

انتخاب استاندارد داخلی مناسب جهت تعیین بازدهی اینتراستریفیکاسیون روغن سویا به کمک مایکروویو

لیلا دهقان^۱، محمد تقی گلمکانی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲- دکتری، دانشیار، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۱۹)

چکیده

هدف از این تحقیق، انتخاب استاندارد داخلی مناسب جهت تعیین خلوص آلکیل استر روغن سویا به کمک کروماتوگرافی گازی بود. در این پژوهش، متیل استر اسیدهای چرب روغن سویا با روش اینتراستریفیکاسیون به کمک مایکروویو تولید شدند. متیل استر اسید مارگاریک و اسید بوتیریک به عنوان دو استاندارد داخلی و هر کدام در دو سطح ۱۰ و ۳۰ درصد (وزنی/وزنی) به متیل استرهای روغن سویا اضافه شدند. طبق نتایج کروماتوگرافی گازی، درصد خطا در غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ درصد به ترتیب ۸۵/۰۰ و ۱۱۳/۳۳ درصد برای اسید بوتیریک و به ترتیب ۰/۱۰ و ۶/۶۷ درصد برای متیل استر اسید مارگاریک بود. اگرچه استفاده از اسید بوتیریک به عنوان استاندارد داخلی در مقایسه با اسید مارگاریک دارای مزایایی نظیر صرفه‌جویی در زمان آماده‌سازی، کاهش مصرف مواد اولیه و هزینه نهایی می‌باشد، اما به دلیل قطبی بودن و وزن مولکولی پایین‌تر نمی‌تواند شاخص مناسبی برای روغن‌های حاوی اسیدهای چرب بلند زنجیر مانند روغن سویا باشد. اگرچه استفاده از اسید مارگاریک نیازمند انجام استریفیکاسیون است اما نتایج آن دقیق‌تر است. بنابراین، استفاده از متیل استر اسید مارگاریک به عنوان استاندارد داخلی جهت تعیین بازدهی اینتراستریفیکاسیون روغن سویا پیشنهاد می‌شود.

کلید واژگان: استاندارد داخلی، اینتراستریفیکاسیون، بازدهی، روغن سویا

* مسئول مکاتبات: golmakani@shirazu.ac.ir

۱- مقدمه

روغن سویا (*Glycine max*)، یکی از منابع مهم روغن خوراکی جهان است. روغن سویا به دلیل فراوانی، قیمت و ترکیب اسیدهای چرب مناسب، در مصارف غذایی مثل روغن سالاد و پخت‌وپز، روغن سرخ‌کردنی، مارگارین، شورتینگ، جایگزین‌های کم‌کالری و محصولات قنادی و لبنی کاربرد گسترده‌ای دارد [۱]. بعلاوه، در مصارف صنعتی نیز بسیار مورد استفاده قرار گرفته، به طوری که یکی از روغن‌های نباتی مهم برای تولید بیودیزل (Biodiesel) به شمار می‌رود [۲].

روغن‌ها و چربی‌ها مخلوطی از تری‌اسیل‌گلیسرول‌های مختلف بوده که وجود هر یک از این مولکول‌ها بر خواص عملکردی روغن‌ها اثرگذار است. نوع تری‌اسیل‌گلیسرول توسط ترکیب اسیدهای چرب و توزیع آن‌ها در ساختار مولکول تعیین می‌گردد. به کمک فرایند اینترآستریفیکاسیون می‌توان توزیع طبیعی اسیدهای چرب موجود در ساختار تری‌اسیل‌گلیسرول و خصوصیات فیزیکی روغن را تغییر داد. اگرچه این فرایند خصوصیات فیزیکی را تغییر می‌دهد، اما بر ترکیب اسیدهای چرب اولیه موجود در روغن موثر نبوده و تنها آرایش اسیدهای چرب موجود در ساختار تری‌اسیل‌گلیسرول را تغییر می‌دهد [۳]. در این واکنش، روغن در حضور کاتالیست با الکل کوتاه‌زنجیر نظیر متانول و اتانول واکنش داده و آلکیل‌استر و گلیسرول ایجاد می‌گردد. کاتالیست‌های اسیدی، بازی و آنزیمی برای این واکنش مناسب هستند. کاتالیست‌های بازی نظیر پتاسیم هیدروکسید و سدیم هیدروکسید، به دلیل قیمت مناسب و قابلیت دسترسی، از بقیه متداول‌تر می‌باشند [۱]. اینترآستریفیکاسیون کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی داشته و از آن به منظور بهبود ارزش تغذیه‌ای و یا خواص عملکردی روغن‌ها استفاده می‌شود. از جمله این کاربردها می‌توان تولید روغن‌های حاوی اسیدهای چرب خاص مثل روغن آفتابگردان با اولئیک اسید بالا، روغن قنادی و شورتینگ، مارگارین، غذای کودک، جایگزین‌های چربی شیر انسان، جایگزین‌های کره کاکائو، روغن‌های کم‌کالری و تغییر شکل کریستالی روغن‌ها را نام برد [۱]. تولید بیودیزل یکی از کاربردهای مهم این فرایند در صنایع شیمیایی بوده که از روغن‌های ضایعاتی مثل ضایعات رستوران‌ها و کارخانجات

به عنوان ماده اولیه استفاده شده و سوختی با ارزش اقتصادی بالا تولید می‌گردد [۴].

