

Wiesława Walisiewicz-Niedbalska, Józef Góra,\* Bożenna Kosmacińska,  
Hanna Gwardiak

Instytut Chemii Przemysłowej w Warszawie

\* Politechnika Łódzka, Instytut Podstaw Chemii Żywności

## Badanie zmian składu fitosteroli w procesie uwodorniania oleju rzepakowego niskoerukowego

### Study on phytosterols changes in hydrogenation process of low erucic acid rapeseed oil

Słowa kluczowe: uwodorniony olej rzepakowy, fitosterole, GLC

Key words: hydrogenated rapeseed oil, phytosterols, GLC

Badano skład fitosteroli w oleju rzepakowym niskoerukowym przed uwodornieniem i po uwodornieniu. Frakcję sterolową izolowano metodą wg normy niemieckiej F III 1 (98), która polega na: zmydleniu próbki tłuszczu, wydzieleniu substancji niezmydlających na kolumnie z tlenkiem glinu, izolowaniu frakcji steroli z substancji niezmydlających metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej i następnie analizie składu wyodrębnionych steroli metodą GLC po przeprowadzeniu ich w pochodne silanowe, stosując Betulinę jako standard wewnętrzny. Zawartość steroli w oleju przed uwodornieniem wynosiła 7221 i 7638 mg/kg, a po uwodornieniu 6659 i 6779 mg/kg. We frakcji sterolowej zidentyfikowano następujące sterole: cholesterol, brassikasterol, 24-metylenocholesterol, kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol i  $\Delta^5$ -avenasterol. W oleju po uwodornieniu wykryto dodatkowo izomer kampesterolu o podwójnym wiązaniu przy węglu 7. Obecność tego izomeru, jak również podwyższonej ilości kampesterolu i jego izomeru w uwodornionym oleju może świadczyć o uwodornianiu łańcucha bocznego w brassikasterolu.

Phytosterols composition in low erucic acid rapeseed oil before and after hydrogenation was studied. The German standard method F-III 1 for sterol isolation and analysis was used. The method comprises: saponification of fat, isolation of the unsaponifiable matter using an aluminium oxide column and separation of sterol fraction by preparative TLC, determination of the composition of sterol fraction as sterol trimethylsilyl ethers and Betulin as internal standard by GLC. The sterols content in the oil before hydrogenation was 7221 and 7638 mg/kg and after hydrogenation 6659 and 6779 mg/kg. In the sterol fraction the following components were identified: Cholesterol, Brassicasterol, 24-Methylene cholesterol, Campesterol, Stigmasterol,  $\beta$ -Sitosterol,  $\Delta^5$ -Avenasterol. The hydrogenated oils were found to contain  $\Delta^7$ -Campesterol. The presence of  $\Delta^7$ -Campesterol and increased content of Campesterol and its isomer might testify to the hydrogenation of the unsaturated bound in the side chain of Brassicasterol.

## Wprowadzenie

---

Oleje roślinne obok głównych składników, triacylogliceroli, zawierają substancje nie ulegające zmydleniu, w ilościach od około 0,3% w oleju kokosowym do około 2,3% w oleju kukurydzianym. Olej rzepakowy niskoerukowy zawiera ich średnio około 0,8% (Fedeli i in. 1996). W zależności od rodzaju oleju i jego pochodzenia skład substancji niezmydlających jest zróżnicowany. Olej palmowy zawiera 500–700 ppm karotenów (Ooi i in. 1994), podczas gdy inne oleje jeżeli je zawierają, to w mniejszych ilościach, np. 0,3–3,0 w oleju sojowym i 4,9–9,1 ppm w oleju rzepakowym niskoerukowym (Poradnik inżyniera 1976). Jednakże głównymi składnikami frakcji substancji niezmydlających olejów są fitosterole. Oleje charakteryzują się określonym składem steroli bądź ich wzajemnym stosunkiem. We frakcji sterolowej oleju rzepakowego występuje brassikasterol, w ilości 6–10%, charakterystyczny dla oleju roślin z rodziny *Brassica* (Homberg, Bielefeld 1989). Stigmasterol w oleju rzepakowym niskoerukowym występuje w śladowych ilościach natomiast w oleju sojowym, słonecznikowym i palmowym w ilościach od 7,3 do 17,6% (Homberg, Bielefeld 1989).

