

Augustyn Jakubowski, Maria Braczko
Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego w Warszawie

Wydzielanie fitosteroli z oleju talowego lub paku oleju talowego

Separation of fitosterols from tall oil or tall oil pitch

Słowa kluczowe: sterole, olej talowy, pak talowy, środek antyhypercholesterolemiczny, sitosterol, sitostanol

Key words: sterols, tall oil, tall oil pitch, antyhypercholesterolemic agent, sitosterol, sitostanol

Przedstawiono literaturę patentową oraz wyniki własne prac laboratoryjnych nad wydzieleniem steroli z oleju i paku talowego. Do ekstrakcji substancji niezmydlających się stosowano octan etylu i dwuchloroetan, ich rozdział prowadzono w układzie węglowódór-metanol.

The patent literature was studied and the laboratory studies were made to separate the sterols from tall oil and tall oil pitch. To extract the unsaponifiables dichloroethane and ethylacetate were used and for their separation the mixture of heksan and methanol was used.

Wstęp

Zanim przystąpimy do opisu wykonanych badań i omówienia wniosków z nich płynących, należy poświęcić trochę czasu na bardziej ogólne spojrzenie na problematykę, której fragmentem są niżej opisane badania.

Sprawa pierwsza to poziom zachorowalności i umieralności na niedokrwinną chorobę serca (NChS). Celem tego opracowania nie jest szczegółowa analiza tego zagadnienia, lecz wobec znanego powszechnie faktu, iż przedwczesne zgony z powodu tej choroby stanowią około połowy ogólnej ilości zgonów w Polsce, jest całkowicie uzasadnione, aby pracować nad obniżeniem tego wskaźnika.

Wyżej wspomniany fakt nie w całości wyczerpuje negatywy NChS. Trzeba tu dodać wyłączenie ogromnej rzeszy 40-, 50-, 60-latków z aktywności zawodowej po przebytych zawałach mięśnia sercowego.

Poszukiwania sposobów radykalnego zapobiegania NChS trwają już szereg lat. Stwierdzono niewątpliwie, iż najpoważniejszą rolę odgrywa tu prawidłowa dieta tłuszczowa z możliwym ograniczeniem spożycia nasyconych kwasów tłuszczowych (Polski Konsensus Tłuszczowy 1999), a także wysokie spożycie kwasów jedno- i wielonienasyconych, spożycie naturalnych przeciwutleniaczy itd. Nie wszędzie jednak, i nie w pełnym zakresie, zasady te są przestrzegane.

Już w latach 50-tych stwierdzono, iż czynnikiem obniżającym poziom cholesterolu we krwi mogą być fitosterole. W późniejszych latach zauważono, że podobne, lub nawet intensywniejsze, działanie mają ich pochodne nasycone — stanole, a swą cechą antycholesterolową zachowują również estry steroli i stanoli.

Intensywny rozwój tych badań przypada na lata dziewięćdziesiąte, a w znacznej mierze na ich koniec, tzn. w okresie realizacji niniejszej pracy. Ostatnie parę lat pozwoliło przekonać się jak wielkim frontem światowe firmy przystąpiły do eksploatacji omawianego odkrycia. Odkrycie to wskazało na fakt, że sterole (i stanole) działają głównie przez blokowanie absorpcji cholesterolu LDL z przewodu pokarmowego, tak pochodzącego z syntezy w wątrobie, jak i dostarczanego z pożywieniem.

Skuteczna dawka steroli w zapobieganiu NChS oceniana jest na 2–3 g na dobę, chociaż są sygnały, że przy podawaniu ich w odpowiedniej kompozycji dawka ta może być znacznie niższa. Od roku 1995 w Finlandii jest w handlu margaryna o odpowiedniej zawartości steroli (około 9%), której codzienne spożycie w ilości około 25 g obniża poziom cholesterolu LDL o około 15%, jednocześnie praktycznie nie wpływając na cholesterol HDL.

Światowe firmy planują produkcję fitosteroli (głównie z produktu ubocznego przemysłu papierniczego – oleju talowego lub produktu jego przerobu – paku podestylacyjnego) na poziomie tysięcy ton rocznie, a inwestycje związane z uruchomieniem tej produkcji sięgają kilkudziesięciu milionów dolarów.

W tej sytuacji nasz ewentualny udział w tym (jakże wielkim) przedsięwzięciu winien być szczegółowo rozważony i rozsądnie zaplanowany

Jednocześnie trwają szeroko zakrojone prace nad znalezieniem nośników spożywczych steroli tak, ażeby ich zażywanie nie kojarzyło się z pigułką, a normalną, codzienną żywnością.

Spoglądając na całokształt omawianego zagadnienia trzeba stwierdzić, iż ma ono pierwszorzędne znaczenie dla walki z najgroźniejszą chorobą NChS, lecz dla osiągnięcia znaczącego efektu w badaniach i produkcji steroli, musiałyby być zaangażowane bardzo poważne środki i siły, aby uzyskać oryginalny i ekonomicznie interesujący skutek działania.

Zagadnienie w świetle literatury i praktyki przemysłowej

Sterole, ich budowa i występowanie

Sterole są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślinnym. Zaliczane są one do lipidów, w szczególności do ich frakcji niezmydlającej się. W tabeli 1 pokazano ich zawartość w popularnych olejach roślinnych.

Tabela 1

Zawartość steroli w olejach roślinnych — *The contents of sterols in the vegetable oils**

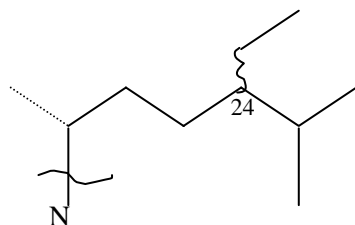
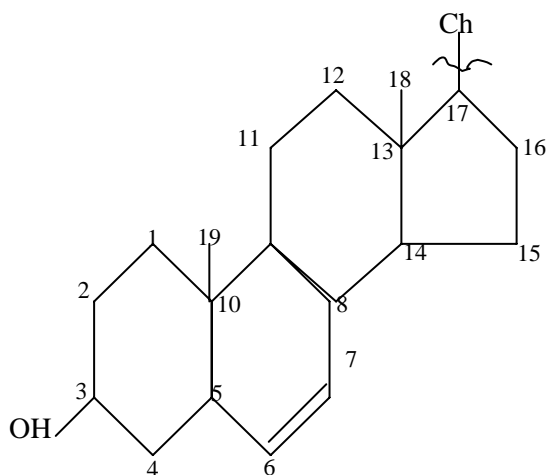
Nazwa sterolu <i>Sterol</i>	Olej rzepakowy <i>Rapeseed oil</i>	Olej sojowy <i>Soybean oil</i>	Olej słonecznikowy <i>Sunflower oil</i>	Olej palmowy <i>Palm oil</i>	Olej talowy (z sosny) <i>Tall oil (from pine)</i>
SN, % **	0,7–1,8	0,5–1,6	0,5–1,5	0,3–0,8	12–18
Sterole, mg/100 g	540–880	250–418	325–515	60–120	2500–3500
Skład steroli, % całkowitej zawartości — <i>The contents of sterols, % total contents</i>					
Cholesterol	< 4	< 1	< 0,4	1–2	< 0,2
Brassicasterol	17–13	0	0	0	—
Campesterol	28–40	19–23	8–11	9–10	8,4
Stigmasterol	< 1	17–19	7–10	12–16	—
β -sitosterol	45–61	47–59	58–64	65–73	84,0
Δ 5 avenasterol	—	2–4	2–7	4–7	—
Δ 7 sigmasterol	1–3	1–3	9–14	< 0,2	—
Δ 7 avenasterol		1–2	4–6	< 0,2	—
Ergosterol	0	< 3	0	0	—
Isofucosterol	0	0	0,4–1	0	—
Fucosterol	0	0	2–3	0	—

* — wg Karleskind (1992)

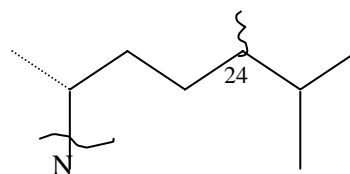
** — SN — substancje niezmydlające się — *unsaponifiables*

Z liczb zawartych w tabeli 1 widać, iż ilościowo najważniejszym sterolem jest β -sitosterol, który w ogólnej masie steroli stanowi (w różnych olejach) od blisko 50 do ponad 60%. Na dalszych miejscach znajdują się stigmasterol, campesterol, a w oleju rzepakowym brassicasterol.

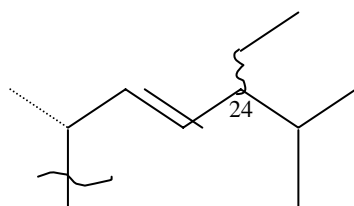
Wymienione wyżej sterole różnią się od siebie subtelnymi elementami budowy. Sitosterol posiada jedno wiązanie podwójne w pozycji 5 (drugi pierścień) i grupę etylową w pozycji 24. Stigmasterol natomiast posiada drugie wiązanie podwójne w łańcuchu bocznym w pozycji 22–23. Brassicasterol ma także wiązanie podwójne w pozycji 22–23, jednak w pozycji 24 wykazuje grupę metylową, a nie etylową, w konfiguracji S. Campesterol natomiast nie posiada wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym, grupę metylową ma również przy 24 węglu, lecz w konfiguracji R.



