JRIFST
مقالهٔ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۴۰۰، جلد ۱۰، شماره ۱، صفحات ۱۰-۱
DOI:10.22101/JRIFST.2019.07.28.e1023

# شناسایی ترکیبات شیمیایی تقطیرات حاصل از مرحلهٔ بوگیری روغن خام سویا با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی (GC-MS)

**پریسا جعفریان اصل[۱]، راضیه نیازمند[۲*]، مسلم جهانی[۳]**

۱- دانشجوی دکتری، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۲- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسندهٔ مسئول (r.niazmand@rifst.ac.ir)
۳- استادیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۷
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
تاریخ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۰۵/۰۶

**واژه‌های کلیدی**
استرول
توکوفرول
روغن سویا
کروماتوگرافی‌گازی

## چکیده

تقطیرات مرحلهٔ بوگیری، محصول فرعی و یکی از ضایعات مهم صنایع روغن‌های خوراکی می‌باشد که دارای ماهیت پیچیده‌ای بوده و منبعی باارزش اقتصادی بالا از ترکیبات زیست‌فعال و مغذی شامل فیتواسترول‌ها، توکوفرول‌ها و اسکوآلن می‌باشد. در این مطالعه، به‌جای استفاده از پیش‌تیمار مشتق‌سازی و صابونی‌کردن نمونه (با استفاده از حلال‌های سمی و کار آزمایشگاهی طولانی) که در مطالعه‌های پژوهشی پیشین به‌صورت متداول استفاده شده است، از روش تیمار فراصوت و پس از آن سانتریفیوژکردن و جمع‌آوری مایع رویی جهت تزریق مستقیم به دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی (GC-MS) استفاده شد. بهینه‌سازی برنامهٔ دمایی به‌منظور جداسازی اجزاء مختلف تقطیرات شامل توکوفرول، استرول و اسکوآلن انجام شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده فراوان‌ترین ترکیبات در تقطیرات روغن سویا، فیتواسترول‌ها بودند (۲۲/۵-۲۴/۳ درصد)، این در حالی است که غلظت اسکوآلن و توکوفرول به‌ترتیب ۵/۹-۶ و ۱۰-۱۱/۲۴ درصد بود. مقدار اسیدهای چرب آزاد تقطیرات روغن سویا بالا و به میزان ۶۲/۴۶ درصد اندازه‌گیری شد. همچنین تری‌گلیسریدها اصلی‌ترین گلیسریدهای تقطیرات بودند (۱/۴ درصد). مطالعهٔ حاضر نشان داد که بخش غیرقابل‌صابونی‌شوندهٔ تقطیرات بوگیری به‌دلیل داشتن مقادیر قابل‌توجه ترکیبات زیست‌فعال، می‌تواند پس از تخلیص در صنایع مختلف غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی مورداستفاده قرار گیرد.

## مقدمه

اصلی‌ترین و مهم‌ترین ضایعات مرحلهٔ تصفیهٔ روغن‌های خوراکی تقطیرات مرحلهٔ بوگیری روغن (DOD[۱]) است که در مرحلهٔ بی‌بوکردن به‌دست می‌آید (Shoaib, Mahesar, Jafarian, Niazmand, & Sherazi, 2019). DOD مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف مانند اسیدهای چرب آزاد (FFA[۲])، مونو و دی‌گلیسریدها و استرهای تری‌گلیسرید اسیدهای چرب آزاد، الکل‌های آلیفاتیک و ترپنیک[۳]، واکس‌ها، اسکوآلن[۴]، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی، فیتواسترول‌های آزاد و استری‌شده و توکوفرول‌ها[۵]،

[1] Deodorized distillated (DOD)

[2] Free fatty acids
[3] Aliphatic and terpenic alcohols
[4] Squalene
[5] Tocopherols

می‌باشد. بخش صابونی‌شوندهٔ DOD شامل مقادیر قابل‌توجهی از اسیدهای چرب آزاد و آسیل‌گلیسرول‌هاست، درحالی‌که بخش صابونی‌ناشونده حاوی غلظت بالایی از ترکیبات باارزش مانند توکوفرول‌ها، استرول‌ها و اسکوآلن است که امروزه برای استفاده به‌عنوان غذاهای عملگرا موردتوجه هستند (Naz *et al.*, 2014). اندازه‌گیری مقدار هریک از ترکیبات موجود در DOD عامل مؤثری در تعیین قابلیت آنها برای تبدیل‌شدن به محصولات باارزش می‌باشد (Naz, Sherazi, Talpur, Talpur, & Kara, 2012). بنابراین مقدار فیتواسترول‌ها و توکوفرول‌ها بیان‌کنندهٔ ارزش اقتصادی DOD و عامل افزایش ارزش تجاری آن است (Durant, Dumont, & Narine, 2006).

فیتواسترول‌ها (استرول‌های گیاهی) بخش عمده‌ای از مواد غیرقابل‌صابونی‌شونده را در روغن‌های گیاهی تشکیل می‌دهند. این ترکیبات در کاهش کلسترول بد خون[1] و بیماری‌های قلبی و عروقی در انسان نقش بسزایی دارند که همین مسئله منجربه توسعهٔ استفاده از آنها در غذاهای عملگرا می‌شود (Yang *et al.*, 2010). ارزش تجاری DOD به‌طورکلی توسط میزان توکوفرول‌ها (ویتامین E) تعیین می‌شود. توکوفرول‌ها مخلوطی از ایزومرهای آلفا، بتا، گاما و دلتا می‌باشند که به‌صورت افزودنی در برخی از مواد غذایی، محصولات آرایشی و بهداشتی و دارویی استفاده می‌شوند (Naz *et al.*, 2012).