W czasie procesu rafinacji olejów, bielenia czy dezodoryzacji, zawartość steroli ulega obniżeniu o 18–36%, a jednocześnie powstają Kampasta-3,5-dien, stigmasta-3,5,22-trien i stigmasta-3,5-dien, będące produktami degradacji steroli (Kosmacińska i in. 1997; Ferrari 1996; Official Methods). Produkty utleniania steroli, np. pochodne hydroksylowe, ketonowe i związki epoksy, wykryto i oznaczono w olejach roślinnych stosowanych w przemysłowych procesach głębokiego smażenia oraz w lipidach wydzielonych z wyrobów poddawanych smażeniu (Dutta, Appelqvist 1997; Dutta 1997).

Wiele prac dotyczy badań zmian w strukturze steroli zachodzących w procesach rafinacji, natomiast niewiele z nich zajmuje się badaniem zmian zachodzących w składzie fitosteroli w procesie uwodornienia. Niektórzy badacze przypuszczają, że w czasie reakcji uwodorniania triacylogliceroli mogą zostać wysyczone również podwójne wiązania w cząsteczkach steroli, co w wyniku całkowitego uwodornienia fitosteroli prowadzi do powstania fitostanoli. W kilku pracach został opisany korzystny wpływ fitostanoli, wprowadzanych z pożywieniem, zazwyczaj w formie pochodnej estrowej z kwasami tłuszczowymi, na obniżenie poziomu cholesterolu LDL (Miettinen 1994, Vanhanen i in. 1993).

Dutta i Appelqvist (1996) w substancjach niezmydlających uwodornionego oleju sojowego i kokosowego wykryli fitostanole na poziomie 8% i 2%. Reiser (1973) twierdzi, że uwodornione oleje zawierają produkty całkowitego i częściowego uwodornienia steroli, przez co mogą mieć wpływ na zmiany poziomu cholesterolu w organizmie. Jednak Parodi (1975) uwodorniając sterole w warunkach zbliżonych do tych, w których uwodorniane są oleje roślinne do celów jadalnych, nie stwierdził obecności produktów uwodornienia steroli.

Celem naszej pracy było porównanie składu frakcji substancji niezmydlających pod kątem zmian w składzie fitosteroli w oleju rzepakowym niskoerukowym przed uwodornieniem i po uwodornieniu.

## Materiały i metody badań

---

Do badań stosowano:

- olej rzepakowy niskoerukowy bielony, dwie próby oznaczone jako: ORz-1 i ORz-2
- olej rzepakowy niskoerukowy uwodorniony w warunkach przemysłowych, odpowiednio oznakowany:
  - OrzU-1 (temp. top. 35,8°C,  $n_D^{20}$  — 1,4639, LK 0,42)
  - OrzU-2 (temp. top. 36,0°C,  $n_D^{20}$  — 1,4639, LK 0,40)
- wzorce steroli: stigmasterol i  $\beta$ -sitosterol, firmy Aldrich Chemical Co Ltd
- Betulinę, Lup-20[29]-ene-3 $\beta$ ,28-diol firmy SIGMA

Fitosterole wydzielano metodą wg normy niemieckiej F III 1 (98) (Aitzetmüller i in. 1998), która polega na:

- zmydleniu próbki tłuszczu,
- wydzieleniu substancji niezmydlających na kolumnie z tlenkiem glinu,
- izolowaniu frakcji steroli z substancji niezmydlających metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej,
- analizie składu wyodrębnionych steroli metodą GLC po przeprowadzeniu ich w pochodne silanowe,
- zastosowaniu Betuliny jako wzorca wewnętrznego.

Warunki GLC: kolumna kapilarna 30 m, SPB-1 firmy Supelco, temp. kolumny: początkowa 230°C, narost 2°C/min do 290°C, temperatura dozownika 230°C, temperatura detektora 300°C.

Identyfikację składników przeprowadzono przez porównanie ich czasów retencji z czasami retencji wzorców oraz metodą GC/MS.

