnahme derjenigen von Sander *et al.* (1989), wonach in Milchprodukten das Cholesterin nur in geringem Masse oxidiert wird. Auch bei einer längeren Lagerung, die unter «schonenden» Bedingungen stattfindet, wie auch nach Erhitzungsverfahren, die allgemein in der Küche angewendet werden, wird das Cholesterin praktisch nicht oxidiert. Erst bei extremen Lagerungsbedingungen, bei denen die Faktoren «Sauerstoff und Licht» oder «Sauerstoff und niedrige Wasseraktivität» zusammentreffen, ist mit dem Auftreten von grösseren Mengen zu rechnen, wie dies auch Nielsen *et al.* (1995) an unter Licht gelagertem, geriebenem Käse zeigten. Diese, für die milchverarbeitende Industrie vorteilhafte Feststellung darf jedoch auf keinen Fall als Freipass für unsorgfältige Verarbeitung und Lagerung angesehen werden. Vielmehr muss jeder Produzent bestrebt sein, den Gehalt an Oxicholesterinen in Milchprodukten so niedrig als möglich zu halten. Darüberhinaus ist auch eine einwandfreie Qualität der Ausgangsprodukte eine wichtige Voraussetzung, um den Verzehr von Oxicholesterinen zu vermeiden. Dazu tragen auch Massnahmen bei, die im allgemeinen zur Verhütung einer Lipidoxidation getroffen werden wie die Verwendung von sauerstoffundurchlässigen Verpackungen. Die relativ geringen Gehalte in frischen Milchprodukten wie auch nach der Verarbeitung stellen für die Gesundheit des erwachsenen Verbrauchers, der sich vielseitig ernährt, kein spezielles Risiko dar. Diese Folgerung kann jedoch nicht für alle Verbrauchergruppen gültig sein. Es ist hier vor allem an Kleinkinder, im besonderen an die Neugeborenen, zu denken, die eine weniger vielseitige Ernährung aufweisen. Zudem haben sie im Vergleich zur Nahrungsaufnahme ein geringeres Körpergewicht, und ihr Wachstum ist erhöht.

Folgende Faktoren können angeführt werden, weshalb Milchprodukte wenig Oxicholesterine enthalten (Addis und Park

1991): Bedeutend ist die geringe Konzentration an Übergangsmetallen wie Eisen, Kupfer und Kobalt in der Milch. Zudem weist die Milch mit ungefähr 3 mg Cholesterin/g Fett einen bescheidenen Cholesteringehalt auf. Der hohe Anteil an gesättigten Fettsäuren kann in dieser Hinsicht als Vorteil angesehen werden, im Vergleich zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die einer Oxidation leichter zugänglich sind. Eine Lagerung in geeigneten Verpackungsmaterialien und bei tiefen Temperaturen ist ebenfalls vorteilhaft. Auch bietet die Struktur der Fettkügelchen einen weiteren Schutz gegenüber einer Oxidation an.