اسکوآلن یک هیدروکربن خطی با کاربرد آرایشی، بهداشتی و بیوسنتزکنندهٔ کلسترول است و به‌صورت طبیعی در بسیاری از بافت‌ها به‌ویژه کبد کوسه و دیگر ماهی‌ها یافت می‌شود (Moreda, Pérez-Camino, & Cert, 2001). آسیل‌گلیسرول‌ها از دیگر ترکیبات موجود در تقطیرات هستند. تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها، دی‌آسیل‌گلیسرول‌ها و مونوآسیل‌گلیسرول‌ها به‌عنوان آسیل‌گلیسرول و چربی‌های خنثی شناخته شده‌اند (Dumont & Narine, 2007).

ازآنجایی‌که تقطیرات بی‌بوکننده مخلوطی از ترکیبات با قطبیت متفاوت هستند، کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) روشی مناسب برای شناسایی این ترکیبات می‌باشد (Jafarian Asl, Niazmand, & Sherazi, 2021). در بررسی منابع به‌عمل‌آمده روش‌های تجزیه‌وتحلیل مختلفی برای شناسایی و بازیافت ترکیبات شیمیایی باارزش مانند توکوفرول و استرول‌های موجود در تقطیرات بوگیری به‌کارگرفته شده است اما تعداد اندکی از آنها تجزیه‌وتحلیل کامل نمونه‌های تقطیرات را انجام داده‌اند. Durant و همکاران (۲۰۰۶) DOD روغن کانولا را توسط GC-MS با استفاده از روش in-situ موردبررسی قرار دادند. همچنین آنها در مطالعه‌ای دیگر از روش مشتق‌سازی (مشتق سیلان‌دار) نمونه‌ها قبل از تزریق مستقیم به ستون غیرقطبی، برای بررسی ترکیبات موجود در روغن سویا و تقطیرات بوگیری آن استفاده کردند (Durant *et al.*, 2006). این روش‌ها شامل استفاده از حلال‌های سمی مانند N و O- بیس (تری‌متیل‌سیلیل) تری‌فلورواستامید[2]، هگزامتیل دی‌سیلیسان[3] و تری‌فلورواستیک اسید[4] برای مشتق‌سازی می‌باشد. از دیگر معایب روش مشتق‌سازی که در پژوهش‌های قبلی از آن استفاده شده است، کار آزمایشگاهی زیاد و افزایش زمان کلی آنالیز می‌باشد. همچنین استفاده از این روش می‌تواند منجربه تشکیل محصولات جانبی نامطلوب گردد. انجمن شیمیدانان روغن آمریکا (AOCS[5]) روش‌های استاندارد برای آنالیز استرول‌ها و توکوفرول‌ها ارائه کرده است. در این روش‌ها تقطیرات بوگیری صابونی‌شونده و بخش صابونی‌ناشونده جداسازی و توسط GC اندازه‌گیری و شناسایی می‌شود که یکی از معایب این روش، زمان‌بربودن آن است (Jafarian Asl *et al.*, 2021). در سال‌های اخیر Sherazi و Mahesar (۲۰۱۶) از روش صابونی‌کردن ساده بدون مشتق‌سازی برای اندازه‌گیری بخش غیرقابل‌صابونی‌شوندهٔ تقطیرات روغن کانولا و پالم استفاده کردند. همچنین شناسایی ترکیبات حاضر در تقطیرات پالم بعد از صابونی‌شدن توسط GC-MS توسط Estiasih و همکاران (۲۰۱۳) انجام شده است. هدف اصلی در این پژوهش معرفی یک روش سریع، حساس و دقیق برای تعیین هم‌زمان تمام همولوگ‌های توکوفرول، انواع استرول و هیدروکربن‌ها در نمونهٔ DOD است. در این مطالعه نه تنها مرحلهٔ مشتق‌سازی و فرایند صابونی‌کردن حذف شد، بلکه ترکیبات تقطیرات روغن سویا به‌طورکامل تنها در ۳۸

[1] Low-Density Lipid (LDL)

[2] NO. Bis trimethyl fluoro acetamide (BSTFA)
[3] Hexamethyl disilisan
[4] Trifluoro acetic acid
[5] American Oil Chemist's Society (AOCS)

دقیقه جداسازی و شناسایی گردید که قبلاً توسط این روش هرگز به‌طورکامل بررسی نشده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد اولیه

در این تحقیق تقطیرات بوگیری روغن سویا (SODD[1]) به‌عنوان مادهٔ اولیه از کارخانهٔ روغن سه گل نیشابور تهیه و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. اکتاکوزان[2]، نوناکوزان[3]، براسیکا استرول[4]، کامپسترول[5]، استیگما استرول[6]، بتاسیتواسترول[7]، کلسترول[8]، مونو، دی و تری‌گلیسرید از شرکت سیگما تهیه شدند. تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورداستفاده از درجهٔ تجزیه‌ای مناسب برخوردار بودند.

### آماده‌سازی محلول‌های استاندارد

محلول‌هایی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از اکتاکوزان، نوناکوزان، براسیکا استرول، کامپسترول، استیگما استرول، بتاسیتواسترول، مونو، دی و تری‌گلیسرید و آلفاتوکوفرول در کلروفرم تهیه‌شده و در دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شد.

کلسترول به‌دلیل اینکه در نمونهٔ تقطیرات بوگیری حضور نداشت به‌عنوان استاندارد داخلی انتخاب شد. مخلوطی از محلول‌های استاندارد (استانداردهای اکتاکوزان و نوناکوزان، در غلظت ۲/۵-۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، استرول‌ها در غلظت ۲/۵-۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و توکوفرول در غلظت ۱-۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بعد از فراصوت‌دهی تحت‌شرایط یکسانی که برای نمونهٔ اصلی تقطیرات درنظرگرفته شده بود، به دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (مدل X-Agilent technologies، ساخت آمریکا) تزریق شدند (تزریق‌ها ۳ بار انجام شد) و منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری هریک از ترکیبات رسم شدند. حداقل ۵ محلول استاندارد از هر ترکیب موجود در تقطیرات بوگیری تهیه‌شده و در هر مورد منحنی کالیبراسیون باتوجه‌به محدودهٔ دینامیک خطی روش رسم شد.