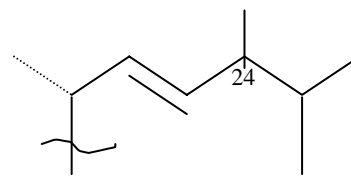
Sitosterol (24R)



Campesterol (24R)

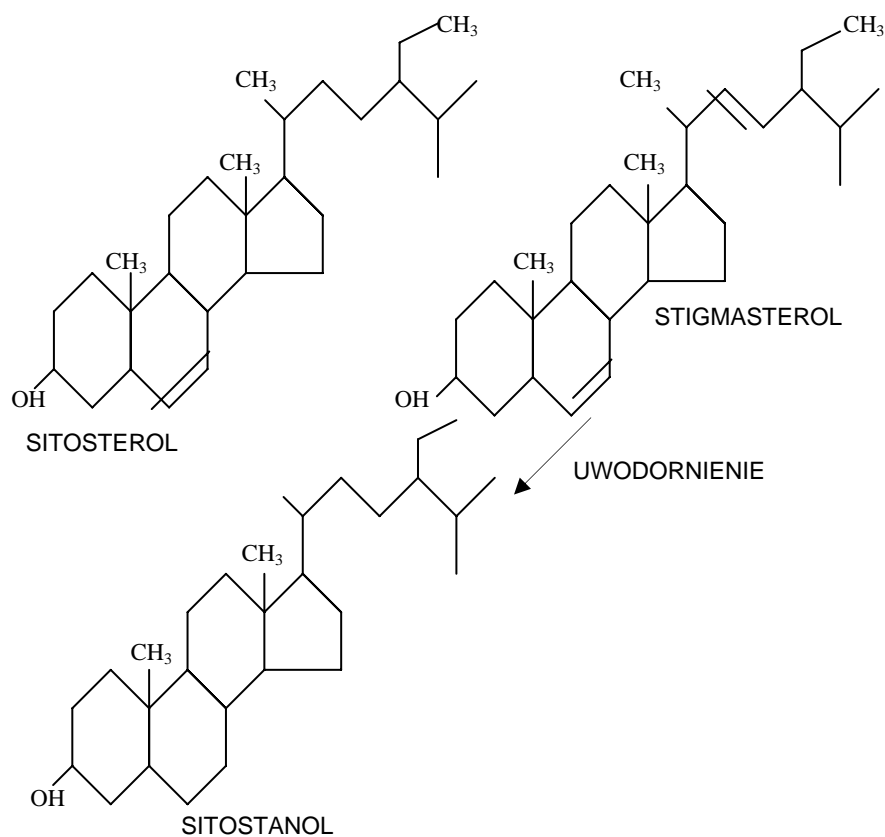


Stigmasterol

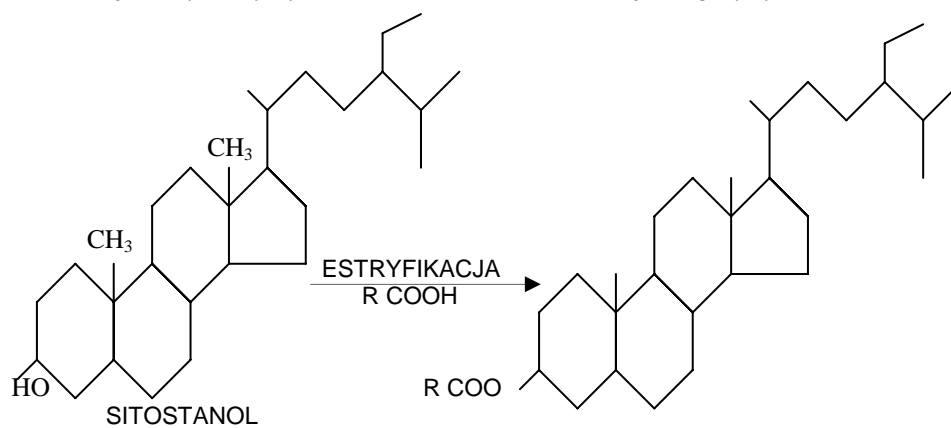


Brassicasterol (24S)

Według większości opinii, wyższą aktywność antycholesterolemiczną wykazują stanole, tzn. sterole uwodornione, nie zawierające wiązań podwójnych. I tak, po uwodornieniu sitosterol przechodzi w sitostanol. Również stigmasterol przechodzi (po wysyceniu wiązania podwójnego w pierścieniu drugim i w łańcuchu bocznym) w sitostanol, natomiast campesterol — w campestanol. Niemniej, należy powiedzieć, iż pojawiły się publikacje sugerujące, że fitosterole mogą mieć podobną aktywność antycholesterolową jak fitostanole.



Sitostanol jest źle rozpuszczalny w tłuszczach. Aby poprawić tę cechę związek ten estryfikuje się kwasami tłuszczowymi, np. oleju rzepakowego, dopiero ta forma jest wykorzystywana w osnowie tłuszczowej margaryny.



Źródło pozyskiwania steroli — olej talowy i pak oleju talowego

Interesujące nas fitosterole (głównie β -sitosterol) należą do związków lipidowych szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie. Jak to już wyżej powiedziano, towarzyszą one innym lipidom, a więc występują (na ogół w niewielkich ilościach) praktycznie we wszystkich tłuszczach znajdujących w roślinach. Ich udział w lipidach roślinnych jest z reguły niewielki, najczęściej stanowi ułamek procenta, a występują one w tłuszczach naturalnych w części w postaci wolnej, w części zestryfikowane kwasami tłuszczowymi.

Nieco wyższą zawartość steroli znaleźć można w niektórych produktach ubocznych przetwórstwa tłuszczów roślinnych. Takimi produktami są odpady z odwaniania tłuszczów roślinnych.

Najobfitszym źródłem fitosteroli jest obecnie olej talowy i niektóre produkty jego przerobu, a w szczególności pak powstający po destylacji.

Olej talowy, którego nazwa pochodzi od fińskiego „tallolie” co oznacza „olej sosnowy”, jest produktem ubocznym przy wytwarzaniu celulozy metodą sulfatową. Zrębki drewna, głównie sosnowego, są poddawane na gorąco maceracji roztworem ługu sodowego i siarczanu sodu. W procesie tym zostają odszczepione liczne związki chemiczne uprzednio powiązane z masą celulozową, m.in. kwasy tłuszczowe (KT), kwasy żywiczne (KŻ), sterole i wiele innych, nie do końca zidentyfikowanych. Substancje te są rozpuszczone lub zawieszane w cieczy użytej do maceracji, przy czym związki o charakterze KT i KŻ są już przeprowadzone w mydła. Płyn ten, zwany „black liquor”, jest oddzielany i poddawany kilkustopniowemu zagęszczeniu. Najczęściej między drugim a trzecim stopniem zagęszczenia do tego płynu dodawany jest kwas siarkowy, który rozkłada mydła i przy ogrzewaniu ułatwia wypłynięcie oleistej frakcji na powierzchnię. Oleista frakcja to właśnie olej talowy.

Produkcja oleju talowego jest dość wysoka. Duże zakłady papiernicze pozyskują rocznie do 15 tys. ton oleju talowego. Mniej więcej taki uzysk mają duże papiernie w Polsce (Świecie, Kwidzyń).

Dla przykładu podać można, iż celulozownie w USA wyprodukowały w 1997 r. około 930 tys. ton tego oleju, zaś ocena zapotrzebowania na rok 2001 mówi o 952 tys. ton i przewiduje wzrost o około 1–2% rocznie. Obecna cena oleju talowego jest bliska 140–180 \$ za tonę. Trzeba przy tym powiedzieć, iż pozyskanie fitosteroli z oleju talowego w zasadzie nie obniża wartości pozostałej, głównej masy tego oleju zawierającej KT i KŻ.

Skład tego produktu pozyskiwanego w różnych miejscach, w różnym czasie i przy stosowaniu różnych wariantów technologicznych jest wysoce zróżnicowany. Na skład oleju talowego wpływa rodzaj drewna użytego w przetwórstwie (sosna, gatunki liściaste), parametry procesu termicznej obróbki masy drzewnej, technologia pozyskiwania „black liquor” i jego destylacyjnego zagęszczenia.

Wartościowym składnikiem oleju talowego są kwasy tłuszczowe, głównie oleinowy i linolowy oraz kwasy żywiczne mające szerokie zastosowanie jako takie, bądź po poddaniu dalszej obróbce chemicznej. Kwasy tłuszczowe i żywiczne mogą być stosunkowo łatwo wydzielone z oleju talowego na drodze destylacji próżniowej. W tym procesie, oprócz destylatu składającego się głównie z kwasów tłuszczowych i kwasów żywicznych, powstaje pak. Pozostałość ta jest już znacznie mniej atrakcyjna (na dzień dzisiejszy), co znajduje odbicie także w cenie. Materiał ten jednak wydaje się interesujący jako surowiec do otrzymywania steroli, gdyż występują one w nim w większej ilości niż w oleju talowym. Wszystko co było wyżej powiedziane na temat różnorodności składu różnych olejów talowych tyczy w znacznie większym stopniu paku z oleju talowego. Na jakość tego produktu nakłada się jeszcze skutek wysokotemperaturowej destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem.

Prace nad pozyskiwaniem fitosteroli i przeprowadzeniem ich w estry stanoli są w ostatnich dwóch dziesięcioleciach przedmiotem zainteresowania kilku potężnych firm światowych.

Firma Forbes Medi Tech (VSE- FMI) w 1998 r. podpisała z firmą Novartis umowę o światowej wyłączności licencji produkcji i stosowania kompozycji sterolowej w produktach żywnościowych. Firma ta opracowała technologię uzyskiwania steroli z mydeł oleju talowego oraz opracowała leki i dodatki do żywności obniżające poziom cholesterolu we krwi.

Novartis – Nutrition jest numerem jeden wśród sprzedawców „zdrowej żywności” w Europie, a numerem dwa w światowej żywności medycznej. Zajmuje także wysoką pozycję w produkcji żywności dziecięcej, m.in. posiada markę Gerber.

W 1997 roku wartość sprzedaży produktów grupy Novartis wyniosła 21,6 mld franków szwajcarskich z czego 13,0 mld związane było z lecznictwem. Firma ta (dyrekcja ma siedzibę w Szwajcarii w Bazylei) inwestuje ponad 3 mld fr. szwajcarskich w prace badawczo-rozwojowe, zatrudnia 78 tys. ludzi w ponad 100 krajach.