## Wyniki

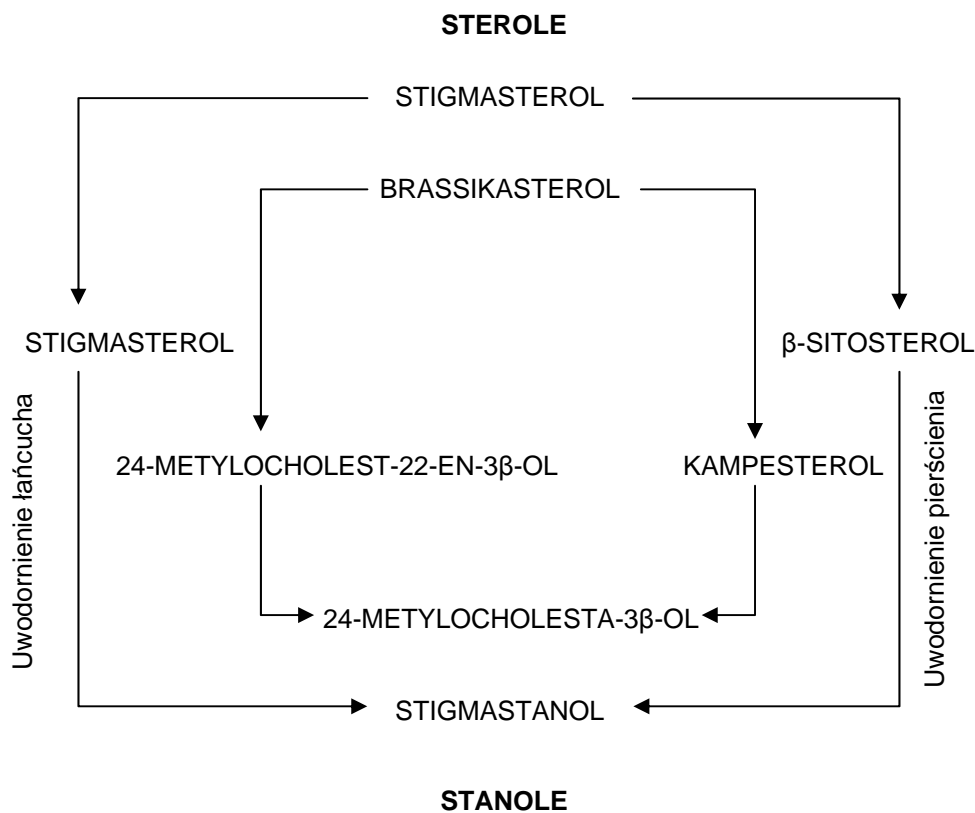
---

Całkowita zawartość (mg/kg) fitosteroli w próbach oleju rzepakowego niskoerukowego przed i po uwodornieniu wynosi:

- ORz1 — 7221;                      ORz2 — 7638
- OrzU1 — 6659;                    OrzU2 — 6779

Zawartość fitosteroli w oleju po uwodornieniu, filtrowanym z dodatkiem czynnika wspomagającego celem usunięcia katalizatora, obniżyła się dla próby ORz1 o 7,8%, a dla próby ORz2 o 11,3%.

W czasie procesu uwodorniania olejów, teoretycznie mogą zachodzić reakcje wysycenia podwójnego wiązania w łańcuchu bocznym i w pierścieniu fitosteroli, zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 1.



Rys. 1 Przebieg reakcji uwodorniania podwójnego wiązania w łańcuchu bocznym i w pierścieniu fitosteroli (teoretyczny) — *The course of hydrogenation double bonds in the side chain or the sterol ring (theoretical)*

W wyniku przeprowadzonych badań oleju rzepakowego niskoerukowego przed uwodornieniem zidentyfikowano następujące składniki frakcji sterolowej (tab. 1).

Tabela 1

Skład frakcji sterolowej — *Compositions of sterol fraction*

Lp.	Nazwa — <i>Name</i>	
	zwyczajowa — <i>trivial</i>	systematyczna — <i>systematic</i>
1.	cholesterol	3-cholesten-3 $\beta$ -ol
2.	brassikasterol	24-metylocholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
3.	24-metylenocholesterol	24-metylenocholesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol
4.	kampesterol	24-metylocholest-5-en-3 $\beta$ -ol
5.	stigmasterol	24-etylocholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
6.	$\beta$ -sitosterol	24-etylocholest-5-en-3 $\beta$ -ol
7.	$\Delta^5$ -avenasterol	24-etylidenocholesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol

We frakcji sterolowej oleju uwodornionego wykryto dodatkowy pik, który przyjęto, na podstawie danych literaturowych, jako izomer kampesterolu zawierający wiązanie podwójne w pierścieniu przy węglu 7 ( $\Delta^7$ -kampesterol wg nazwy systematycznej 24-metylocholest-7-en-3 $\beta$ -ol).