### آماده‌سازی نمونهٔ تقطیرات بوگیری

۱۰ گرم از نمونهٔ تقطیرات در ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری وزن‌شده و ۱۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ دقیقه هم‌زده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت. پس از سانتریفیوژکردن در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳ دقیقه، مایع رویی جهت تزریق مستقیم به GC-MS جداشده و به میکروتیوپ منتقل شد.

### تعیین خصوصیات و ویژگی‌های روغن

عدد رنگ توسط سیستم رنگ‌سنج لاویباند (نوع TINTOMETER، مد F، ساخت انگلستان) و در سل ۱ اینچی اندازه‌گیری‌شده و به‌صورت واحد (5R+Y) بیان شد. درصد اسیدهای چرب آزاد، عدد صابونی، مقدار کل مواد غیرقابل‌صابونی‌شونده، درصد استرول و توکوفرول طبق روش AOCS (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری میزان مونو، دی و تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها[9]

به‌منظور تعیین ترکیب لیپیدهای خنثی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[10] (مدل X-Agilenttechnologies، USA6200، ساخت آمریکا) مجهز به دتکتور ELS استفاده شد و ترکیب فاز متحرک متیل‌ترت–بوتیل‌اتر و اسید استیک (با نسبت حجمی ۰/۱ درصد) با سرعت جریان برابر ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. برای شناسایی ترکیبات از ستون Diol 5 (Lichrosphere) با ابعاد ۴×۲۵۰ میلی‌متر و ضخامت ۵ میکرومتر استفاده شد.

نمونهٔ تقطیرات توسط اسید استیک در حضور پرمنگنات پتاسیم اکسیدشده و جداسازی محصولات اکسیدشده در حضور نمک منیزیم و تحت‌شرایط خاص انجام شد. نمونهٔ تهیه‌شده تحت‌شرایط نیتروژن و دور از هوا و نور تا زمان آزمایش و تزریق نگهداری شد (Kartha, 1953). مقدار لیپیدهای خنثی در نمونه توسط استاندارد خارجی محاسبه شد.

---

[1] Soybean Oil deodorized Distillated
[2] Octacosane
[3] Nonacosane
[4] Brassicasterol
[5] Campesterol
[6] Stigmasterol
[7] β-Sitosterol
[8] Cholesterol
[9] Monoacylglycerol (MAG), Diacylglycerol (DGA), Triacylglycerol (TAG)
[10] High Performance Liquid chromatography (HPLC)

**شناسایی ترکیبات زیست‌فعال تقطیرات بوگیری توسط کرماتوگرافی گازی مجهز به طیف‌سنج جرمی**

برای جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در نمونهٔ SODD از یک ستون مویینه HP-5MS (Agilent، ساخت آمریکا)، با طول ۳۰ متر×قطر ۰/۲۵ میلی‌متر×ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای اولیهٔ ستون ۱۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود که پس از ۲ دقیقه دما با سرعت ۵ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه افزایش‌یافته و به ۳۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد رسید و به مدت ۵ دقیقه در این دما باقی ماند. از گاز هلیوم با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای محفظهٔ تزریق و نیز آشکارساز به‌ترتیب در ۳۱۰ و ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم گردید. میزان تزریق نمونه ۲ میکرولیتر و با نسبت ۱ به ۱۰ و به‌صورت اسپلیت بود. طیف‌نگار جرمی مورداستفاده (مدل 5977A-Agilent Technologies، ساخت آمریکا) مجهز به منبع یونیزاسیون الکترون برخوردی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت بود. شناسایی کیفی ترکیبات زیست‌فعال نمونه بر مبنای زمان بازداری استانداردها و مقایسهٔ داده‌های به‌دست‌آمده با مقادیر موجود در کتابخانه Wiley و تأیید آن توسط مقایسه با کتابخانهٔ NIST صورت گرفت. برای تعیین مقدار (اندازه‌گیری کمّی) ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده، از سطح زیر پیک استفاده گردید. آنالیز داده‌های کروماتوگرافی توسط نرم‌افزار دستگاه انجام و مقدار هریک از ترکیبات توسط مقایسهٔ آن با استاندارد داخلی (کلسترول) محاسبه شد (Jafarian Asl *et al.*, 2021).

**تجزیه‌وتحلیل آماری**

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار گزارش گردید. میانگین داده‌ها و انحراف استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Instant محاسبه شد.