برای تعیین خلوص آلکیل‌استرهای حاصل از واکنش اینترآستریفیکاسیون و جداسازی آن‌ها از مونو، دی و تری‌اسیل‌گلیسرول‌هایی که وارد واکنش نشده‌اند، از دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده می‌گردد. به منظور تعیین مقدار کمی دقیق هر یک از اجزاء بدست آمده از دستگاه کروماتوگرافی، مقدار کاملاً مشخصی از ماده مناسب به عنوان استاندارد داخلی به نمونه اضافه شده و از طریق مقایسه سطح زیر پیک استاندارد داخلی با سطح زیر پیک اجزاء نمونه، خلوص آلکیل‌استر تولیدی تعیین می‌گردد [۵،۲]. استاندارد داخلی بایستی از لحاظ شیمیایی از جنس نمونه مورد آزمون بوده اما در نمونه اولیه وجود نداشته باشد. علاوه بر این، پیک‌های مربوط به اجزای نمونه اصلی نباید با پیک استاندارد داخلی تداخل داشته باشند. در عین حال، پیک استاندارد داخلی نیز نباید با فاصله زیادی از اجزای نمونه از ستون کروماتوگرافی خارج گردد [۶]. همچنین، ماده‌ای که به عنوان استاندارد داخلی به کار می‌رود بایستی به شکل خالص موجود بوده، پایداری خود را حفظ نموده، در طول جداسازی توسط دستگاه کروماتوگرافی تجزیه نشده و توسط شناساگر دستگاه قابل تشخیص باشد [۷].

جهت بررسی خلوص الکیل‌استر روغن‌ها می‌توان از اسیدهای چرب متیل‌استر شده با طول زنجیره کربنی متفاوت استفاده کرد [۶،۸]. با توجه به اینکه مارگاریک اسید $C_{17:0}$ (Heptadecanoic acid) بلند زنجیره بوده و نقطه جوش بالایی دارد، باید قبل از تزریق به متیل‌استر خود تبدیل گردد تا در دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شود [۹]. با توجه به کامل نبودن واکنش اینترآستریفیکاسیون، ممکن است خلوص اسید مارگاریک متیل‌استر تولیدی قابل محاسبه نباشد. همچنین، تولید متیل‌استر اسید چرب نیازمند زمان و هزینه می‌باشد. از آنجایی که اسید چرب کوتاه‌زنجیر اسید بوتیریک ($C_{4:0}$) نقطه جوش پایین داشته و برخلاف مارگاریک اسید، بدون نیاز به متیل‌استر شدن در دستگاه کروماتوگرافی گازی قابل شناسایی می‌باشد، به نظر می‌رسد بتوان با استفاده از اسید بوتیریک به عنوان استاندارد داخلی ضمن صرفه‌جویی در زمان و هزینه تولید، از خطای بازدهی اینترآستریفیکاسیون (خلوص اسید چرب متیل‌استر شده) نیز جلوگیری کرد [۱۱،۱۰].

۲-۴-۴- تفکیک فازهای ایجاد شده

برای جداسازی فازهای گلیسرول و متیل استر از قیف جداکننده (دکانتور) استفاده شد. به این صورت که مخلوط درون دکانتور ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در محیط ساکن باقی ماند تا دو فاز کاملاً از یکدیگر تفکیک شوند. در طول جداسازی درب دکانتور جهت جلوگیری از نفوذ رطوبت، بسته نگه داشته شد زیرا نفوذ رطوبت هر چند به میزان کم، خطر پلیمری شدن استر را افزایش می‌دهد. گلیسرول با چگالی بیشتر و رنگ قرمز در قسمت پایین و متیل استر ناخالص به رنگ زرد در قسمت بالای دکانتور قرار گرفت. با باز کردن شیر دکانتور فاز گلیسرول تا حد امکان خارج و سپس لایه مرزی با استفاده از سانتریفیوژ ($g \times 5000$)، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (جداسازی گردید).

۲-۴-۵- جداسازی الکل از متیل استر ناخالص

با توجه به اینکه نقطه جوش متانول ۶۵ درجه سلسیوس می‌باشد، نمونه‌ی بدست آمده از مرحله قبل درون بالن مخصوص متصل به کندانسور ریخته و به مدت نیم ساعت روی همزن مغناطیسی ۳۰۰ دور در دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد.

۲-۴-۶- جداسازی کاتالیست (آبشویی)

برای جداسازی کاتالیست باقیمانده در متیل استر تولیدی، از فرایند آبشویی به روش پاششی با آب مقطر ۶۰ درجه سلسیوس و حجم برابر با محصول نهایی استفاده گردید. نتیجه این مرحله، حل شدن کاتالیست در آب مقطر می‌باشد. به منظور جداسازی بهتر، این عمل درون لوله‌هایی با قطر کمتر از ۵ سانتیمتر انجام گرفت. نحوه افزودن آب درون لوله‌های حاوی متیل استر، تأثیر زیادی در جداسازی کاتالیست داشت. اگر افزودن آب با شدت بالا انجام می‌پذیرفت، حجم بالایی از متیل استرها صابونی می‌شدند و چنانچه با شدت پایین انجام می‌پذیرفت، جداسازی به خوبی انجام نمی‌گردید. جهت رسیدن به متیل استر خالص تر، آبشویی ۳ الی ۵ مرتبه و تا زمانی که آب خروجی شفاف بود، ادامه پیدا کرد. پس از پایان این مرحله، رنگ متیل استرهای تولیدی روشن تر گردید.