W tabeli 2 przedstawiono skład ilościowy frakcji sterolowej wyizolowanej z substancji niezmydlających.

Tabela 2

Skład steroli we frakcji wyizolowanej z substancji niezmydlających

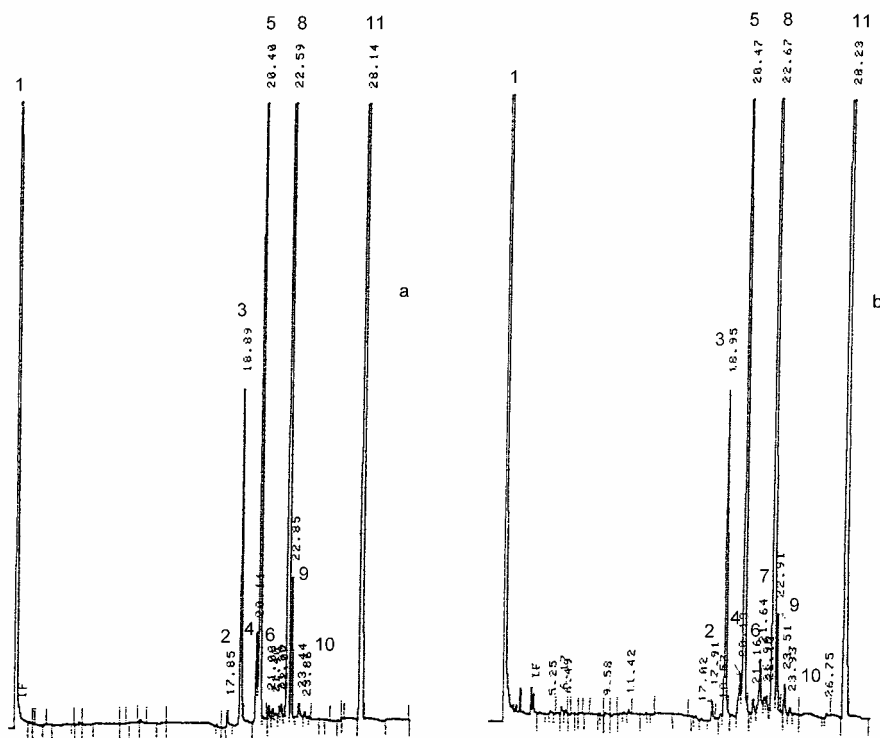
*Composition of sterols in fraction isolated from unsaponifiable matters*

Lp	Nazwa sterolu <i>Sterol's name</i>	Zawartość oleju rzepakowy niskoerukowy <i>Content low erucic acid rapeseed oil</i> [mg/kg]			
		przed uwodornieniem <i>before hydrogenation</i>		po uwodornieniu <i>after hydrogenation</i>	
		ORz1	ORz2	ORzU1	ORzU2
1.	brassikasterol	753	909	700	698
2.	24-metylenocholesterol	221	198	131	89
3.	kampesterol	2198	2387	2134	2217
4.	stigmasterol	30	–	148	149
5.	$\Delta^7$ -kampesterol	–	–	29	35
6.	sitosterol	3339	3439	3211	3260
7.	$\Delta^5$ -avenasterol	315	329	192	200
8.	niezidentyfikowane	365	376	114	231

Celem określenia czy w reakcji uwodorniania oleju zostaje uwodorniony łańcuch boczny steroli obliczono stosunek kampesterolu do brassikasterolu. Stosunek ten w oleju rzepakowym przed uwodornieniem wynosi 2,62 i 2,92; natomiast stosunek sumy kampesterolu i  $\Delta^7$ -kampesterolu do brassikasterolu w oleju po uwodornieniu wynosi 3,09 i 3,22.

Na rys. 2 przedstawiono przykładowe chromatogramy frakcji sterolowej wydzielonej z oleju rzepakowego niskoerukowego przed i po uwodornieniu.