Ostatnio firma Raisio, twórczyni margaryny „Benecol”, zawarła porozumienie z firmą Johnson and Johnson dotyczące licencji na światowy marketing tego typu produktów. Jednocześnie prowadzone są szerokie poszukiwania innych produktów, mogących być nośnikami estrów stanoli. Dla działania w Europie Johnson and Johnson nawiązał współpracę z belgijską firmą Janssen Pharmaceutical. Raisio i firma papiernicza Harting S.A. w Santiago w Chile porozumiały się co do rozwoju przerobu produktów ubocznych przemysłu papierniczego. Tu Raisio zachowa 51% kapitału, a nowa firma Detsa pozostałe 49%. Dla realizacji zamierzeń przewiduje się nakłady inwestycyjne na poziomie 30 mln \$, zaś Raisio zadeklarowało dostawę fitosteroli w ilości 4 tys. ton rocznie.

W sierpniu 1990 r. Raisio i Westraco Corp. powiadomiły o intencji wspólnego produkowania surowca sterolowego z sosnowych odpadów produkcji papierniczej. Porozumienie przewiduje budowę przez Raisio fabryk estrów stanoli w Charleston.

W 1995 roku Raisio oficjalnie zakomunikowało o odkryciu, iż sterole mogą być przeprowadzone w estry stanoli, które są skuteczne (co odkryto przed 1970 r.) w obniżaniu poziomu cholesterolu we krwi. Badania wykazały, iż skuteczna ich dawka to 2 g dziennie. Zawarta jest ona mniej więcej w 25 g margaryny „Benecol”.

„Benecol” zawiera około 9% estrów fitosteroli pochodzących obecnie z fińskich celulozowni. Fiński potencjał produkcyjny fitosteroli to 2–3 tys. ton rocznie, a światowy jest co najmniej 10-krotnie większy.

Powodem stosowania estrów, a nie wolnych steroli lub stanoli, jest to, iż te krystaliczne związki zmieniają teksturę żywności, wady tej nie mają estry.

Sterole i ich estry są całkowicie bez smaku i zapachu, znoszą proces pieczenia i smażenia bez utraty działania przeciwcholesterolowego. Margaryna z estrami sitostanolu ma stosunkowo dużą trwałość, może być przechowywana w niskiej temperaturze do trzech miesięcy.

Omawiana margaryna w pierwszych latach wytwarzania zawierała około 70% substancji tłuszczowej, zaś obecnie sprzedawane są dwa warianty — o zawartości tłuszczu około 70% i od roku 1998 także około 40%. Skład kwasów tłuszczowych analizowanych przez nas margaryn pokazano w tabeli 2.

Skład kwasów tłuszczowych w obu typach margaryn wyprodukowanych w 1999 r. był zbliżony, próbka archiwalna z 1986 roku miała skład inny. Margaryny z roku 1999 jako główne składniki wykazały kwas palmitynowy C_{16:0} około (10–20%), oleinowy C_{18:1} (około 25–28%), linolowy C_{18:2} cc (40–50%), stearynowy C_{18:0} (4–5%) i linolenowy C_{18:3} ccc (1–2%). Margaryny zawierały śladowe ilości innych kwasów tłuszczowych, w tym izomerów trans.

Margaryna z wcześniejszej produkcji zawierała znacznie więcej kwasu oleinowego — blisko 50%, linolowego około 16%, linolenowego około 6%. Wskazuje to na fakt, iż we wcześniejszej produkcji stosowano znacznie wyższy dodatek ciekłego oleju rzepakowego, a obecnie więcej ciekłego słonecznikowego.

Margaryna „Benecol” została wprowadzona do handlu w Finlandii w roku 1995, a obecnie jest dostępna także w innych krajach (Wielka Brytania, Holandia).

W roku 1998 obroty związane z margaryną „Benecol” wyniosły 283 mln marek fińskich, zaś od stycznia do sierpnia 1999 — 266 mln marek fińskich.

Utrudnieniem we wprowadzeniu margaryny „Benecol” na rynek USA jest stanowisko FDA. Instytucja ta, ażeby wydać zgodę na reklamowanie „Benecolu” jako żywności antycholesterolemicznej, potrzebuje 4–6 lat na przeprowadzenie bardzo kosztownych badań, natomiast możliwe jest dopuszczenie produktu do powszechnego obrotu na zasadzie uproszczonego programu badań (GRAS – Generally Recognised as Safe). Po tej procedurze jednak nie jest możliwe reklamowanie jej jako żywności funkcjonalnej.

Tabela 2

Skład kwasów tłuszczowych margaryny „Benecol”
Fatty acid composition of the „Benecol” margarine

KT	40% tłuszczu* 40% Fat	70% tłuszczu* 70% Fat	67% tłuszczu** 67% Fat
C 8:0	0,5	0,6	0,4
C 10:0	0,5	0,5	0,3
C 12:0	3,2	3,2	2,5
C 14:0	1,2	1,5	1,4
C 15:0	< 0,1	< 0,1	–
C 16:0	9,1	18,8	17,6
C 16:1	0,1	0,1	0,2
C 17:0	0,1	0,1	0,1
C 17:1	0,1	< 0,1	0,2
C 18:0	3,8	4,5	2,9
C 18:1 t	0,2	0,1	–
C 18:1 c9	27,7	25,4	49,3
C 18:1 c11	1,2	0,8	–
C 18:1c14	–	<0,1	0,1
C 18:2 ct/tc	0,5	0,4	–
C 18:2 cc	47,5	40,7	16,2
C 18:3izo	0,2	0,2	0,4
C 18:3 ccc	2,3	1,1	6,1
C 20:0	0,3	0,3	0,6
Σ C 20:1	0,4	0,3	1,1
C 20:2	–	0,1	0,1
C 20:4	0,1	<0,1	–
C 22:0	0,5	0,4	0,3
C 22:1	0,1	0,1	0,3
C 24:0	0,5	0,1	–
C 24:1	<0,1	0,4	–

* — data produkcji — *produced* — 11.1999

** — data produkcji — *produced* — 08.1986

Biorąc pod uwagę fakt, że pak oleju talowego jest korzystniejszym surowcem do wydzielania fitosteroli, przytoczyliśmy kilka tablic dotyczących składu paku różnego pochodzenia.

Tabela 3

Charakterystyka paku podestylacyjnego oleju talowego z zakładów radzieckich
The characteristics of tall oil pitch from Soviet factories

Wskaźnik <i>Index</i>	Zakład — <i>Factory</i>		
	Kotłowski CBK	Sołombalskij CBK	Bratski LPK
Liczba kwasowa — <i>Acid number</i>	40–45	30–45	40–50
Liczba zmydlenia — <i>Saponification number</i>	90–120	90–120	100–130
Skład wagowy (%) — <i>Composition, weight %</i>			
– substancje niezmydlające — <i>unsaponifiables</i>	30–37	32–35	25–32
– substancje utlenione — <i>oxidised substances</i>	12–20	13–18	13–20
– kwasy żywiczne — <i>rosin acids</i>	11–18	13–16	20–25
– kwasy tłuszczowe — <i>fatty acids</i>	28–36	28–36	27–34
– temperatura mięknięcia (°C) — <i>softening point</i>	303–310	303–310	313–318

Według Clark 1975

Z powyższej tabeli widać, iż liczba kwasowa paku z trzech zakładów była podobna, to samo można powiedzieć o liczbie zmydlenia. Pozostałe wskaźniki są również zbliżone. Interesująca nas szczególnie zawartość substancji niezmydlających się zamyka się w granicach 25–37%.

Holmbom (1978) badał pak oleju talowego z czterech fińskich i dwóch amerykańskich zakładów papierniczych. Cechy i skład badanych próbek paku pokazano w tabelach 4 i 5.

Tabela 4

Charakterystyka paku podestylacyjnego oleju talowego z zakładów fińskich i amerykańskich
Characteristics of tall oil pitch from Finish and American factories

Wskaźniki <i>Index</i>	Fiński <i>Finish</i>				Amerykański <i>American</i>	
	A	B	C	D	E	F
Wydajność, % oleju talowego — <i>Yield, % of tall oil</i>	25	25	25	30	20	20
LK, mg KOH — <i>Acid number</i>	34	49	38	39	30	27
LZm, mg KOH — <i>Saponification number</i>	94	115	111	105	106	101
Temperatura mięknięcia (°C) ^a — <i>Softening point</i>	46	30	25–30	36	–	–
Kwasy żywiczne, % ^b — <i>Rosin acids</i>	12,6	16,9	15,5	10,8	8,8	10,6
Nierozpuszczalne w eterze naftowym <i>Non-soluble in petrol ether</i>	2,4	7,4	10,0	9,5	8,5	0,4

a — typowe wartości oznaczone przy pomocy urządzeń destylacyjnych

b — metoda Linder-Perssona

Według Holbom 1978

Wydajność paku w stosunku do oleju talowego leżała w granicach 25–30% w olejach fińskich, a w amerykańskich wynosiła około 20%. Liczba kwasowa była nieco wyższa w olejach fińskich, podobnie jak liczba zmydlania. Wszystkie próbki zawierały znaczną ilość substancji nierozpuszczalnych w eterze naftowym — do 10% (oprócz próby A i F). Skład grupowy tych samych próbek pokazano w tabeli 5.