۲-۴-۷- خشک کردن

متیل استر تولیدی درون ارلن مایر ریخته و به کمک همزن مغناطیسی به مدت نیم ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و ۲۵۰ دور در دقیقه خشک شد.

گردید. بعد از توزین، متانول و کاتالیست درون ارلن مایر با یکدیگر مخلوط و درب ارلن با درپوش مناسب بسته و ارلن به مدت ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی با ۳۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا ترکیبات کاملاً همگن شوند.

۲-۴-۲- انجام واکنش

مخلوط کاتالیست و متانول به فلاسک حاوی روغن اضافه و در دستگاه مایکروویو (سامسونگ، مدل ME341DW، مالزی) قرار داده شد. با کمک مایکروویو در مقایسه با روش-های متداول، بازدهی بالاتر در زمان کوتاه‌تری به دست می‌آید و بدین ترتیب می‌توان در مصرف انرژی و زمان صرفه‌جویی کرد و ارزش اقتصادی محصول نهایی را افزایش داد [۱۶].

در این مطالعه، اینتراستریفیکاسیون روغن سویا به کمک دستگاه مایکروویو، در شرایط بهینه شامل نسبت مولی متانول به روغن ۹ به ۱ [۱۷]، غلظت پتاسیم هیدروکسید ۱ درصد [۱۸]، توان مایکروویو ۵۰۰ وات [۱۹] و زمان واکنش ۹ دقیقه [۲۰]، انجام شد تا واکنش اینتراستریفیکاسیون به طور کامل پیشرفت نماید. نمای کلی اینتراستریفیکاسیون به کمک دستگاه مایکروویو در شکل ۱ نشان داده شده است.

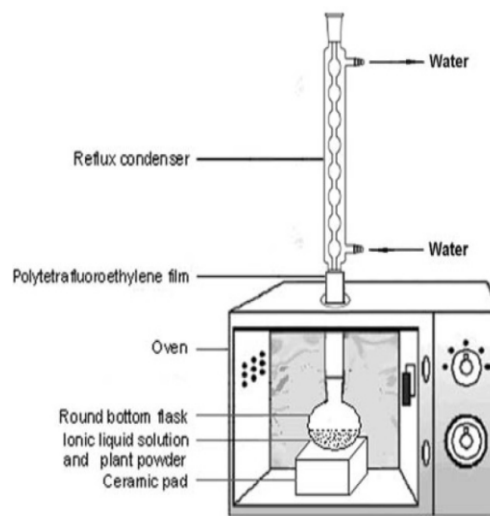


Fig 1 Microwave-assisted interesterification apparatus used in this study.

۲-۴-۳- کاهش دمای مخلوط

پس از تکمیل زمان واکنش، برای جلوگیری از پیشرفت واکنش برگشت، بالن حاوی واکنشگرها به سرعت درون ظرف حاوی آب سرد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد تا دمای مواد داخل ظرف با دمای محیط برابر شود.

۲-۴-۸- تعیین بازدهی و خلوص متیل استر نهایی

برای تعیین بازدهی وزنی، خلوص و بازدهی نهایی تولید متیل استر به ترتیب از معادله‌های (۴-۲) استفاده شد [۱۵،۲]. برای تعیین خلوص متیل استرها روغن سویا، از اسید بوتیریک و اسید مارگاریک به عنوان دو استاندارد داخلی در دو درصد مختلف استفاده گردید. اسید مارگاریک به دلیل زنجیره بلند ۱۷ کربنی و نقطه جوش بالا (۲۲۷ درجه سلسیوس) جهت خروج از ستون کروماتوگرافی، ابتدا از طریق روش استریفیکاسیون ذکر شده در بند ۲-۳ به متیل استر اسید مارگاریک تبدیل گردید. نقطه جوش متیل استر اسید چرب پایین‌تر از خود اسید چرب می‌باشد [۲۱]. بوتیریک اسید، ۴ کربنی و کوتاه زنجیر بوده و نقطه جوش پایینی (۱۶۳/۵ درجه سلسیوس) دارد و بدون نیاز به استریفیکاسیون، مستقیم به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. اسید بوتیریک و متیل استر اسید مارگاریک در سطوح ۱۰ و ۳۰ درصد (وزنی/وزنی) به متیل استرها روغن سویا اضافه و به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شدند. با تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی جداسازی صورت گرفته و اجزاء متیل استری شده به ترتیب در اثر تفاوت در نقطه جوش و قطبیت از ستون خارج و از مونو، دی و تری اسیل گلیسرول‌های با نقطه جوش بالا جداسازی شدند. با محاسبه سطح زیر پیک‌ها و کاربرد معادله (۳) خلوص محصول نهایی تعیین گردید [۵،۲].