**نتایج و بحث**

**ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی تقطیرات بوگیری روغن سویا**

DOD تهیه‌شده از شرکت سه گل، در دمای اتاق ظاهری نیمه‌جامد و به رنگ قهوه‌ای تیره (۱۳۷/۴±۱/۰ واحد رنگ لاویباند) بود و با افزایش دمای محیط تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، به مایع تبدیل شد. سایر مشخصات فیزیکوشیمیایی این نمونه در جدول (۱) آمده است. مقدار بالای مواد صابونی‌ناشونده در نمونهٔ SODD نشان‌دهندهٔ مقدار کم گلیسریدها به میزان ۲ درصد در تقطیرات می‌باشد. Sherazi و Mahesar (۲۰۱۶) مقدار مواد غیرقابل‌صابونی‌شونده را در SODD، ۳۵ درصد اعلام کردند. همچنین نتایج آنها نشان داد که میزان هریک از توکوفرول‌ها و استرول‌ها در SODD به‌ترتیب ۱۱/۱۰ و ۱۸ درصد بود. Verleyen و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که میزان توکوفرول‌ها و استرول‌ها در تقطیرات روغن سویا به‌ترتیب ۱۶/۴ و ۱۵/۲۶ درصد بود. آنها همچنین اظهار داشتند که تفاوت در میزان ترکیبات صابونی‌ناشونده در منابع و مطالعه‌های قبلی به‌دلیل تفاوت در شرایط عملیاتی مانند دما، بخار و فشار در بخش بی‌بوکننده است. تفاوت در ترکیبات تقطیرات روغن‌های کانولا و پالم با مقادیر به‌دست‌آمده در پژوهش‌های پیشین در تحقیق Naz و همکاران (۲۰۱۲) نیز اشاره شده است. مقادیر به‌دست‌آمده در این مطالعه نیز با مقادیر ارائه‌شده در منابع متفاوت است که به‌دلیل تفاوت در شرایط فرایند استخراج روغن، تصفیه و مواد خام اولیه است. بدیهی است اگر هدف استخراج، ترکیبات غیرقابل‌صابونی‌شونده باشد بالابودن محتوی این ترکیبات در تقطیرات مزیت محسوب می‌شود؛ درحالی‌که اگر هدف استخراج، اسیدهای چرب آزاد باشد بالابودن محتوی آنها در تقطیرات مطلوب است.

**جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی* تقطیرات بوگیری روغن سویا**

| ویژگی‌ها | SODD |
|---|---|
| ظاهر فیزیکی | تیره نیمه‌جامد |
| رنگ (سل ۱ اینچ، 5r+y واحد) | ۱۳۷/۴۰±۱/۰۰ |
| درصد اسیدهای چرب آزاد (براساس اسید اولئیک) | ۶۲/۴۶±۲/۱۰ |
| درصد روغن خنثی** | ۲/۰۰±۰/۸۰ |
| درصد مواد غیرقابل‌صابونی‌شونده | ۳۵/۵۴±۲/۷۰ |
| درصد توکوفرول‌ها | ۱۱/۲۴±۱/۲۰ |
| درصد استرول کل | ۲۴/۳۰±۱/۵۰ |
| درصد استرول‌های استریفیه‌شده | ۳۵/۵۴±۲/۷۰ |

* میانگین±انحراف معیار

** روغن خنثی = ((درصد اسیدهای چرب آزاد + درصد مواد غیرقابل‌صابونی‌شونده) -۱۰۰)

**میزان چربی‌های خنثی در تقطیرات روغن سویا**

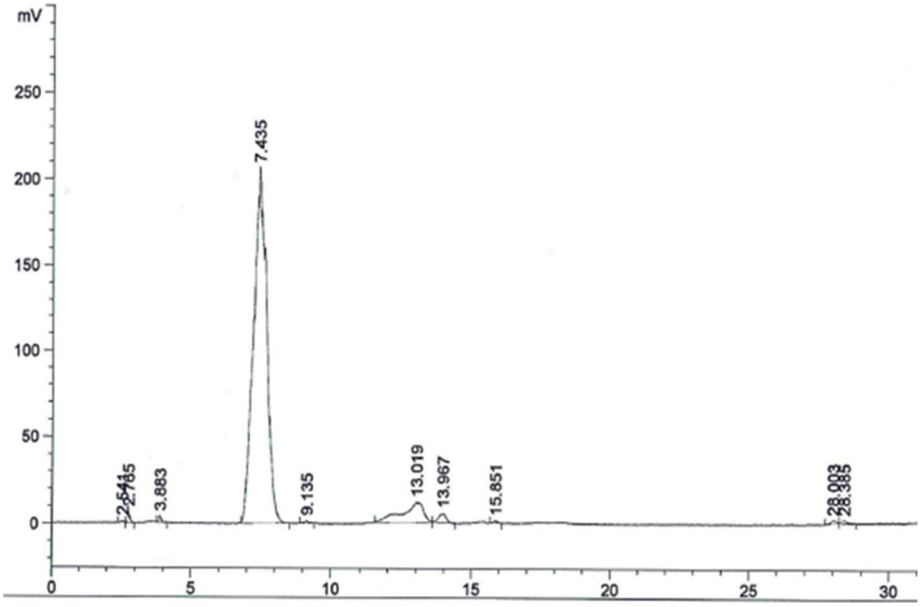
تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها ترکیب اصلی آسیل‌گلیسرول در تقطیرات روغن گیاهی هستند که انواع آن بستگی به نوع منبع روغنی دارد (Naz *et al.*, 2014). اگر این ترکیبات به‌خوبی استخراج شوند ارزش تجاری بالاتری نسبت به اسیدهای چرب آزاد خواهند داشت. شناسایی انواع مختلف خانوادهٔ چربی‌های خنثی توسط مقایسهٔ زمان بازداری آنها با محلول استاندارد و تعیین میزان آنها براساس محاسبهٔ سطح زیر پیک انجام گردید (جدول ۲). زمان شناسایی و خروج آنها بدین‌ترتیب استرها>واکس‌ها>MAG<DAG<FFA<TAG بود (شکل ۱).

مقدار بالای اسیدهای چرب آزاد در SODD نشان‌دهندهٔ حضور مقادیر کمتر تری‌آسیل‌گلیسرول‌هاست. به‌طوری‌که مقدار دی‌گلیسریدها ۰/۷ درصد و میزان مونو و تری‌گلیسریدها به‌ترتیب ۰/۳ و ۱/۴ درصد بود (جدول ۲). Shimada و همکاران (۲۰۰۰) به مقدار ۱/۴ درصد مونوگلیسریدها و عدم حضور دی و تری‌گلیسریدها در تقطیرات روغن سویا اشاره کردند. همچنین Verleyen و همکاران (۲۰۰۱) میزان تری‌گلیسریدها، دی و مونوگلیسریدها را در تقطیرات روغن سویا به‌ترتیب ۵/۳، ۲/۷۸ و ۲/۱ درصد و در تقطیرات روغن کلزا ۳، ۳/۸۵ و ۱/۴۲ درصد به‌دست آوردند. Durant و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که مونو و دی‌گلیسریدها اصلی‌ترین گلیسریدها در تقطیرات کلزا بوده که در طول تصفیهٔ شیمیایی از هیدرولیز تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها به‌دست می‌آیند و مقادیر آن را به میزان ۰/۴۶ و ۰/۴۱ درصد به‌دست آوردند.