Tabela 5

Skład grupowy paku oleju talowego (% wagowy paku)
Group composition of the tall oil pitch (weight % of pitch)

Składnik — Component	A	B	C	D	E	F
Wolne kwasy, razem — <i>Free acids, together</i>	39,3	51,6	48,6	44,6	46,7	34,6
– kwasy tłuszczowe — <i>fatty acids</i>	1,4	1,8	1,3	0,8	1,3	2,4
– kwasy żywiczne — <i>rosin acids</i>	10,6	12,5	9,7	6,1	3,3	6,5
– inne — <i>others</i>	27,3	37,3	37,6	37,7	42,1	25,7
Kwasy zestryfikowane, razem <i>Estrified acids, together</i>	30,6	23,2	23,3	26,8	27,9	37,8
– kwasy tłuszczowe — <i>fatty acids</i>	8,2	12,9	13,3	15,2	13,8	12,4
– kwasy żywiczne — <i>rosin acids</i>	1,7	0,9	1,2	0,9	1,6	1,9
– inne — <i>others</i>	20,7	9,4	8,8	10,7	12,5	23,5
Niezmydlające się, razem <i>Unsaponifiables, together</i>	30,1	25,3	28,2	28,6	25,4	27,6
– nisko cząsteczkowe — <i>low molecular</i>	14,6	14,6	14,1	17,7	15,8	15,1
– wysoko cząsteczkowe — <i>high molecular</i>	15,5	10,6	14,1	10,9	9,6	12,5
Ciężar równoważnikowy wolnych kwasów <i>Equivalent weight of FFA</i>	648	591	716	642	873	719

Z powyższych liczb wynika, iż ilość wolnych kwasów tłuszczowych wynosiła powyżej 2%, żywicznych do 10–12%, dominowały „inne” do blisko 40%. Substancje niezmydlające się stanowiły 25–30%, podobnie jak w pakach radzieckich. Ten sam autor badał skład kwasów tłuszczowych, kwasów żywicznych i substancji niezmydlających się. Dane liczbowe przedstawiliśmy w tabeli 6 (Holbom 1978).

Oleje fińskie, z których otrzymane były paki podestylacyjne, pochodziły głównie z przerobu drewna sosnowego, jednakże możliwa była domieszka 10–30% drewna brzoźowego, natomiast oleje amerykańskie były otrzymane z sosny. Paki A i B pozyskane były w tym samym zakładzie, ale w odmienny sposób.

Zaznaczyć należy, że estry kwasów żywicznych zmydlają się trudno, nawet w drastycznych warunkach. Stąd pewna ich ilość może być zawarta w substancjach niezmydlających się. Spośród interesujących nas steroli w badanych pakach znaleziono głównie β -sitosterol, któremu towarzyszył sitostanol oraz campesterol, znajdowane również w oleju talowym użytym do destylacji.

Tabela 6

Główne kwasy tłuszczowe, kwasy żywiczne i niskocząsteczkowe składniki paku z oleju talowego (% wagowy paku) — *Main fatty acids and rosin acids and low molecular components from tall oil pitch (weight % of pitch)*

Składnik ^a — <i>Component</i>	A	B	C	D	E	F
<i>Wolne kwasy — Free acids</i>						
Oleinowy	+	0,5	+		0,6	0,9
Pimarowy	+	0,5	+			
Izopimarowy	+	0,7	0,6	+	+	+
Palustrynowy	+	0,6	+			+
Dehydroabietynowy	4,1	3,5	3,2	1,9	1,2	2,3
Abietynowy	2,6	4,4	2,9	1,9	0,7	1,7
<i>Zestryfikowane kwasy — Estrified acids</i>						
Palmitynowy	+	+	+	+	0,8	0,8
Oleinowy	2,2	4,8	4,6	3,6	5,6	5,0
Linolowy	0,6	1,8	2,2	2,4	2,3	1,7
Sprzężony linolowy	+	0,8	0,7	0,8	0,6	0,6
Dehydroabietynowy	0,6	+	+		0,5	0,6
<i>Niezmydlające się — Unsaponifiables</i>						
Niezidentyfikowane alk. dwuterpenowe <i>Non-identified diterpenic alkohol</i>	0,6	0,5				
Pimarol	+	+	0,7	0,7	0,5	0,6
Izopimarol			+		1,0	0,9
Docosanol	0,5	0,8	0,8	0,6	–	+
Tetracosanol	0,5	0,7	0,7	0,6	1,1	0,9
Zdehydratowany β-sitosterol <i>Dehydrated β-sitosterol</i>	2,3	1,0	+	0,5	2,8	2,1
Zdehydratowany sitostanol <i>Dehydrated sitostanol</i>	1,0				+	+
Campesterol	+	0,6	0,7	0,7	+	+
β-sitosterol	1,3	4,6	5,6	6,4	3,7	3,6
Sitostanol	0,5	1,3	1,3	1,8	0,9	0,8
Betulinol	+	0,6	0,8	0,9		

a — powyżej 0,5% — *over 0.5%*;

+ — zawartość 0,2–0,5% — *contents 0.2–0.5%*

Badane próby paku oleju talowego zawierały (w większej części) interesujący poziom steroli. W przeliczeniu na masę paku stanowiły one do 6,4%, towarzyszył im sitostanol w ilości do 1,8%. W próbkach oznaczonych literami B, C, D stwierdzono obecność betulinolu, co świadczy o obecności drewna brzoźowego przy produkcji oleju talowego.

Erä (1979) badał skład paku oleju talowego z tych samych źródeł co Halmбом.

Ponieważ pak oleju talowego ma bardzo ciemną barwę i niemiły zapach, a cechy te komplikują jego przerób na bardziej szlachetne produkty, może istnieć potrzeba poddania rafinacji surowego paku oleju talowego.

Autor zastosował rafinację 6 próbek paku (4 fińskie, 2 amerykańskie) rozpuszczając najpierw 10 g próbki w heksanie i oddzielając część nierozpuszczalną przez odwirowanie. Następnie do roztworów dodano 10 g Aerosilu i 380-Nontu 2N (1:1), wytrząsano przez 2 godziny, po czym mieszaninę odwirowywano i odpędzono heksan, a oczyszczony pak analizowano na GLC.

Opisany zabieg rafinacji zmieniał tylko w niewielkim stopniu skład paku, co przedstawia tabela 7. Badane próby paku również wykazują wysoką zawartość sitosterolu (4,6–7,0%) oraz sitostanolu (1,3–2,0%).

Deordiew (1990) wykonał badanie efektywności używania niektórych rozpuszczalników na wydzielenie substancji niezmydlających się z mydeł talowych. W wyniku badań laboratoryjnych użycia eteru etylowego, butanolu, izobutanolu, alkoholu izoamyłowego, eteru dwuizopropylowego, eteru dwubutyłowego, toluenu, ksylenu, heksanu i octanu stwierdzono uzysk ekstraktu od około 17% (heksan) do około 34,3% (eter etylowy). Natomiast (w stosunku do użytego paku) eter etylowy, eter dwuizopropylowy, eter dwubutyłowy i octan etylu dały uzysk ponad 10%.

W innym doświadczeniu stwierdzono, iż dobre wyniki można osiągnąć także stosując rozpuszczalniki chlorowcowe, takie jak dwuchloroetan czy chlorobenzen.

Metody pozyskiwania steroli z materiałów roślinnych

Najważniejszym bodaj surowcem do pozyskiwania fitosteroli jest olej talowy i produkt uboczny, pozostałość po oddestylowaniu łatwiej lotnych części oleju talowego, tj. wolnych kwasów tłuszczowych i kwasów żywicznych – tzw. pak z oleju talowego. Znane są inne źródła, np. odpady po odwanianiu tłuszczów, jednakże ich zasób jest znacznie mniejszy niż oleju talowego.

Na temat pozyskiwania fitosteroli z oleju i paku talowego istnieje obszerna literatura patentowa, a także (mniej liczne) publikacje naukowe. Na szczególną uwagę zasługuje literatura patentowa w aspekcie rozważań nad ewentualnością przemysłowego wytwarzania produktu tłuszczowego o cechach antyhipercholesterolemicznych.

Tabela 7

Główne kwasy tłuszczowe, żywiczne i niskocząsteczkowe substancje niezmydlające się w paku oryginalnym (B₁–D₁) oraz przetworzonym (B₂–D₂) (% wag. paku) — *Main fatty acid, rosin acid and low molecular unsaponifiables in crude and refined tall oil pitch*

Składnik — <i>Component</i>	B1	B2	C1	C2	D1	D2
<i>Wolne kwasy — Free acids</i>						
Oleinowy	0,5	0,7	+	+	+	+
Pimarowy	0,5	0,6	+	+		
Izopimarowy	0,7	0,6	0,6	0,5	+	+
Palustrynowy	0,6	0,6	+	+		+
Dehydroabietynowy	3,5	3,7	3,2	2,6	1,9	1,9
Abietynowy	4,4	3,7	2,9	3,2	1,9	2,3
<i>Zestryfikowane kwasy — Estrified acids</i>						
Palmitynowy	+	+	+	+	+	+
Oleinowy	4,8	5,4	4,6	6,1	3,6	5,0
Linolowy	1,8	2,1	2,2	2,4	2,4	2,6
Sprzężony linolowy	0,8	0,9	0,7	1,2	0,8	0,8
Dehydroabietynowy	+	+	+	+	+	+
<i>Niezmydlające się — Unsaponifiables</i>						
Niezidentyfikowane alk. dwuterpenowe <i>Non-identified diterpenic alkohol</i>	0,5	0,6				
Pimarol	+	0,6	0,7	0,5	0,7	1,0
Izopimarol			+			
Docosanol	0,8	0,9	0,8	1,2	0,6	0,8
Tetracosanol	0,7	0,8	0,7	1,1	0,6	0,8
Zdehydratowany β-sitosterol <i>Dehydrated β-sitosterol</i>	1,0	1,3	+	0,7	0,5	0,9
Campesterol	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7	0,9
β-sitosterol	4,6	5,3	5,6	5,7	6,4	7,0
Sitostanol	1,3	1,5	1,3	1,8	1,8	2,0
Betulinol	0,6	0,5	0,8	0,5	0,9	1,1

a — powyżej 0,5% — *over 0.5%*;

+ — zawartość 0,2–0,5% — *contents 0.2–0.5%*

Omówimy tu ważniejsze pozycje w układzie chronologicznym.