Identyfikacja pików — Peaks:



- 1 — rozpuszczalnik — *solvent*
- 2 — cholesterol
- 3 — brassikasterol — *brassicasterol*
- 4 — 24-metylenocholesterol
- 5 — kampesterol — *campesterol*
- 6 — stigmasterol

- 7 —  $\Delta^7$ -kampesterol
- 8 —  $\beta$ -sitosterol
- 9 —  $\Delta^5$ -avenasterol
- 10 — nie znany — *unknown*
- 11 — betulina

Rys. 2. Przykładowy chromatogram frakcji sterolowej wydzielonej z oleju rzepakowego niskoerukowego: przed uwodornieniem (a) i po uwodornieniu (b) — *Representative chromatogram of the sterols fraction isolated from low erucic acid rapeseed oil before hydrogenation (a) and after hydrogenation (b).*

## Podsumowanie

---

1. W produktach uwodornienia oleju rzepakowego niskoerukowego, w odniesieniu do przebadanych prób, nie zidentyfikowano stanoli produktów całkowitego uwodornienia steroli.
2. Obecność w produkcie uwodornionym izomeru kampesterolu, a jednocześnie nieznacznie zwiększony stosunek sumy kampesterolu i jego izomeru do brassikasterolu w oleju przed uwodornieniem i po uwodornieniu, może świadczyć o uwodornieniu łańcucha bocznego brassikasterolu.
3. Na obniżony poziom fitosteroli w oleju po uwodornieniu w stosunku do oleju przed uwodornieniem może wpływać operacja usuwania katalizatora przez filtrację z dodatkiem czynnika wspomagającego. Podobne obserwacje odnotowała A. Johansson.

## Literatura

---

- Aitzetmüller K., Brühl L., Fiebig H.J. 1998. Analysis of sterol content and composition in fats and oils by capillary – gas liquid chromatography using an internal standard. Comments on the German sterol method. *Fett / Lipid*, 100: 429.
- Dutta P.Ch., Appelqvist L. 1996. Saturated Sterols (Stanols) in Unhydrogenated and Hydrogenated Edible Vegetable Oils and in Cereal Lipids. *J. Sci. Food Agric.*, 71: 383.
- Dutta P.Ch., Appelqvist L.: Studies on Phytosterol Oxides. I. 1997. Effect of Storage on the Content in Potato Chips Prepared in Different Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 647.
- Dutta P.Ch. 1997. Studies on Phytosterol Oxides. II: Content in Some Vegetable Oils and in French Fries Prepared in These Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 659.
- Fedeli E., Lanzoni A., Capella P., Jacini G. 1966. Triterpene Alcohols and Sterols of Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43: 254.
- Ferrari R.A., Schulte E., Esteves W., Bruhl L., Mukherjee K.D. 1996. Minor Constituents of Vegetable Oils During Industrial Processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 587.
- Homberg E., Bielefeld B. 1989. Sterinzusammensetzung und Steringehalt in 41 verschiedenen pflanzlichen und tierischen Fetten. *Fat. Sci. Technol.*, 91: 23.
- Johansson A., Hoffmann I. 1979. The Effect of Processing on the Content and Composition of Free Sterols and Sterol Esters in Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56: 886.
- Kosmacińska B., Walisiewicz-Niezbalska W., Gwardiak H., Chmielarz B., Pawlak I. 1997. Vegetable oil deodorization waste product as a potential source of phytostanols. *Ann. Rep. ICRI*, 81.
- Miettinen T.A., Vanhanen H. 1994. Dietary sitostanol related to absorption synthesis, and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis*, 105: 217.
- Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, Method Cd 26-96 „Stigmastadiene in Vegetable Oils”.

- Ooi C.K., Choo Z.M., Yap S.C., Bosiron Y., Ong A.S.H. 1994. Recovery of Carotenoids from Palm Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 423.
- Parodi P.W. 1975. Fate of Dietary Sterols in Hydrogenated Oils and Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52: 345.
- Poradnik inżyniera. 1976. Przemysł tłuszczowy. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Reiser R. 1973. Saturated fat in the diet and serum cholesterol concentration: a critical examination of the literature. *Am. J. Clin. Nutr.*, 26: 524.
- Vanhanen H., Blomqvist S., Ehnholm C., Hyvönen M., Jauhiainen M., Torstila I., Miettinen T. 1993. Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apo phenotypes during dietary sitostanol ester treatment. *J. Lipid Res.*, 34: 1535.