**جدول ۲- ترکیب چربی‌های خنثی تقطیرات بوگیری روغن سویا**

| پارامتر | زمان بازداری (دقیقه) | غلظت (درصد/وزنی)* |
|---|---|---|
| استرهای زنجیر کوتاه | ۲/۵-۲/۸ | ۱۹/۰۰±۰/۹۰ |
| استرهای بلند زنجیر (واکس) | ۳/۴-۳/۸ | ۱۶/۱۴±۰/۳۰ |
| تری‌گلیسریدها | ۶/۸-۹/۲ | ۱/۴۰±۰/۰۹۰ |
| دی‌گلیسریدها | ۱۵/۲-۱۸/۲ | ۰/۷۰±۰/۰۱ |
| مونوگلیسریدها | ۲۷/۹-۲۸/۳ | ۰/۳۰±۰/۰۶ |
| اسیدهای چرب آزاد | ۱۲-۱۳/۹ | ۶۲/۴۶±۹/۰۰ |

*میانگین±انحراف معیار

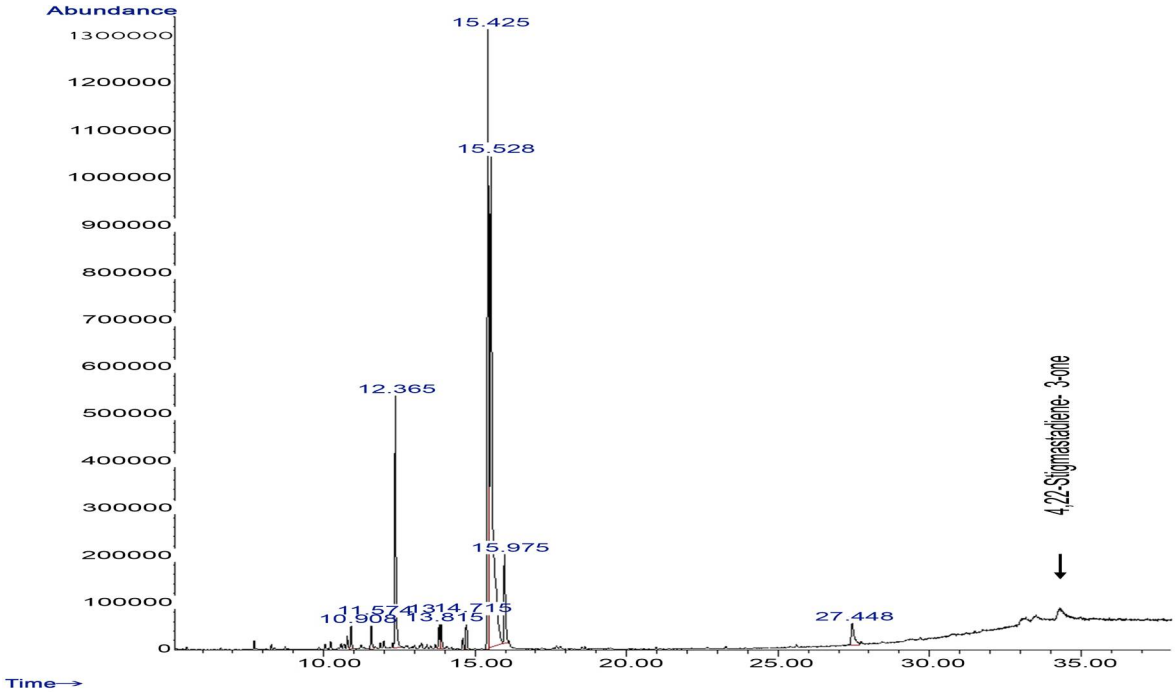



**شکل ۱- کروماتوگرام HPLC مربوط به چربی‌های خنثی در نمونهٔ تقطیرات بوگیری روغن سویا**

**اندازه‌گیری کیفی ترکیبات غیرقابل‌صابونی‌شونده SODD**

ترکیبات تقطیرات سویا در شکل (۲) نشان داده شده است. جداسازی و شناسایی ترکیبات مختلف، بعد از بهینه‌سازی برنامهٔ دمایی GC-MS (بررسی پروفایل دمایی و انتخاب بهترین برنامهٔ دمایی جهت خروج کامل ترکیبات و جداشدن کامل پیک‌ها) انجام شد. همان‌طورکه ملاحظه می‌شود آنالیت‌ها براساس تعداد اتم کربن به‌ترتیب ظاهر می‌شوند. اولین ترکیب خروجی اسکوآلن بود. ترتیب خروج ایزومرهای توکوفرول براساس افزایش تعداد گروه‌های متیل متصل به حلقهٔ کرومانول می‌باشد. ابتدا آلفا-توکوفرول و به‌دنبال آن ایزومر بعدی دی‌متیل توکول و گاما-توکوفرول خارج می‌گردد. همچنین کامپسترول، استیگما استرول و بتاسیتواسترول نیز بعد از پیک کلسترول ظاهر می‌شوند. پیک‌های نهایی نیز در کروماتوگرام مربوط به استرهای استریل هستند.