Julian (1972) z firmy The Procter and Gamble uzyskał w 1970 roku patent na „Proces dla wypreparowania steroli z paku oleju talowego”. Patent zawiera 6 zastrzeżeń. Metoda postępowania jest następująca: Roślinny surowiec zawierający sterole rozpuszcza się w mieszaninie rozpuszczalników zawierającej alkohol od około jednego do sześciu atomów węgla oraz płynny węglowódór. Dodaje się od około 0,5 do 10% wagowych alkoholu i rozdziela się fazy. Poddaje się

zmydleniu estry steroli uzyskane z fazy węglowodorowej za pomocą zasady metalu alkalicznego w temperaturze od około 32 aż do 260°C, po rozpuszczeniu w niższym alkoholu sterole łąguje się organicznym rozpuszczalnikiem, który nie rozpuszcza mydeł, np. składającym się z mieszaniny metanolu i nitrometanu, w temperaturze około 21°C. Na koniec sterole się rekrystalizuje.

Clarc (1975) otrzymał patent na destylacyjną metodę oczyszczania steroli. Patent uzyskano na rzecz General Mills Chemicals. Autorzy zastrzegli destylacyjny rozdział steroli zawartych w mieszaninie w określonych warunkach ciśnienia i temperatury. Pewne frakcje zostają w ten sposób wzbogacone w campesterol, inne w sitosterol. Temperatury, o których mowa leżą w granicach 225–270°C, zaś ciśnienie bezwzględne w przedziale 0,05–3,5 mmHg.

Utrzymuje się zależność pomiędzy ciśnieniem a temperaturą określoną wzorem

$$T = 257(x + 0,0355)$$

gdzie x jest wyrażone w mm Hg.

Sformułowano 13 zastrzeżeń patentowych.

Lethinen (1975) opisał proces waloryzacji paku podestylacyjnego (14 zastrzeżeń), na drodze zmydlenia i wykwaszenia w temperaturze 200–300°C i następnie wydestylowania uzyskanych wolnych kwasów. W procesie tym zachodzi dehydratacja steroli z utworzeniem węglowodorów.

Johansson (1977) zastrzegł proces wydzielania steroli z substancji niezmydlających się uzyskanych po zmydleniu olejów roślinnych. Substancje polarne, a wśród nich sterole, ekstrahowane są mieszaniną rozpuszczalników hydrofilnych. Przedstawiono 6 obszernych zastrzeżeń dotyczących m.in. składu mieszaniny rozpuszczalników (tab. 8). Patent udzielony został na rzecz Japan Synthetic Rubber Co.

Tabela 8

Skład mieszanek do ekstrakcji steroli z substancji niezmydlających się (SN) w układzie ciecz–ciecz jako % wagowy (od/do) * — *Composition of the mixtures for liquid-liquid sterols extraction from unsaponifiables (weight %, from/to)*

Lp.	Mieszanka A — <i>Mixture A</i>			Mieszanka B — <i>Mixture B</i>				
	heksan	aceton	metanol	metanol	heksan	aceton	woda	inne SN <i>others</i>
1.	30/100	0/50	0/50	0/49,9	0/50	0/50	0,1/10	0/10
2.	60/95	5/30	0/10	30/70	20/40	10/30	0,5/3	0/10
3.	70/85	10/20	3/10	35/50	25/35	15/25	1/3	5/10
4.	70/85	10/20	3/10	35/50	25/35	15/25	1/3	5/10

* wg Johansson (1977)

Autorzy proponują następujący tok postępowania. Substancje niezmydlające się rozpuszcza się w mieszaninie A, roztwór poddaje się ekstrakcji polarną mieszaniną B, do której przechodzą także sterole. Następnie rozdziela się obie fazy, a frakcję hydrofilną (B) zateża się i poddaje krystalizacji przez ochłodzenie. Po wykrystalizowaniu odfiltruje się sterole. Można odpowiednio wykorzystać lugi pokryształizacyjne do następnych ekstraktacji.

Harada i in. (1978) przedstawili proces otrzymywania z paku oleju talowego kwasów tłuszczowych, kwasów żywicznych i steroli o wysokiej czystości. Formułują oni 7 zastrzeżeń. Metoda polega na zmydleniu oleju talowego, następnie wysuszeniu uzyskanej masy w wyparce cienkowarstwowej ze skrobakami, ogrzewając do temperatury wyższej niż temperatura topnienia mydeł, w celu odpędzenia wody i substancji niezmydlających się. Zmydlenie rozkłada wszystkie połączenia estrowe, także steroli i innych alkoholi. Po tym zabiegu mydła rozkłada się kwasem i poddaje destylacji uzyskując wysokiej jakości kwasy tłuszczowe i żywiczne, a także sterole i inne trudno lotne substancje niezmydlające się.

Ong (1978) opracował preparat farmaceutyczny, w którym aktywną substancją jest mieszanina sitosteroli wypreparowana z oleju talowego. Preparat, w postaci wodnej zawiesiny, przeznaczony jest do podawania doustnego w celu zredukowania hipercholesterolemii. Zawiera on farmakologicznie czynną ilość drobno zmielonych sitosteroli, farmaceutycznie uzasadnioną ilość czynnika chelatującego, tak aby zapobiec utlenianiu sitosterolu, następnie karboksymetylocelulozę sodową, środek powierzchniowo czynny składający się z kilku komponentów. Przedstawiono 11 zastrzeżeń.

Koskenniska i in. (1979) przedstawili sposób wydzielania β -sitosterolu o niewielkiej zawartości α -sitosterolu i campesterolu z substancji niezmydlających się zawartych w mydłach talowych. Surowiec jest traktowany organicznym lub nieorganicznym kwasem, co powoduje izomeryzację α -sitosterolu. Roztwór jest następnie zagęszczany, a surowy β -sitosterol wykrystalizowany. Dla uzyskania czystego produktu wykonuje się rekrystalizację. Podano 6 zastrzeżeń patentowych. Sposób postępowania jest następujący:

- a) rozpuszczenie mieszaniny w wybranym rozpuszczalniku składającym się z etanolu, acetonu, izopropanolu, toluenu, ksylenu, chloroformu;
- b) poddanie roztworu (a) działaniu mocnego kwasu wybranego z klasy HCl, HBr, H_3PO_4 , metanosulfonowego, p-toluenosulfonowego w celu powstania surowego produktu reakcji;
- c) odzyskanie produktu z procesu (b), tzn. z pierwszego rozpuszczalnika;
- d) rozpuszczenie produktu (c) w rozpuszczalniku organicznym wybranym spośród: etanolu, izopropanolu, chloroformu, chlorku metylenu, toluenu, octanu etylu, acetonu, heptanu, metyloetyloketonu lub ich mieszaniny;
- e) przeprowadzenie selektywnej krystalizacji β -sitosterolu.

Koskenniska (1980) przedstawił inną wersję wyżej omówionego sposobu. Polega ona na izolacji β -sitosterolu w zasadzie wolnego od α -sitosterolu z mieszaniny obu izomerów przez działanie mieszaniną rozpuszczalników, gdzie surowiec jest traktowany mieszaniną rozpuszczalników zawierającą węglowodór aromatyczny, polarny rozpuszczalnik organiczny mający zdolność tworzenia wiązań wodorowych oraz wodę. Rozpuszczalnik aromatyczny może być zamieniony na mieszaninę aromatycznego i alifatycznego. Po rozpuszczeniu materiału wyjściowego, produkt reakcji jest wytrącany, najlepiej przez wychłodzenie roztworu macierzystego. Uzyskany materiał jest wolny od α -sitosterolu.

- stosunek rozpuszczalnika do surowca sterolowego wynosi od 1 : 2 do 1 : 30,
- stosunek rozpuszczalnika węglowodorowego alifatycznego do aromatycznego wynosi 10–99%,
- rozpuszczalnik polarny — 1–90% wody, co najmniej tyle aby wysycić warstwę węglowodorową,
- rozpuszczalnik polarny to niższy alkohol lub keton,
- stosunek β -sitosterol: mieszanina rozpuszczalników 1 : 5 ÷ 1 : 8

Patent zawiera 8 zastrzeżeń.

Wynalazek Hamunena (1982) dotyczy pozyskiwania β -sitosterolu wolnego od formy α i polega na krystalizacji sterolu z mieszaniny rozpuszczalników organicznych i wody, korzystnie z dwuchloroetanu-1,2 lub metyloetyloketonu i wody.

Z mieszaniny zawierającej 20 do 25% α -sitosterolu uzyskuje się produkt o 5% jego zawartości, a przy kolejnej krystalizacji poniżej 1%. Przy stosowaniu metyloetyloketonu otrzymuje się β -sitosterol wolny od betulinolu.

- stosunek steroli do rozpuszczalnika organicznego wynosi 1 : 3 ÷ 1 : 20, gdzie zawartość wody jest wyższa niż 2%.
- stosunek steroli do rozpuszczalnika w mieszaninie wynosi 1 : 7 ÷ 1 : 10.

Inny patent Hamunena (1983) dotyczy procesu izolacji steroli z mieszanin otrzymanych z materiałów roślinnych, głównie z naturalnych substancji zawartych w mydłach z procesu siarczanowego produkcji celulozy. Substancje niezmydlające się są mieszane z metanolem, metyloetyloketonem, ogrzewane, a następnie chłodzone. Po oziębieniu, osad jest odfiltrowywany oraz przemywany (np. acetonem i metanolem). Mieszanina steroli uzyskana według podanego wyżej sposobu z mydeł otrzymanych z drewna zawierającego także brzozę, przy zastosowaniu do krystalizacji metanolu, zawiera około 5% campesterolu, 65–80% β -sitosterolu, 15–25% α -sitosterolu. Stosując mieszaninę metyloetyloketonu z wodą uzyskuje się produkt o zawartości α -sitosterolu poniżej 5%, campesterolu 6–8% i β -sitosterolu 85–90%.