معادله ۲:

= بازدهی وزنی (%)

$$100 \times (\text{جرم اولیه روغن در هر آزمایش (گرم)} / \text{جرم محصول تولیدی (گرم)})$$

معادله ۳:

= خلوص متیل استر (%)

$$100 \times (\text{وزن متیل استر} / \text{وزن استاندارد}) \times (\text{سطح زیر پیک}$$

استاندارد / سطح زیر پیک متیل استر)

معادله ۴:

= بازدهی نهایی تولید متیل استر (%)

$$100 / (\text{بازدهی وزنی} \times \text{خلوص متیل استر})$$

با محاسبه سطح زیر پیک‌ها، درصد متیل استرها تولیدی و استاندارد داخلی تعیین و با کاربرد معادله (۵) نسبت آن‌ها اندازه‌گیری گردید.

معادله ۵:

$$= \text{نسبت متیل استروغن سویا به استاندارد داخلی (استاندارد داخلی (\%)) / متیل استرتولیدی (\%)}$$

معادله ۶:

= خطا نسبت به مقدار واقعی (%)

$$100 \times (\text{درصد واقعی} / \text{درصد واقعی} - \text{نسبت متیل استروغن سویا به استاندارد داخلی})$$

۲-۵- بررسی آماری داده‌ها

آزمون‌ها در سه تکرار انجام و سپس میانگین و انحراف از استاندارد تکرارها، به کمک Microsoft Office Excel 2013 محاسبه گردید. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد، پس از آنالیز واریانس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم افزار SAS نسخه 9.1 استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی خصوصیات کیفی روغن سویا

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی روغن سویای اولیه در جدول ۱ نشان داده شده است که با یافته‌های Encinar و همکاران در سال ۲۰۱۲ در رابطه با ویژگی‌های روغن سویا مطابقت دارد [۲۲]. اینتراستریفیکاسیون تحت تاثیر خواص اولیه روغن قرار گرفته که در این میان درصد رطوبت و اسیدهای چرب آزاد عوامل کلیدی در بازدهی نهایی تولید متیل استر هستند. درصد اسیدهای چرب آزاد جهت اینتراستریفیکاسیون قلیایی باید کمتر از ۳٪ [۲۳] و درصد رطوبت کمتر از ۰/۵٪ باشد [۲۴]. نتایج آزمایش روغن اولیه نشان داد که روغن سویای مورد استفاده، ویژگی‌های لازم جهت شرکت در واکنش اینتراستریفیکاسیون را دارا بوده است.

Table 1 Physicochemical properties of soybean oil

Physicochemical property	Value
Free fatty acid (% as oleic acid)	0.63±0.06*
Acid value (mg KOH/g)	1.23±0.04
Density (15 °C)	0.923±0.012
Moisture content (%)	0.10±0.05
Kinematic viscosity (40 °C; mm ² /s)	32.30±0.12

*Mean ± SD (n = 3).

پیک حلال هگزان نیز مشاهده می شود که در استریفیکاسیون اسید مارگاریک به کار رفته است، اما از آنجایی که اسید بوتیریک بدون استریفیکاسیون به متیل استرهای روغن سویا اضافه گردیده حلال هگزان هم استفاده نشده است. بررسی نتایج حاصل از کروماتوگرام^۳ها نشان داد که سطح زیر پیک استاندارد داخلی اسید بوتیریک به سطح زیر پیک متیل استرهای روغن سویا در سطح ۱۰ درصد، نسبت ۱ به ۱۸/۵۰ و در سطح ۳۰ درصد، نسبت ۱ به ۶/۴۰ دارند. سطح زیر پیک متیل استر اسید مارگاریک به سطح زیر پیک متیل استرهای روغن سویا در سطح ۱۰ درصد، نسبت ۱ به ۹/۹۹ و در سطح ۳۰ درصد، نسبت ۱ به ۳/۲۰ را نشان دادند. مقایسه کروماتوگرام^۳ها و درصد خطای ناشی از هر یک از استانداردهای داخلی در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به این جدول و مقایسه سطح زیر پیک متیل استرهای روغن سویا با استانداردهای داخلی، در کاربرد هر دو نوع استاندارد، سطح ۳۰ درصد خطای بیشتری از سطح ۱۰ درصد ایجاد نمود. بنابراین، با توجه به اینکه وزن استاندارد داخلی در همه آزمایش^۳ها ثابت بوده است، هر چه وزن متیل استرهای روغن سویا که به استاندارد اضافه شده کمتر باشد، خطا نیز بیشتر می^۳گردد. با استفاده از اسید بوتیریک در هر دو سطح ۱۰ و ۳۰ درصد، درصد خطا نسبت به مقدار واقعی، خیلی بیشتر از متیل استر اسید مارگاریک بود. بنابراین، بر اساس نتایج حاصل، اگرچه کاربرد اسید مارگاریک به عنوان استاندارد داخلی مستلزم مرحله استریفیکاسیون می^۳باشد اما به دلیل بلند زنجیر بودن روغن سویا، استفاده از اسید مارگاریک که زنجیره کربنی مشابه اجزای روغن سویا دارد، مناسب^۳تر است. استفاده از اسید بوتیریک از نظر صرفه^۳جویی در زمان آماده^۳سازی، مصرف مواد اولیه و هزینه و کاهش خطای ناشی از استریفیکاسیون اسیدهای چرب، بهتر از اسید مارگاریک است، اما به دلیل قطبی بودن و وزن مولکولی پایین نمی^۳تواند شاخص مناسبی برای روغن بلند زنجیر سویا باشد. جهت جداسازی مناسب اسید بوتیریک در دستگاه کروماتوگرافی گازی به ستون^۳هایی با طول زیاد نیاز بوده و جداسازی آن در همه ستون^۳های کروماتوگرافی به راحتی امکان^۳پذیر نیست. متیل استر اسید مارگاریک در سطح ۱۰ درصد به دلیل کمترین درصد خطا نسبت به مقدار واقعی (۰/۱ درصد)، بهترین عملکرد را داشت.