ترکیبات شناسایی‌شده، زمان بازداری نسبی[1] (زمان بازداری نسبی عبارت است از نسبت زمان بازداری هر ترکیب به زمان بازداری استاندارد داخلی) و انحراف استاندارد (۰/۲۵–۰/۰۵ درصد) در جدول (۳) آمده است.




**شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC-MS تقطیرات روغن سویا** (محور افقی نمودار زمان و محور عمودی فراوانی است)

**جدول ۳- ترکیبات مختلف SODD شناسایی‌شده توسط GC-MS در حضور کلسترول به‌عنوان استاندارد داخلی**

| ترکیب | زمان بازداری (دقیقه) | زمان بازداری نسبی | انحراف استاندارد (SD) |
|---|---|---|---|
| فیتول | ۱۰/۹ | ۰/۷۰ | ۰/۰۵ |
| لینولئیک اسید | ۱۱/۵۷ | ۰/۷۵ | ۰/۰۴ |
| اسکوالن | ۱۲/۳۶ | ۰/۸۰ | ۰/۲۵ |
| دلتا-توکوفرول | ۱۳/۸۱ | ۰/۸۹ | ۰/۱۲ |
| آلفا-توکوفرول | ۱۴/۷۱ | ۰/۹۵ | ۰/۱۰ |
| کلسترول (استاندارد داخلی) | ۱۵/۴۲ | ۱ | ۰/۱۳ |
| کامپسترول | ۱۵/۵۲ | ۱/۰۱ | ۰/۰۴ |
| استیگما استرول | ۱۵/۹۷ | ۱/۰۳ | ۰/۱۵ |
| بتا-سیتواسترول | ۲۷/۴۴ | ۱/۷۷ | ۰/۲۰ |

[1] Relative Retention Time (RRT)

**اعتبارسنجی روش و اندازه‌گیری کمّی**

آزمون بازیابی برای ارزیابی صحت روش انجام شد که به‌صورت درصدی از نمونهٔ بازیافت‌شده محاسبه گردید. آماده‌سازی نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد و میانگین بازیافت به‌دست‌آمده برای تقطیرات سویا بین ۹۰ تا ۹۶ درصد بود. تکرارپذیری روش که یکی از معیارهای تعیین میزان دقت است، طی ۱ روز و با استفاده از آنالیز ۵ تکرار از نمونه‌های تقطیرات شامل نمونه‌های فراصوت‌داده‌شده و استخراج‌شده موردبررسی قرار گرفت. انحراف استاندارد نسبی محاسبه‌شده برای ترکیبات شناسایی‌شده در تقطیرات بیشتر از ۲/۱۲ درصد نبود (انحراف استاندارد نسبی قابل‌قبول برابر یا کمتر از ۲۰ درصد است (Durant *et al.*, 2006). خطی‌بودن پاسخ سطح پیک‌ها در برابر غلظت‌ها با استفاده از روش آنالیز رگرسیون حداقل مربعات خطی به‌دست‌آمد (جدول ۴). مطالعه‌های اعتبارسنجی نشان‌دهندهٔ خطی‌بودن، صحت و دقت روش بود. بنابراین روش پیشنهادی می‌تواند به‌طور مؤثر برای تجزیه‌وتحلیل کمّی بخش صابونی‌ناشوندهٔ تقطیرات سویا به‌کار رود. منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری ترکیبات استفاده شد. حداقل ۵ محلول استاندارد از هر ترکیب موجود در تقطیرات بوگیری تهیه گشت و یک رگرسیون خطی توسط حداقل مربعات به‌کارگرفته شد. جهت تعیین رگرسیون خطی از محدودهٔ خطی دینامیک برای هر ترکیب استفاده گردید و معادلهٔ رگرسیون خطی برای تعیین غلظت‌ها به‌کارگرفته شد. نتایج به‌صورت درصدی از کل تقطیرات بوگیری بیان گردید. ضرایب همبستگی (r) برای تمام منحنی‌های استاندارد بیشتر از ۰/۹۹۶ بود.

**جدول۴- پارامترهای رگرسیون حداقل مربعات خطی و ضرایب همبستگی ($R^2$) منحنی‌های کالیبراسیون**

| ترکیب | M | b | $R^2$ |
|---|---|---|---|
| اکتاکوزان | ۱E-۵ | ۰/۰۲۲۸ | ۰/۹۹۶۵ |
| نوناکوزان | ۷E-۶ | ۰/۱۲۱۲ | ۰/۹۹۷۷ |
| آلفا-توکوفرول | ۱E-۵ | ۰/۰۴۷۱ | ۰/۹۹۸۱ |
| بتا-سیتواسترول | ۹E-۷ | ۰/۱۲۹ | ۰/۹۹۶۴ |

y=mx+b (y: غلظت (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و x: مساحت سطح پیک)

**ترکیبات صابونی‌ناشوندهٔ SODD**

میانگین آماری اندازه‌گیری‌های ترکیبات کم مقدار SODD توسط GC-MS در سه تکرار و با انحراف استاندارد نسبی آن در جدول (۵) آمده است. ضرایب همبستگی (r) برای تمام منحنی‌های استاندارد بیشتر از ۰/۹۹۶ بود. جداسازی بین ترکیبات مختلف (استرهای اسیدهای چرب، توکوفرول‌ها، استرول‌ها و هیدروکربن‌ها) با موفقیت انجام شد. نتایج نشان داد استرول‌ها به‌عنوان بخش مهمی از قسمت صابونی‌ناشونده در نمونهٔ تقطیرات ارزیابی‌شده هستند (۲۴/۳ درصد). ترکیب اصلی شناسایی‌شده در SODD، بتا-سیتواسترول بود که مقدار آن نسبت به سایر استرول‌ها بیشتر بود. این ترکیب به‌دلیل نقش مهمی که در کاهش میزان کلسترول خون و رشد تومورهای سرطانی دارد، موردتوجه می‌باشد. در تقطیرات روغن سویا تنها دو ایزومر از توکوفرول‌ها (آلفا و دلتا) یافت شدند که بتا-توکوفرول بیشترین مقدار را داشت (۷/۶ گرم در ۱۰۰ گرم). Dumont و Narine (۲۰۰۷) دو نوع توکوفرول (دلتا و گاما) به مقدار ۱/۹ درصد براساس جرم پایه را در SODD شناسایی کرده بودند. همچنین Verleyen و همکاران (۲۰۰۱) مقادیر بالاتری از توکوفرول‌ها به میزان ۷/۵ درصد را در SODD گزارش کردند.