Zastrzeżenia (jest ich 10) precyzują niektóre sposoby postępowania jak niżej:

Surowcami są substancje niezmydlające się z oleju talowego, olejów roślinnych lub innych pochodzenia roślinnego. Kolejne operacje to:

- a) dodanie do surowca rozpuszczalnika wybranego z grupy składającej się z metanolu, etanolu, mieszaniny metanolu i etanolu oraz mieszaniny metyloetyloketonu i wody zawierającej więcej niż 1% wagowy wody. Stosunek substancji niezmydlających się do rozpuszczalnika wynosi od 1 : 2 do 1 : 20.
- b) mieszanie substancji niezmydlających się z rozpuszczalnikiem w temperaturze pokojowej, ogrzanie mieszaniny (jeśli trzeba), ochłodzenie do temperatury pokojowej lub niższej;
- c) odfiltrowanie wytrąconego sitosterolu;
- d) oddzielenie składników nie-sitosterolowych przez odmycie właściwym rozpuszczalnikiem.

Hughes (1985) przedstawia metodę pogłębiającą wykorzystanie wartościowych komponentów paku oleju talowego, przez poddanie paku hydrolizie prowadzonej do hydrolizy i uwolnienia kwasów, a także steroli wcześniej związanych estrowo, a następnie wtórną destylację paku po hydrolizie. Takie postępowanie daje wyższy uzysk kwasów i steroli.

Van Dam (1985) uzyskał patent na chromatograficzną metodę izolowania steroli z surowców je zawierających. Patent zawiera 10 zastrzeżeń. Według opisanej metody, roztwór surowca poddawany jest pojedynczej separacji chromatograficznej, po której następuje prosta krystalizacja. Kolumna chromatograficzna zawiera adsorbent wybrany z grupy zawierającej tlenek glinu, krzemian magnezu, silikażel i ich mieszaniny w ilości nie większej niż 10-krotnie w stosunku do surowca sterolowego. Sterole odzyskuje się przez odmycie z kolumny za pomocą rozpuszczalnika organicznego lub mieszaniny rozpuszczalników. Następnie prowadzi się krystalizację, uzyskując czystość farmaceutyczną.

Patent Sanderson'a i in. (1985) dotyczy jednego z elementów sposobu poprawy jakości produktów talowych, a mianowicie częściowego usunięcia niepożądanych, ciemno zabarwionych związków. Metoda ta jest chroniona 18 zastrzeżeniami patentowymi. Proces przebiega w kilku fazach:

Faza A — rafinacja rozpuszczalnikowa

- rozdział oleju talowego pomiędzy nie mieszające się ze sobą rozpuszczalniki zawierające co najmniej jeden rozpuszczalnik niepolarny,
- oddzielenie fazy polarnej od niepolarnej,
- dodanie nowej porcji rozpuszczalnika polarnej do fazy niepolarnej,
- oddzielenie fazy polarnej od niepolarnej,
- usunięcie fazy niepolarnej.

Faza B — destylacja pozostałości w fazie niepolarnej.

Proces ten powoduje rozjaśnienie barwy o co najmniej 5 stopni.

Wykonanie odbarwienia ułatwia proces pozyskiwania steroli.

Brander i in. (1987) opisali adsorpcyjne wydzielanie steroli. Proces polega na skontaktowaniu oleju talowego z adsorbentem zawierającym węgiel aktywny o średnicy porów około 20 Å lub 30–90 Å i powierzchni właściwej około 300 m²/g, a korzystniej 700–1100 m²/g, np. pyropolimer karbonizowanej żywicy. Po adsorpcji węgiel oddziela się na prasie. Selektywnie zaadsorbowane sterole są ekstrahowane węglowodorem aromatycznym, np. toluenem lub chlorobenzenem. Patent zawiera 20 zastrzeżeń.

Patent Tackett'a i in. (1991) dotyczy otrzymywania steroli (głównie stigmatsteroli) z odpadów z odwaniania tłuszczów. Sformułowano 26 zastrzeżeń patentowych. Przedstawione są dwa podstawowe warianty procesu:

1. A — estryfikuje się destylat z odwaniania i otrzymuje destylat zawierający estry kwasów tłuszczowych.
 - B — zestryfikowany destylat krystalizuje się z układu rozpuszczalników zawierających:
 - a) alkohol C₁ do C₆,
 - b) wodę,
 - c) rozpuszczalnik niepolarny z celu wytrącenia wzbogaconych steroli.
2. A' — zmydla się destylat z odwonienia przed fazą A.

W dalszej części autorzy zastrzegają stosowanie różnych rozpuszczalników do uwolnienia steroli takich jak estry, metanol, heptan, a także charakteryzują żadaną jakość destylatów z odwaniania pod względem zawartości i składu pozyskiwanych steroli. Obszernie zastrzeżone są także inne parametry procesu (np. temperatura, sposoby krystalizacji i in.).

Myojo i in. (1990) przedstawili metodę enzymatyczną wytwarzania estrów kwasów tłuszczowych, która może mieć zastosowanie także w procesie estryfikacji steroli. Tu sygnalizujemy, że proces polega na reakcji:

- a) składnika wybranego z grupy steroli lub rozgałęzionych, alifatycznych alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych, zawierających 14 do 32 atomów węgla oraz
- b) składnika wybranego z grupy kwasów tłuszczowych lub estrów kwasów tłuszczowych w kontakcie z enzymem wybranym z grupy składającej się z lipazy i esterazy cholesterolowej, lub z enzymem w postaci unieruchomionej w układzie składającym się z medium wodnego i zawierającego wodę rozpuszczalnika organicznego.

Reakcja prowadzi do uzyskania estru komponentu a). Patent zawiera 57 zastrzeżeń.

Kutney i in. (1996) przedstawiają metodę pozyskiwania i oczyszczania mieszaniny fitosteroli z masy mydlanej na drodze ekstrakcji mieszaniną rozpuszczalników — nie zawierającą alkoholi i zawierającą wodę, keton i węglowodór. Uzyskany „creamy” roztwór jest oczyszczany, dając fitosterole. Wspomniany keton to 2-propanon, węglowodór zaś zawiera 5–10 atomów węgla, np. heksan, zaś „creamy” roztwór oczyszczany jest przez krystalizację.

Deordejew i in. (1990) badali przydatność szeregu rozpuszczalników (węglowodory, alkohole, węglowodory chlorowane, octan etylu) do ekstrakcji substancji niezmydlających się, w tym steroli, z paku podestylacyjnego oleju talowego. Różne rozpuszczalniki dawały różny odzysk substancji niezmydlających się i steroli, spośród nich najkorzystniejsze wyniki dały octan etylu i dwuchloroetan. W ich przypadku uzyskano do 7% steroli (w stosunku do paku), co stanowiło do 80% ich odzysku.

Material i metody

Doświadczalne badania nad metodą pozyskiwania steroli z frakcji substancji niezmydlających się oleju talowego prowadzone były na próbkach oleju talowego pochodzących z zakładów celulozowo–papierniczych w Świeciu oraz Kwidzynie. Zbadane próbki tych olejów praktycznie nie różniły się liczbami charakterystycznymi i zawartością fitosteroli. Pak podestylacyjny pochodził z przerobu oleju talowego ze Świecia w Rafinerii Nafty w Czechowicach–Dziedzicach.

Chemikalia i rozpuszczalniki użyte do doświadczeń były czystości analitycznej. Wszystkie stosowane rozpuszczalniki (poza chloroformem) były łatwopalne. Doświadczenia prowadzono w skali laboratoryjnej.

Metody analityczne badania oleju talowego i paku zaczerpnięto z normy branżowej BN-86/7313-02 „Produkty uboczne przemysłu papierniczego. Surowy olej talowy”. Były to oznaczenia liczby kwasowej, liczby zmydlenia oraz zawartości substancji niezmydlających się.

Ocenę zawartości steroli prowadzono dwoma sposobami. Pierwszy z nich to metoda digitoninowa, pozwalająca na ocenę sumarycznej zawartości β -steroli, wykorzystująca ich własności tworzenia z digitoniną kompleksów nie rozpuszczalnych w 80% etanolu (Karleskind 1992). Drugą metodą była chromatografia gazowa. Obie metody wymagały niewielkich adaptacji ze względu na specyfikę materiału poddawanych badaniom (barwa, wiskoza, niejednorodność).

Oznaczenie zawartości steroli metodą digitoninową realizowane było dwoma sposobami.

Sposób rozszerzony wg Paquot'a (Karleskind 1992) był następujący: Substancje niezmydlające się oleju talowego (paku) wyekstrahowane eterem etylowym poddawano ponownemu zmydleniu za pomocą 2N KOH w etanolu. Po zmydleniu

i odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozpuszczano w wodzie i trzykrotnie ekstrahowano eterem etylowym. Następnie połączone ekstrakty eterowe płukano wodą i suszono za pomocą bezwodnego siarczanu sodu. Pozostałość, po odpędzeniu eteru, rozpuszczano w chloroformie i dodawano 1% roztwór digitoniny w 80% etanolu. Po 12 godzinach oddzielano osad digitoninowy na sączku ze szkła spiekanego, przemywano chloroformem, acetonem i wodą, suszono do stałej wagi. Zawartość steroli obliczano według wzoru:

$$\text{Sterole (jako sitosterol)} = \text{masa digitonidów} \times 25,6 / \text{naważka}$$

Oznaczenie powyższe prowadzono również według metody uproszczonej UICPA (Karleskind 1992), bez uprzedniej ekstrakcji substancji niezmydlających się. W metodzie tej próbkę oleju talowego (paku) zmydlano 40% wodnym roztworem KOH w obecności etanolu. Po zmydleniu rozpuszczano w wodzie, dodawano 80% etanol oraz roztwór digitoniny. Dalej postępowano jak w metodzie rozszerzonej.