۲-۳- ترکیب اسیدهای چرب موجود در روغن

سویا

ترکیب اسیدهای چرب موجود در روغن سویای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. عمده^۳ترین اسیدهای چرب آن، اسیدهای چرب غیراشباع اسید لینولئیک و اولئیک و اسید چرب اشباع اسید پالمیتیک هستند. ترکیب اسیدهای چرب منابع روغنی در کیفیت متیل استرهای نهایی و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن^۳ها موثر می^۳باشد [۲۵]. با توجه به این جدول و معادله (۱) وزن مولکولی روغن سویا (g/mol) ۸۷۳/۰۴۸ محاسبه گردید. از آنجایی که اسید بوتیریک و اسید مارگاریک در ترکیب اسیدهای چرب روغن سویا وجود ندارند، در نتیجه می^۳توان از آن^۳ها به عنوان استاندارد داخلی استفاده کرد.

Table 2 Fatty acid composition of soybean oil

Fatty acid	Value (%)
Palmitic acid	11.10±0.35*
Stearic acid	5.01±0.04
Oleic acid	4.64±0.70
Linoleic acid	52.79±0.12
α -Linolenic acid	6.46±0.08

*Mean \pm SD (n = 3).

۳-۳- تعیین بازدهی و خلوص متیل استر

روغن سویا

۱-۳-۳- تعیین بازدهی وزنی

پس از خلوص سازی متیل استرهای روغن سویا و اندازه^۳گیری جرم آن^۳ها، با استفاده از معادله (۲) بازدهی وزنی محصول ۹۵/۴۵ درصد محاسبه گردید. در تحقیق مشابهی بازدهی وزنی ۹۷/۹۰ درصد از اینتراستریفیکاسیون روغن بادام تلخ ایرانی بدست آمد [۱۵].

۲-۳-۳- تعیین خلوص متیل استر روغن سویا

جهت تعیین خلوص متیل استرهای روغن سویا، ابتدا کروماتوگرام^۳های بدست آمده از دو استاندارد داخلی مورد بررسی قرار گرفت. کروماتوگرام^۳ها در شکل ۲ آورده شده^۳اند که کروماتوگرام^۳های الف و ب، مربوط به کاربرد استاندارد داخلی اسید بوتیریک به ترتیب در سطوح ۱۰ و ۳۰ درصد و کروماتوگرام^۳های ج و د، مربوط به کاربرد استاندارد داخلی متیل اسید مارگاریک به ترتیب در سطوح ۱۰ و ۳۰ درصد می^۳باشند. در کروماتوگرام^۳های مربوط به اسید مارگاریک