**جدول ۵- ترکیبات SODD شناسایی‌شده توسط GC-MS به‌همراه انحراف استاندارد نسبی**

| ترکیب | SODD | |
|---|---|---|
| | گرم در ۱۰۰ گرم | *RSD (درصد) |
| فیتول | ۰/۰۲ | ۰/۳۸ |
| اتیل اولئات | ۰/۱۰ | ۰/۲۰ |
| اسید لینولئیک | ۰/۶۳ | ۰/۷۱ |
| هگزاکوزان | ۰/۱۲ | ۰/۶۶ |
| هپتاکوزان | ۰/۱۲ | ۰/۵۷ |
| اکتاکوزان | ۰/۰۸ | ۰/۱۳ |
| اسکوآلن | ۵/۹۰ | ۳/۰۰ |
| نوناکوزان | ۰/۰۱ | ۱/۲۰ |
| دلتا-توکوفرول | ۷/۶۰ | ۰/۱۱ |
| بتا-توکوفرول | --- | --- |
| گاما-توکوفرول | --- | --- |
| آلفا-توکوفرول | ۳/۶۴ | ۰/۱۴ |
| براسیکا استرول | --- | --- |
| استیگما استرول | ۵/۸ | ۰/۰۴ |
| کامپسترول | ۶/۸ | ۰/۱۹ |
| بتا-سیتواسترول | ۱۰/۷ | ۰/۰۴ |
| ۴و۲۲-استیگما استادی‌ان۳-وان | ۲/۴ | ۱/۱۲ |

* انحراف معیار استاندارد

بخش هیدروکربن تقطیرات شامل ۴ گروه اصلی (آلیفاتیک[1]، استروئیدال[2]، سسکوترپن[3] و تری‌ترپن (اسکوآلن)) هستند. هیدروکربن‌های آلیفاتیک اصلی در DOD روغن‌های گیاهی ۱۲ تا ۳۵ کربنه بوده و کاربردهای محدودی در مصارف انسانی دارند و بیشتر از جنبهٔ استفاده به‌عنوان منبع سوختی موردتوجه هستند (León-Camacho, Serrano, & Constante, 2004).

اسکوآلن به‌عنوان بخش هیدروکربن تقطیرات در مقادیر بالاتر (۵/۹ گرم در ۱۰۰ گرم) و به‌دنبال آن نوناکوزان (۰/۰۱ گرم در ۱۰۰ گرم) در تقطیرات سویا شناسایی شدند.

Gunawan و Ju (۲۰۰۹) در پژوهشی بیان کردند که ۳۰-۴۰ درصد بخش غیرقطبی DOD را هیدروکربن‌ها تشکیل می‌دهند. در مطالعهٔ Naz و همکاران (۲۰۱۴) اسکوآلن بیشترین مقدار هیدروکربن‌ها را در تقطیرات روغن کانولا داشت. ترکیبی به نام ۴و۲۲-استیگما استادی ان۳-وان[4] در SODD شناسایی شد که می‌تواند محصول دهیدروژناسیون استیگمااسترول و بتا-سیتواسترول طی فرایند بی‌بوکردن باشد. این ترکیب در پژوهش Naz و همکاران (۲۰۱۲) نیز در تقطیرات روغن کانولا و پالم و تحقیق Naz و همکاران (۲۰۱۴) در تقطیرات روغن آفتاب‌گردان گزارش شده بود. (León-Camacho و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که ۴و۲۲-استیگما استادی ان۳-وان هیدروکربن استروئیدال تولیدشده بعد از دهیدراسیون بتا-سیتواسترول است که به اتلاف آن در اثر دمای بالای بی‌بوکردن اشاره دارد.

## نتیجه‌گیری

تقطیرات بوگیری ویژگی‌ها، موارد مصرف و ارزش تجاری متفاوتی دارند به‌طوری‌که به‌کارگیری آنها امروزه به‌عنوان چالش بزرگ مطرح است. یکی از مزایای اصلی تجزیه‌وتحلیل بخش صابونی‌ناشوندهٔ تقطیرات بوگیری توسط GC-MS، جداسازی خوب ترکیبات مختلف موجود در آن و به‌دست‌آوردن یک نتیجهٔ قابل‌قبول با حداقل نیاز به آماده‌سازی نمونه و بدون استفاده از حلال‌های سمی و سرطان‌زا در مدت زمان قابل‌قبول می‌باشد. در این مطالعه بررسی شیمیایی تقطیرات روغن سویا انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که به‌دلیل حضور ترکیبات باارزش طبیعی مانند اسکوآلن، توکوفرول و فیتواسترول همچنین آسیل‌گلیسرول‌ها و اسیدهای چرب آزاد در مقادیر قابل‌توجه، DOD برای کاربردهای مختلف می‌تواند استفاده شود. بخش صابونی‌ناشوندهٔ آن در صنایع دارویی، بهداشتی و آرایشی به‌دلیل غنی‌بودن از مواد زیست‌فعال طبیعی و بخش صابونی‌شوندهٔ آن برای تولید سوخت زیستی به‌دلیل مقادیر زیاد اسیدهای چرب آزاد می‌تواند مورداستفاد قرار گیرد.