LITERATUR

- Addis P.B., Park S.W. 1991. Cholesterol oxides content in foods, in Peng S.-K., Morin, R.J. ed. Biological effects of cholesterol oxides. Boca Raton, Ann Arbor, London, CRC Press 71-88.
- Bascoul J., Domergue N., Mourot J., Debry G., Crastes de Paulet A. 1986. Intestinal absorption and fecal excretion of 5, 6 α -epoxy-5 α -cholesta-3 β -ol by the male Wistar rat. *Lipids* 21, 744-747.
- Boissonneault G.A., Hennig B., Wang Y., Ouyang C.M., Krahulik K., Cunnup L., Oeltgen P.R. 1991. Effect of oxysterol-enriched low-density lipoprotein and endothelial barrier function in culture. Low-density lipoproteins. *Ann. Nutr. Metab.* 35, 226-232.
- Cleveland M.Z., Harris N.D. 1987. Oxidation of cholesterol in commercially processed cow's milk. *J. Food Protect.* 50, 867-871.
- Dzeletovic S., Babiker A., Lund E., Diezfasusy U. 1995. Time course of oxysterol formation during *in vitro* oxidation of low density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids* 78, 119-128.
- Emanuel H.A., Hassel C.A., Addis P.B., Bergmann S.D., Zavoral J.H. 1991. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.* 56, 843-847.
- Fornas E.C.D., Martinez-Sales V.C.D., Camanas A.M.D., Bagnuena J.M.D. 1984. Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in the rat. *Arch. Pharmacol. Toxicol.* X, 175-182.
- Frei B. 1995. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 83-98.
- Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Rafecas M., Boatella J. 1996. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.* 34, 193-211.
- Gurr M.I. 1992. Role of fats in food and nutrition, second edition. Elsevier Applied Science Publisher, London.
- Imai H., Werthessen N.T., Taylor B., Lee K.T. 1976. Angiotoxicity and arteriosclerosis due to contaminants of USP-grade cholesterol. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 100, 565-571.
- McCluskey S., Devery R. 1993. Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 175-178.
- Nielsen J.H., Olsen C.E., Duedahl C., Skibsted L.H. 1995. Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Dairy Res.* 62, 101-113.
- Nourooz-Zadeh J., Appleqvist L.-A. 1988. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: butter and cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1635-1641.
- Osada K., Kodama T., Cui L., Ito Y., Sugano M. 1994. Effects of dietary oxidized cholesterol on lipid metabolism in differently aged rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1062-1069.
- Peng S.-K., Taylor B.C., Mosbach E.H., Huang W.Y., Hill J., Mikkelsen B. 1982. Distribution of 25-hydroxycholesterol in plasma lipoproteins and its role in atherogenesis. A study in squirrel monkeys. *Atherosclerosis* 41, 395-402.
- Pie J.E., Spahis K., Seillan C. 1990. Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* 38, 973-979.
- Rose-Sallin C., Huggett A.C., Bosset J.O., Tabacchi R., Fay L. B. 1995. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [3 H]-cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J. Agric. Food Chem.* 43, 935-941.
- Rose-Sallin C., Sieber R., Bosset J.O., Tabacchi R. 1993. Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. II. Possibilités et limites des techniques TLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* 84, 566-580.
- Rose-Sallin C., Sieber R., Bosset J.O., 1994. Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. III. Possibilités et limites des techniques GC-FID. Rapport interne FAM Info no 290W.
- Rose-Sallin C., Sieber R., Bosset J.O., Tabacchi R. 1996a. Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires. *Trav. chim. aliment. hyg.* 87, 137-154.
- Rose-Sallin C., Sieber R., Bosset J.O., Tabacchi R. 1996b. Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse. *OCL - Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 3, 140-148.
- Rose-Sallin C., Sieber R., Bosset J.O., Tabacchi R. 1996c. Effets d'un stockage ou d'un traitement thermique sur la formation des «oxystérols» dans les produits laitiers. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* im Druck.
- Sallin C., Baumann E., Bitikofer U., Sieber R., Bosset J.O. 1993. Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* 84, 141-157.
- Sander B.D., Addis P.B., Park S.W., Smith D.E. 1989. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J. Food Protect.* 52, 109-114.
- Sandner N., Dahme E., Liebich H.-G., Giesecke D. 1990. Oxycholesterine in der Nahrung und Arterio-
- sklerose: Ein Modellversuch am Schwein. *Adv. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 20, 60-73.
- Sevanian A., Seraglia R., Traldi P., Rossato P., Ursini F., Hodis H. 1994. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Rad. Biol. Med.* 17, 397-409.
- Smith L.L. 1981. Cholesterol autoxidation. New York, Plenum Press.
- Smith L.L., Johnson B.H. 1989. Biological activities of oxysterols. *Free Rad. Biol. Med.* 7, 285-332.
- Taylor B., Peng S.K., Werthessen N.T., Tham P., Lee K.T. 1979. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 40-57.

RÉSUMÉ

Produits d'oxydation du cholestérol dans des produits laitiers

Le cholestérol est un constituant naturel des denrées alimentaires animales riches en graisses. Il peut être oxydé par la lumière ou par l'air, surtout à haute température. Les oxystérols ainsi formés dans les denrées alimentaires sont indésirables, car ils peuvent présenter certains dangers pour la santé du consommateur. Divers produits laitiers ont été analysés à l'aide d'une nouvelle méthode de dosage des oxystérols par GC-MS. Dans des conditions «normales» de fabrication, de stockage et de chauffage, aucun des composés étudiés n'a été produit. Seules des conditions de stockage extrêmes, où les facteurs «oxygène et lumière» ou «oxygène et faible activité en eau» étaient concomitants ont pu générer des quantités non négligeables d'oxystérols (tests accélérés).

SUMMARY

Cholesterol oxides in dairy products

Cholesterol is a natural compound of animal foods. It can be oxidised by light or/and air, especially at high temperature. The cholesterol oxides formed are unwanted in foods because they are injurious for human health. Several dairy products were investigated for cholesterol oxides by using a new GC-MS analysis. No cholesterol oxides are formed under correct conditions of processing, storage and heating. An important amount of cholesterol oxides were only generated in dairy products exposed to harsh conditions of storage where the factors «oxygen and light» or «oxygen and low water activity» were concomitant (accelerated tests).

KEY WORDS: oxidized cholesterol, oxysterol, dairy products