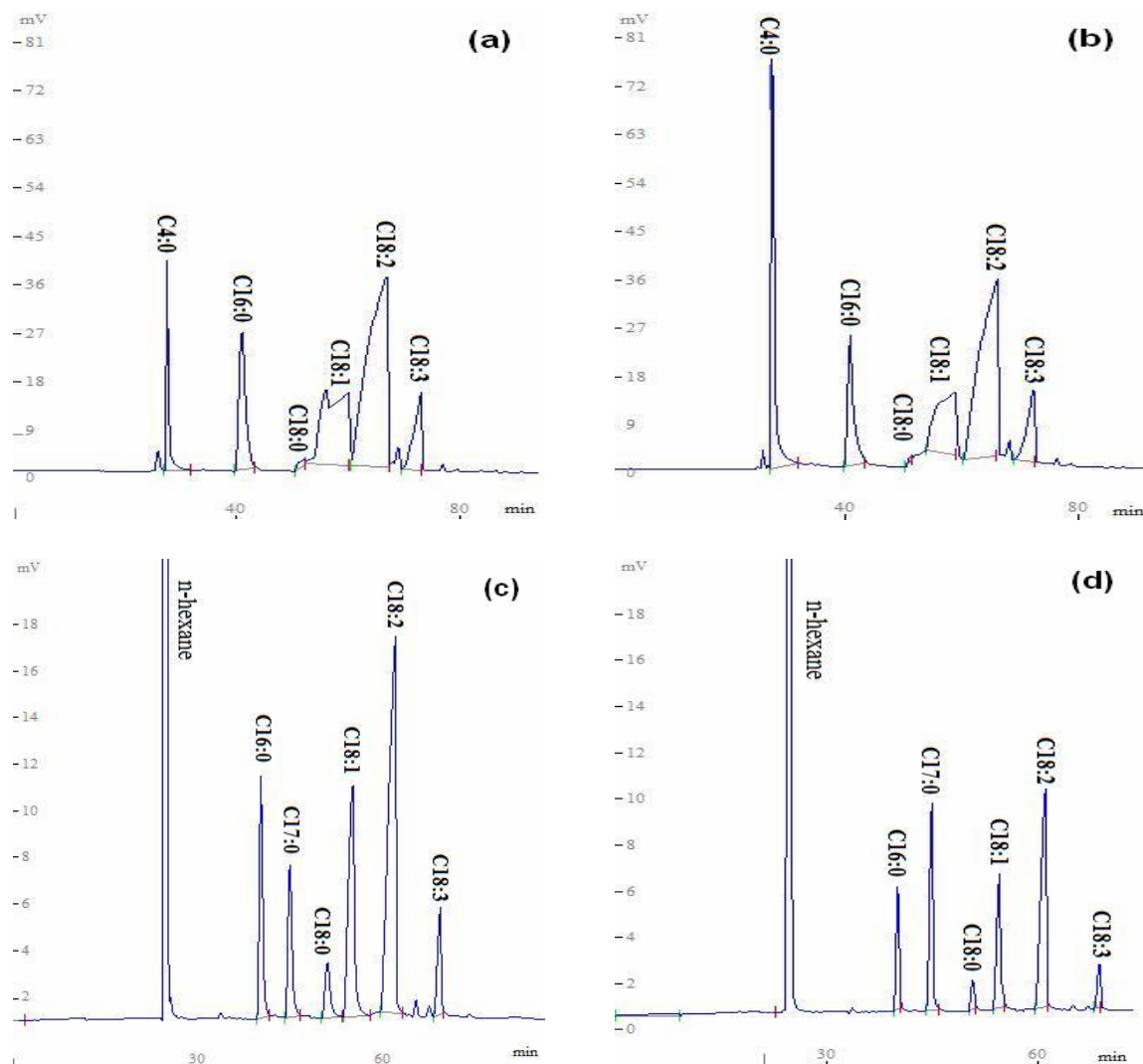


Fig 2 Chromatograms of soybean oil methyl esters; (a) Butyric acid 10 %, (b) Butyric acid 30%, (c) Margarinic acid 10%, and (d) Margarinic acid 30 %.

Table 3 Comparison of different internal standards in transesterification of soybean oil

Internal standard	Real value (%)	Soybean oil methyl esters (%)	Calculated internal standard (%)	Measured ratio	Error relative to real value
Butyric acid	10	94.87±0.16*	5.13±0.10	18.50	85.00 ^b
Butyric acid	30	86.49±0.20	13.51±0.20	6.40	113.33 ^a
Margarinic acid	10	90.90±0.08	9.10±0.18	9.99	0.10 ^d
Margarinic acid	30	76.21±0.11	23.79±0.20	3.20	6.67 ^c

*Mean ± SD ($n = 3$); in each column, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

حالی که در عمل بازدهی نهایی اینتراستریفیکاسیون در بهترین حالت ۱۰۰ درصد است. بنابراین با کاربرد اسید بوتیریک به عنوان استاندارد داخلی نمی‌توان خلوص و بازدهی را به طور دقیق محاسبه نمود اما با اضافه کردن متیل استر اسید مارگاریک به متیل استرهای روغن سویا، نسبت سطح زیر پیک استاندارد

خلوص و بازدهی نهایی متیل استرهای روغن سویا در جدول ۴ نشان داده شده است. با کاربرد استاندارد داخلی بوتیریک اسید، به دلیل اینکه سطح زیر پیک استاندارد بیشتر از مقدار واقعی بود، خلوص و بازدهی نهایی تولید متیل استر در هر دو سطح ۱۰ و ۳۰ درصد، بیشتر از ۱۰۰ درصد بدست آمد، در

سطح، در تعیین خلوص و بازدهی اینتراستریفیکاسیون روغن سویا خطای معنی دار ایجاد نکرد. Lin و همکاران در سال ۲۰۱۴ در اینتراستریفیکاسیون روغن پالم به کمک مایکروویو، از متیل استر اسید مارگاریک به عنوان استاندارد داخلی استفاده کردند و بازدهی % ۹۹/۷ بدست آوردند [۵].

و متیل استرها نزدیک به مقدار واقعی بدست آمد. با استفاده از استاندارد داخلی متیل استر اسید مارگاریک بین خلوص و بازدهی نهایی متیل استرهای روغن سویا در هر دو سطح ۱۰ و ۳۰ درصد، تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد که تأیید دیگری بر عملکرد مناسب تر اسید مارگاریک نسبت به اسید بوتیریک می باشد. کاربرد متیل استر اسید مارگاریک در هر دو

Table 4 Purity and final yield of soybean oil methyl esters

Property	Butyric acid		Margaric acid	
	10 %	30 %	10 %	30 %
Purity	190.36±0.25 ^{b*}	219.17±0.09 ^a	98.20±0.12 ^c	98.53±0.19 ^c
Final yield	181.70±0.18 ^b	209.20±0.31 ^a	93.73±0.48 ^c	94.05±0.27 ^c

*Mean ± SD (n = 3); in each column, mean values with different letters are significantly different (P < 0.05).