## منابع


AOCS. (1998). Official methods and recommended practices of the AOCS. In A. O. C. Society (Ed.): American Oil Chemists' Society. 5th edition (ed.D. Firestone).

Dumont, M.-J., & Narine, S. S. (2007). Characterization of flax and soybean soapstocks, and soybean deodorizer distillate by GC-FID. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 84*(12), 1101-1105. doi:https://doi.org/10.1007/s11746-007-1154-1

Durant, A. A., Dumont, M.-J., & Narine, S. S. (2006). In situ silylation for the multicomponent analysis of canola oil by-products by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta, 559*(2), 227-233. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.075

Estiasih, T., Ahmadi, K., Widyaningsih, T., Maligan, J., Mubarok, A. Z., Zubaidah, E., . . . Puspitasari, R. (2013). Bioactive compounds of palm fatty acid distillate (PFAD) from several palm oil refineries. *Advance Journal of Food Science and Technology, 5*(9), 1153-1159 .


[1] Aliphatic
[2] Steroidal
[3] Sesquiterpene
[4] 4,22-stigmastadiene-3-one

Gunawan, S., & Ju, Y. H. (2009). Vegetable oil deodorizer distillate: characterization, utilization and analysis. *Separation & Purification Reviews, 38*(3), 207-241. doi:https://doi.org/10.1080/15422110903095151

Jafarian Asl, P., Niazmand, R., & Sherazi, S. T. H. (2021). Rapid Determination of Bioactive Lipid-type Materials of Rapeseed Oil Deodorizer Distillate by GC-MS. *Research and Innovation in Food Science and Technology, 9*(4), 351-362. doi:http://doi.org/10.22101/JRIFST.2020.198661.1137

Kartha, A. (1953). The glyceride structure of natural fats. I. A technique for the quantitative determination of glyceride types in natural fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 30*(7), 280-282. doi:https://doi.org/10.1007/BF02671201

León-Camacho, M., Serrano, M. A., & Constante, E. G. (2004). Formation of stigmasta-3, 5-diene in olive oil during deodorization and/or physical refining using nitrogen as stripping gas. *Grasas y Aceites, 55*(3), 227-232. doi:https://doi.org/10.3989/gya.2004.v55.i3.170

Moreda, W., Pérez-Camino, M. d. C., & Cert, A. (2001). Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *Journal of chromatography A, 936*(1-2), 159-171. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01222-5

Naz, S., Sherazi, S., Talpur, F. N., Talpur, M. Y., & Kara, H. (2012). Determination of unsaponifiable constituents of deodorizer distillates by GC–MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 89*(6), 973-977. doi:https://doi.org/10.1007/s11746-011-2000-z

Naz, S., Sherazi, S. T. H., Talpur, F. N., Kara, H., Uddin, S., & Khaskheli, A. R. (2014). Chemical Characterization of Canola and Sunfl ower oil deodorizer distillates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 64*(2), 115-120. doi:https://doi.org/10.2478/pjfns-2013-0008

Sherazi, S. T. H., & Mahesar, S. A. (2016). Vegetable oil deodorizer distillate: a rich source of the natural bioactive components. *Journal of oleo science, 65*(12), 957-966. doi:https://doi.org/10.5650/jos.ess16125

Shimada, Y., Nakai, S., Suenaga, M., Sugihara, A., Kitano, M., & Tominaga, Y. (2000). Facile purification of tocopherols from soybean oil deodorizer distillate in high yield using lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 77*(10), 1009-1013. doi:https://doi.org/10.1007/s11746-000-0160-z

Shoaib, H., Mahesar, S. A., Jafarian, P., Niazmand, R., & Sherazi, S. T. H. (2019). Quality evaluation of canola oils and deodorizer distillate during industrial processing. *Journal of the Chemical Society of Pakistan, 41*(6), 983 .

Verleyen, T., Verhé, R., Garcia, L., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & De Greyt, W. (2001). Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. *Journal of chromatography A, 921*(2), 277-285. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00881-0

Yang, H., Yan, F., Wu, D., Huo, M., Li, J., Cao, Y., & Jiang, Y. (2010). Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate. *Bioresource technology, 101*(5), 1471-1476. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.019

# Chemical Analysis of Composition of Raw Soybean Oil Deodorized Distillates by GC-MS

**Parisa Jafarian Asl[1], Razieh Niazmand[2*], Moslem Jahani[3]**

1- PhD. Student, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
2- Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
* Corresponding author (r.niazmand@rifst.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

## Abstract

Deodorizer distillate is regarded as a waste material of the edible oil industries. It has intricate nature that consists of a valuable source of bioactive and nutritive compounds including phytosterols, tocopherols and squalene that are valuable economically. In this study instead of using sample pretreatments like saponification and derivatization, (using toxic solvents and tedious labor work) which are commonly utilized in previously published papers/manuscrpits, we used ultrasonic extraction of soybean deodorizer distillated with methanol, then centrifugation and the supernatant was directly injected into the GC-MS system. Optimization of the temperature profile of the oven was done to get a baseline separation of the different distillate components including, tocopherols, sterols, squalene. According to the results the most abundant compound in soybean distillate sample was phytosterols (22.5-24.3%). While concentration ranges for squalene and tocopherol were 5.9-6% and 10-11.24%, respectively. High amount of free fatty acids (62.46%) was detected and triacylglycerol was the main glycerides of distillate. The main glycerides of soybean distillate was triglycerides (1.4%). The present study exposed that the un-saponifiable fraction of deodorizer distillate could be employed after purification in drug, food and cosmetic industry because of its considerable amount of bioactive compounds.

**Keywords:** Gas chromatography, Soybean oil, Sterol, Tocopherol