Metody te, po dokonaniu oceny statystycznej, okazały się dawać wyniki porównywalne, dlatego też przy analizie większej ilości próbek posługiwano się metodą uproszczoną.

Oznaczenie steroli prowadzono także metodą chromatografii gazowej. Rozdział wykonywano na kolumnie 30-metrowej, niepolarniej (5% dwufenyl, 95% dwumetylopolisiloxan) o średnicy wewnętrznej 0,25 mm.

We wstępnym etapie przygotowania próbki wyodrębniano sterole metodą zmydlania metanolem roztworem KOH. Przed zmydleniem do próbki dodawano standard wewnętrzny — roztwór cholestanu w heksanie. Standardem może być również acetonowy roztwór betulolu. Następnie przeprowadzano estryfikację kwasów tłuszczowych metanolem roztworem trójfluorku boru oraz — przy pomocy nasyconego roztworu NaCl — ekstrakcję estrów metylowych KT i substancji niezmydlających się.

Kolejnym krokiem było upochodnienie steroli i standardu do pochodnych krzemowych (BSTFA+1% TMCS). Tak przygotowaną próbkę analizowano chromatograficznie.

Metoda GLC jest wygodna w realizacji i daje informacje o składzie steroli, jednak w odniesieniu do oleju talowego i paku oleju talowego nasuwa poważne trudności identyfikacji pików — wobec ich mnogości.

Wyniki i ich omówienie

Proces realizacji zamierzenia wytworzenia produktu zawierającego czynnik hypercholesterolemiczny rozkłada się na 3 podstawowe etapy. Pierwszy z nich to pozyskiwanie fitosteroli o właściwej czystości (przeważająca część publikacji, także patentowych, mówi o sitosterolu). Drugim etapem jest uwodornienie

sitosterolu — są bowiem publikacje stwierdzające wyższą aktywność produktu uwodornienia — sitostanolu. Wreszcie trzeci etap to estryfikacja grupy hydroksylowej stanolu kwasami tłuszczowymi. Zabieg ten powoduje znaczne obniżenie temperatury topnienia stanolu i zmianę jego cech konsystencji, co znacznie ułatwia wprowadzenie go do nośnika spożywczego.

W niniejszym opracowaniu zajmiemy się tylko pierwszym zasadniczym etapem. Co do niezbędności, czy też celowości drugiego i trzeciego etapu, można mieć różne poglądy.

Surowcem do pozyskiwania fitosteroli o dominującym udziale sitosterolu może być uprzednio wspomniany olej talowy (OT) lub pak podestylacyjny tego oleju (POT). W tabeli 9 pokazaliśmy niektóre wskaźniki próbek OT i POT użytych w doświadczeniu.

Tabela 9

Charakterystyka olejów talowych (OT) i paku (POT)
Characteristics of tall oil (OT) and tall oil pitch (POT)

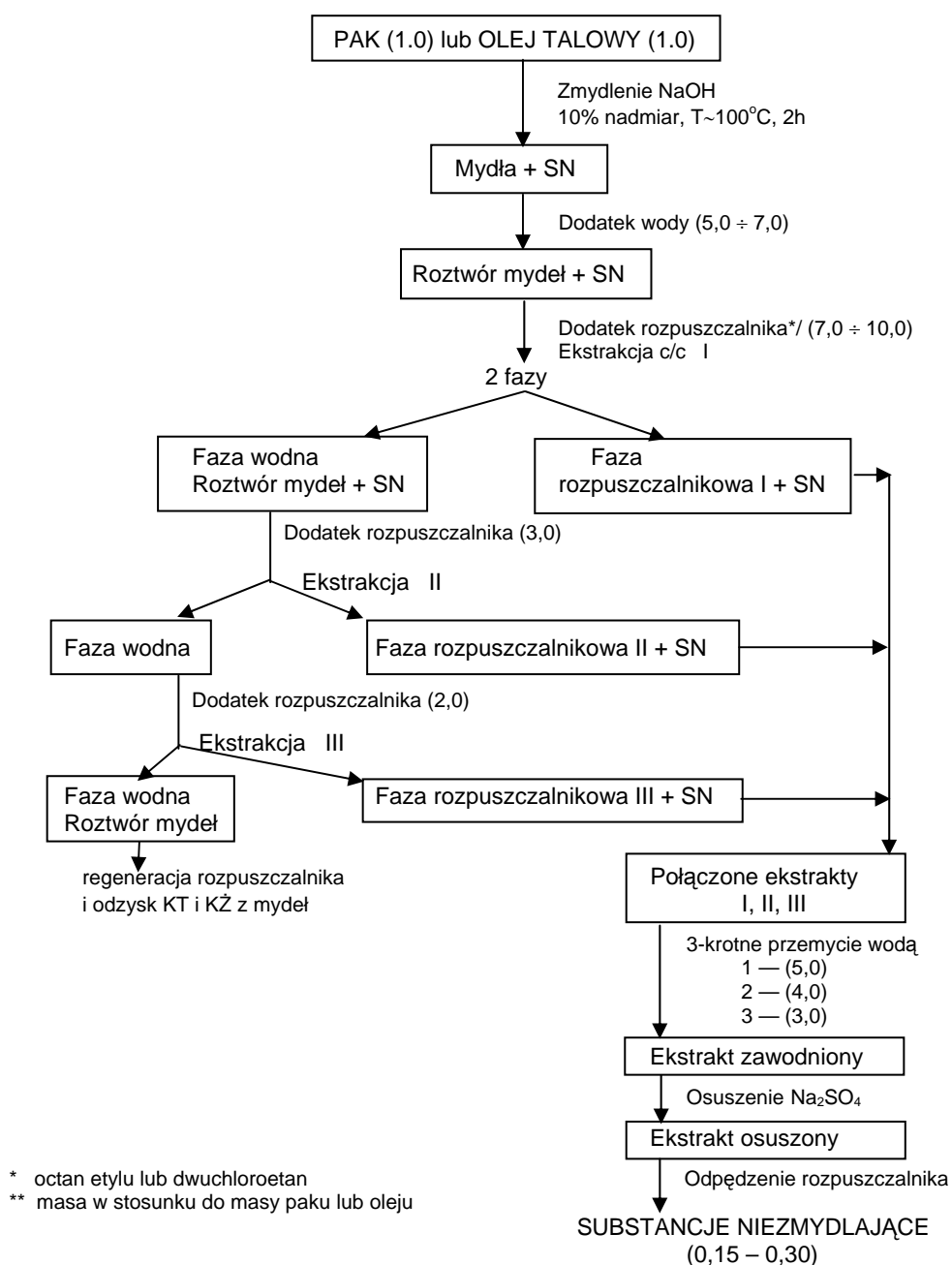
Lp. No.	Rodzaj próbki <i>Sample</i>	LK* <i>Acid number</i>	LZm* <i>Saponificat number</i>	SN* (%) <i>Unsaponifiables</i>	Sterole** (%) <i>Sterols</i>
1.	OT	135,8	144,0	14,7	3,7
2.	OT	137,5	120,0	13,0	3,6
3.	OT	145,3	135,6	15,8	4,2
4.	OT	162,5	152,8	15,1	3,9
5.	OT	145,8	136,0	13,5	3,6
6.	OT	159,0	152,7	14,6	4,0
7.	POT	34,6	102,5	29,6	5,2
8.	POT	35,5	100,2	28,2	4,8
9.	POT	34,7	97,8	29,5	6,0

* wg normy BN-86/7313-02 „Produkty uboczne przemysłu papierniczego. Surowy olej talowy”

** oznaczenie metodą digitoninową

Sposób wydzielania substancji niezmydlających się i steroli z oleju talowego i z paku jest podobny. Najpierw surowiec (jeżeli trzeba — po oddzieleniu zanieczyszczeń na drodze filtracji lub wirowania) poddaje się zmydleniu na gorąco. Zawarte w surowcu kwasy żywiczne (KŻ) i tłuszczowe (KT) zostają łatwo przeprowadzone w mydła, natomiast zawarte w oleju estry, trudniejsze do zmydlenia, ulegają temu procesowi po jakimś czasie.

Na rysunku 1 pokazano „mokry” sposób postępowania. Oznacza to, iż produkt zmydlenia zadaje się wodą destylowaną do całkowitego rozpuszczenia się mydeł. Po pełnym oziębieniu roztwór poddaje się trzykrotnej ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym, korzystnie — octanem etylu.



Rys. 1. Schemat procesu wydzielania substancji niezmydlających się z paku podestylacyjnego oleju talowego — *The process of the unsaponifiables separation from tall oil or tall oil pitch*

Ciemnobrunatny roztwór rozpuszczalnikowy, zawierający substancje niezmydlające się, wśród nich sterole, przemywa się wodą destylowaną, osusza i odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Faza wodna zawiera parę procent octanu etylu, który może być odzyskany przez wygotowanie, natomiast mydła mogą być rozłożone kwasem, a uzyskane KT i KŻ wykorzystane w zwykły sposób.

Do ekstrakcji używaliśmy w części doświadczeń dwuchloroetanu. Przebieg ekstrakcji (minimalny czas rozdzielania się faz) był podobny jak w przypadku octanu etylu. Większy ciężar właściwy rozpuszczalnika ułatwiał ekstrakcję.

Pokazany na rysunku 1 schemat pozyskiwania substancji niezmydlających się nasuwał niekiedy trudności w realizacji ze względu na powstawanie uporczywych emulsji, co zmuszało do modyfikowania przyjętego sposobu postępowania. Sądzić można, iż związane było to z różnicami w składzie badanych próbek surowca.

Wyżej opisana metoda „mokra” wymaga użycia stosunkowo dużej ilości wody do rozpuszczenia mydeł, a także przez to dużych objętości rozpuszczalnika. W literaturze istnieją sugestie, które można nazwać metodą „pół-mokra” i „suchą”.