نداشتند که نشان دهنده عدم تأثیر اینتراستریفیکاسیون بر ترکیب اسید چرب روغن اولیه بود. در واقع اینتراستریفیکاسیون بر ترکیب اسیدهای چرب موجود در روغن بی تأثیر بوده و تنها از طریق تغییر آرایش اسیدهای چرب موجود در ساختار تری اسیل گلیسرول خواص روغن را تغییر می دهد [۳]. این نتایج با یافته های Alves و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد. آن ها نشان دادند که استفاده از استانداردهای داخلی مختلف در اینتراستریفیکاسیون، بر ترکیب اسیدهای چرب ذرت سیلاژ شده تأثیری ندارند [۲۶].

۳-۴- ترکیب اسیدهای چرب محصول نهایی

با استفاده از کروماتوگرام های حاصل از استانداردهای داخلی مختلف، ترکیب اسیدهای چرب موجود در متیل استرهای روغن سویا محاسبه و در جدول ۵ آورده شده است. بین درصد اسیدهای چرب موجود در متیل استرها، اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد. بنابراین، نوع و درصد استانداردهای داخلی بر ترکیب نهایی اسید چرب متیل استرهای روغن سویا و درجه اشباعیت محصول نهایی اثرگذار نبود. ترکیب اسیدهای چرب متیل استرهای تولیدی با روغن سویای اولیه تفاوتی

Table 5 Fatty acid composition (%) of soybean oil methyl esters

Fatty acid	Butyric acid		Margaric acid	
	10 %	30 %	10 %	30 %
Palmitic acid	11.51±0.63 ^{a*}	11.85±0.85 ^a	11.09±0.76 ^a	11.26±0.63 ^a
Stearic acid	5.10±0.88 ^a	5.36±0.69 ^a	5.43±0.95 ^a	5.32±0.17 ^a
Oleic acid	24.64±0.39 ^a	24.26±0.78 ^a	24.51±0.79 ^a	24.43±0.29 ^a
Linoleic acid	52.40±0.49 ^a	52.06±0.32 ^a	52.45±0.54 ^a	52.49±0.69 ^a
α-Linolenic acid	6.35±0.31 ^a	6.47±0.18 ^a	6.52±0.38 ^a	6.50±0.93 ^a

*Mean ± SD (n = 3); in each row, mean values with different letters are significantly different (P < 0.05).

حاصل، اگرچه استفاده از اسید بوتیریک از نظر صرفه جویی در زمان آماده سازی، مصرف مواد اولیه و هزینه بهتر از متیل استر اسید مارگاریک می باشد، اما به دلیل قطبی بودن و زنجیره کوتاه کربنی نمی تواند شاخص مناسبی برای روغن های نباتی بلند زنجیره مانند سویا باشد. استفاده از اسید مارگاریک نیازمند انجام استریفیکاسیون است اما به دلیل داشتن زنجیره کربنی مشابه اجزای روغن سویا، نتایج آن دقیق تر از اسید بوتیریک می باشد. بنابراین، استفاده از متیل استر اسید مارگاریک به

۴- نتیجه گیری کلی

با توجه به کاربرد وسیع اینتراستریفیکاسیون در صنعت روغن ها و چربی ها و همچنین شیمی تجزیه مواد غذایی، انتخاب استاندارد داخلی مناسب جهت تعیین خلوص الکیل استرهای حاصل از این واکنش از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این مطالعه، اثر طول زنجیره کربنی اسید بوتیریک و متیل استر اسید مارگاریک به عنوان دو استاندارد داخلی بر تعیین خلوص و بازدهی متیل استر روغن سویا بررسی شد. بر اساس نتایج

- Chemists' Society, 5th ed. USA, AOCS Press, Champaign, Illinois.
- [13] ASTM. 2013. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Distillate Fuels. ASTM D6751-12.
- [14] Golmakani, M. T., Rezaei, K., Mazidi, S., and Razavi, S. H. 2012. Effect of alternative C2 carbon sources on the growth, lipid, and γ -linolenic acid production of *Spirulina (Arthrospira platensis)*. *Food Science and Biotechnology*, 21: 355-363.
- [15] Atapour, M., and Kariminia, H. R. 2011. Characterization and transesterification of Iranian bitter almond oil for biodiesel production. *Applied Energy*, 88: 2377-2381.
- [16] Wahidin, S., Idris, A., and Muhamad Shaleh, S. R. 2014. Rapid biodiesel production using wet microalgae via microwave irradiation. *Energy Conversion and Management*, 84: 227-233.
- [17] Lin, Y., Yang, P., Chen, S., and Lin, J. 2013. Improving biodiesel yields from waste cooking oil using ionic liquids as catalysts with a microwave heating system. *Fuel Processing Technology*, 115: 57-62.
- [18] Georgogiannia, K. G., Kontominasa, M. G., Pomonisa, P. J., Avlonitisb, D., and Gergis, V. 2008. Conventional and in situ transesterification of sunflower seed oil for the production of biodiesel. *Fuel Processing Technology*, 89: 503-509.
- [19] Sajjadi, B., Abdul Aziz, A. R., and Ibrahim, S. 2014. Investigation, modelling and reviewing the effective parameters in microwave-assisted transesterification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 37: 762-777.
- [20] Azcan, N., and Yilmaz, O. 2013. Microwave assisted transesterification of waste frying oil and concentrate methyl ester content of biodiesel by molecular distillation. *Fuel*, 104: 614-619.
- [21] Golmakani, M. T., Mendiola, J. A., Rezaei, K., and Ibáñez, E. 2012. Expanded ethanol with CO₂ and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in γ -Linolenic Acid from *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). *Journal of Supercritical Fluids*, 62: 109-115.
- [22] Encinar, J. M., González, J. F., Martínez, G., Sánchez, N., and Pardal, A. 2012. Soybean oil transesterification by the use of a microwave flow system. *Fuel*, 95: 386-393.
- عنوان استاندارد داخلی جهت تعیین بازدهی اینتراستریفیکاسیون روغن‌های نباتی مناسب می‌باشد.
- ### ۵- منابع
- [1] Shahidi, F. 2005. *Bailey's industrial oil and fat products*, 6th ed. New Jersey, USA, John Wiley & Sons Inc. Publication.
- [2] Hsiao, M. C., Lin, C. C., Chang, Y. H., and Chen, L. C. 2010. Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil. *Fuel*, 89: 3618-3622.
- [3] O'Brien, R. D. 2009. *Fats and Oils: Formulating and processing for applications*, 3th ed. New York, London, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- [4] Gui, M. M., Lee, K. T., and Bhatia, S. 2008. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, 33: 1646-1653.
- [5] Lin, Y., Hsu, K., and Lin, J. 2014. Rapid palm-biodiesel production assisted by a microwave system and sodium methoxide catalyst. *Fuel*, 115: 306-311.
- [6] Nielsen, S. S. 2009. *Food analysis*, 4th ed. West Lafayette, USA, Springer.
- [7] <http://www.chromatographyonline.com/when-should-internal-standard-be-used>, 2012.
- [8] Liu, X., He, H., Wang, Y., Zhu, SH., and Piao, X. 2008. Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst. *Fuel*, 87: 216-221.
- [9] Jong, R., and Suijker, R. 2012. GC analysis of biodiesels: compliance with international standards using a single system. American Laboratory. www.paclp.com/content/documents/Press_Articles/ALM_October2012_web.pdf
- [10] Ruppel, T., and Huybrighs, T. 2008. Fatty acid methyl esters in B100 biodiesel by gas chromatography (modified EN 14103). PerkinElmer, Inc., USA.
- [11] Wychen, S. V., Ramirez, K., and Laurens, L. M. L. 2015. Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by *in situ* transesterification laboratory analytical procedure (LAP). The National Renewable Energy Laboratory (NREL). www.nrel.gov/publications.
- [12] AOCS. 2000. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil*

- rotatable design (CCRD). *Fuel*, 89: 1172-1176.
- [25] Knothe, G. 2009. Improving Biodiesel Fuel properties by modifying fatty Esters composition. *Journal of Energy & Environmental Science*, 10: 1039-1054.
- [26] Alves, S. P., Cabrita, A. R., Fonseca, A. J., and Bessa, R. J. 2009. Effect of a purification step and the type of internal standard used on fatty acid determination of grass and maize silages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22: 10793-10797.
- [23] Dorado, M. P., Ballesteros, E., de Almeida, J. A., Schellert, C., Löhrlin, H. P., and Krause, R. 2002. Transesterification of karanja (*Pongamia pinnata*) oil by solid basic catalysts. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 45: 525-529.
- [24] Cavalcante, K. S. B., Penha, M. N. C., Mendonça, K. K. M., Louzeiro, H. C., Vasconcelos, A. C. S., Maciel, A. P., de Souza, A. G., and Silva, F. C. 2010. Optimization of transesterification of castor oil with ethanol using a central composite

Selection of proper internal standard for determining microwave-assisted interesterification yield of soybean oil

Dehghan, L.¹, Golmakani, M. T.^{2*}

1. MSc, Graduated from Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

2. PhD, Associate Professor of Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University

(Received: 2015/08/09 Accepted:2017/10/11)

The objective of this study was selection of appropriate internal standard for determining the purity of soybean oil alkyl esters using gas chromatography. In this study, soybean oil fatty acid methyl esters were produced by microwave-assisted interesterification method. Margaric acid methyl ester and butyric acid were added as internal standards in the ratios of 10 and 30 percent (w/w) of soybean oil methyl esters. According to gas chromatography results, error percent at the concentrations of 10 and 30 percent were respectively 85.00 and 113.33 percent for butyric acid and respectively 0.10 and 6.67 percent for margaric acid methyl ester. Although, using butyric acid as an internal standard had some advantages such as preparation time saving and less raw materials consumption and final cost in comparison with margaric acid, but according to butyric acid polarity and lower molecular weight, it cannot be used as a good indicator for oils containing long-chain fatty acids such as soybean oil. Although, using margaric acid requires interesterification, but the results are more reliable. Therefore, using margaric acid methyl ester as an internal standard is proposed for determining the interesterification yield of soybean oil.

Keywords: Internal standard, Interesterification, Yield, Soybean oil

* Corresponding Author E-Mail Address: golmakani@shirazu.ac.ir