Metoda „pół-mokra” bazuje na ekstrakcji pulpy mydlanej — tzn. po zmydleniu oleju talowego czy paku, mydła rozcieńcza się tylko niewielką ilością wody i taką masę poddaje się ekstrakcji. Próba zastosowania tej metody nie powiodła się ze względu na obecność trzeciej fazy tworzącej się na granicy roztworu wodnego i rozpuszczalnika, w którą wbudowywał się rozpuszczalnik.

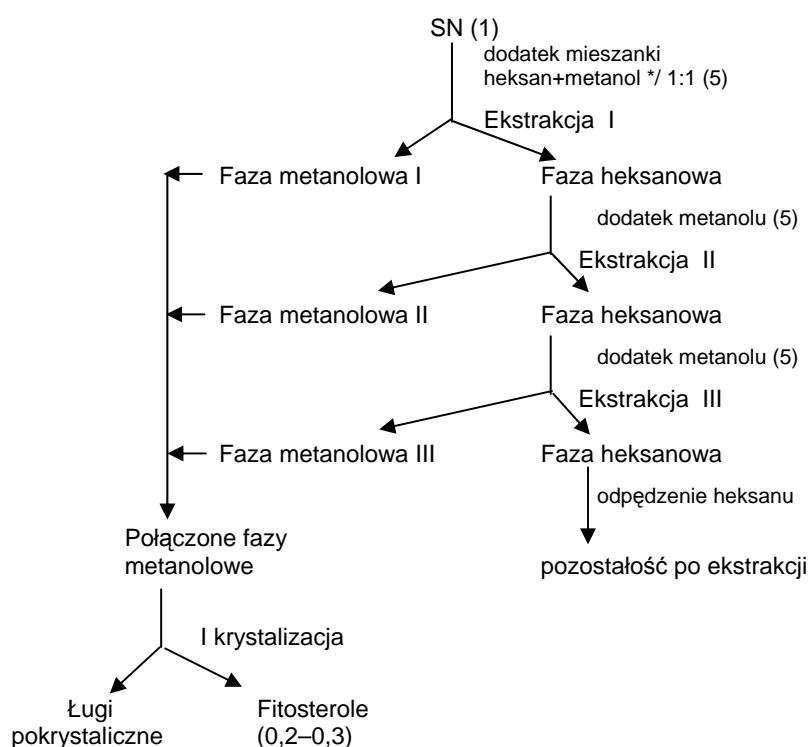
Trzeci wariant to metoda sucha. W metodzie tej masa po zmydleniu zostaje wysuszona, następnie rozdrobniona i wtedy poddana ekstrakcji. Przebieg ekstrakcji jest obiecujący, jednak suszenie i rozdrabnianie masy mydlanej następuje z dużymi trudnościami (twardość i kleistość masy).

Uzyskane substancje niezmydlające się zawierające sterole, mogą być przerabiane zgodnie ze schematem pokazanym na rysunku 2.

Substancje niezmydlające się rozpuszcza się w mieszaninie heksan–metanol 1 : 1, metanol może zawierać niewielkie ilości wody.

Po trzech ekstrakcjach, połączone ekstrakty metanolowe poddaje się krystalizacji przez pozostawienie ich na kilkanaście godzin w temperaturze około 5°C. Wydzielone kryształy steroli oddziela się przez filtrację i przemywa tym samym rozpuszczalnikiem. Część tak uzyskanych próbek wymagała rekrytalizacji.

Uzyskane sterole wykazywały temperaturę topnienia w granicach 130–135°C.



* metanol uwodniony

Rys. 2. Schemat wydzielania steroli z substancji niezmydlających się i ich krystalizacja — *The process of the sterols separation and crystallization from unsaponifiables of tall oil or tall oil pitch*

Wnioski

1. Przeprowadzone doświadczenia pozwalają wnioskować, iż proces ekstrakcyjny pozyskiwania fitosteroli z oleju i paku talowego prowadzi do założonego celu, jednak dla oceny jego efektywności ekonomicznej potrzebne są dalsze prace w skali mikro- i półtechnicznej.
2. Ocena realizacji poszczególnych zabiegów, mimo pozornego podobieństwa do procesów stosowanych w przemyśle tłuszczowym (ekstrakcja, uwodornienie, rafinacja), prowadzi do wniosku, iż żaden z elementów technologii stosowanej

w przemyśle olejarskim nie może być, nawet w części, wykorzystany w procesach pozyskiwania sterolowego czynnika antyhipercholesterolemicznego.

3. Proces pozyskiwania steroli z oleju i paku talowego bazuje na tanim surowcu, ale rozbudowanej technologii. Nasuwa się myśl, że być może, udałoby się na drodze poszukiwania nowych odmian roślin — bogatszych w fitosterole — uzyskać źródła wysoce wartościowego materiału biologicznego.

Literatura

Polski Konsensus Tłuszczowy, XII 1999.

Barder T.J. i in. Patent US 4.849.112, 1987. Separacja adsorpcyjna steroli z paku oleju talowego z adsorbentem węglowym. „Adsorption separation of sterols from tall oil pitch with carbon adsorbent”.

Bogomolow B.D. i in. Obzor. Inform. M. WNIPIEJ Lesprom, Moskwa 1989.

Clark J.P. i in. Patent US 3.879.431, 1975. Destylacyjna metoda oczyszczania steroli. „Purification of sterols by distillation”.

Deordiew W.T. i in. 1990. Uzyskiwanie krystalicznych fitosteroli z substancji niezmydlającej się hydrolizowanego paku. „Połączanie krystaliczekowo fitosterina i z nieomydlajemych wieszczestw gidrolizowanego paka”, Chemiczeskaja pierierabotka dREWieszny, 1 (13).

Era V. i in. 1979. Refining of Tall Oil Pitch. JAOCS 56: 992-993.

Foster Ch.H. Patent US 4.192.811, 1980. Proces wydzielania produktów pochodnych stigmasterolu „Process for separating stigmasterol-derived products”.

Hamunen A. i in. Patent US 4.420.427, 1982. Proces izolacji steroli z mieszanin steroli. „Process for the separation of sterols or mixtures of sterols.”

Hamunen A. i in. Patent US 4.422.974, 1983. Metoda oczyszczania β -sitosterolu pozyskanego z substancji niezmydlających się surowych mydeł otrzymywanych przy procesie siarczanowym produkcji celulozy. „Process for the purification of β -sitosterol isolated from the unsaponifiables in crude soap from the sulphate cellulose process”.

Harada T. i in., Patent US 4.076.700, 1978. Proces pozyskiwania kwasów tłuszczowych o wysokiej czystości i/lub kwasów żywicznych oraz steroli. „Process for recovering high purity fatty acids and/or rosin acid and sterols”.

Holbom B. i in. 1978. Skład paku talowego, JAOCS 55: 342-344.

Hughes R.E. Patent US 4.524.024, 1985. Proces odzyskiwania kwasów tłuszczowych i steroli z paku oleju talowego. „Process of recovering fatty acids and sterols from tall oil pitch”.

Jakubowski A., Braczko M. 1997. Tłuszcze Jadalne, 32: 132-134.

Johanson i in. Patent US 4.044.031, 1977. Proces wydzielania steroli. „Process for the separation of sterols”.

Julian D i in. Patent US 3.691.211 1972. Proces otrzymywania steroli z paku oleju talowego. „Process for preparing sterols from tall oil pitch”.

Karleskind A. 1992. Manuel des Corps Gras, London, Paris, New York.

- Konai Y. i in. US 4.614.620 1986. Proces produkcji i-brassicasterolu. „Process for producing i-brassicasterol”.
- Koskenniska L.A. i in. Patent US 4.265.824, 1979. Proces wydzielenia β -sitosterolu zawierającego niski poziom α -sitosterolu. „Process for isolation of beta-sitosterol containing a low percentage of alpha-sitosterol”.
- Koskenniska L.A. Patent US 4.298.539, 1980. Proces wydzielenia β -sitosterolu. „Process for the isolation of β -sitosterol”.
- Kutney J.P. Patent US 5.770.749, 1996. Proces izolacji mieszaniny fitosteroli z pulpy mydeł. „Process of isolating a phytosterol composition from pulping soap”.
- Lehtinen T.P. Patent US. 3.926.936, 1975. Proces przemysłowego wytwarzania cennych produktów z paku oleju talowego. „Process for manufacturing valuable products from tall oil pitch”.
- Miettinen T., Vanhanen H., Wester J. Patent US 5.958.913, 1999. Substancja dla obniżania wysokich poziomów cholesterolu w serum i metoda jej wytwarzania i użytkowania. „Substance for lowering high cholesterol level in serum and methods for preparing and using the same”.
- Myojo K. i in. Patent US 5.219.733, 1990. Metoda uzyskiwania estrów kwasów tłuszczowych. „Process for preparing fatty acid esters”.
- Ong J.T.H. Patent US 4.195.084., 1978. Stabilne smakowo wodne zawiesiny farmaceutyczne sitosteroli oleju talowego i metoda ich otrzymywania. „Taste-stable aqueous pharmaceutical suspension of tall oil sitosterols and a method for the preparation thereof”.
- Sanderson T.F. i in. Patent US 4.643.847, 1985. Metoda poprawy barwy kwasów żywicznych oleju talowego. „Method of improving the color of tall oil rosin”.
- Tackett T.L. i in. Patent US 5.117.016, 1991. Metoda pozyskiwania produktu wzbogaconego w stigmasterol z odpadów z odwaniania. „Method for obtaining a stigmasterol enriched product from deodorizer distillate”.
- Van Dam M.J.D. Patent US 4.664.807, 1985. Metoda izolacji steroli w ilościach komercyjnych z materiałów je zawierających. „Method of isolating sterols in commercial quantities from sterol-containing material”.