Utjecaj kultivara na sterole sojinog ulja

Bosotin, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:812374

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Matea Bosotin
6431/PT

UTJECAJ KULTIVARA NA STEROLE SOJINOG ULJA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija ulja i masti
Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Dubravka Škevin*

Zagreb, 2016

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

UTJECAJ KULTIVARA NA STEROLE SOJINOG ULJA

Matea Bosotin, 6431/PT

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti udio i sastav sterola u sojinom ulju. Koristili smo 11 uzoraka sjemena različitih kultivara soje, uzgojenih 2015. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Ulje je proizvedeno ekstrakcijom po Soxhletu uz heksan kao organsko otapalo. Udio i sastav sterola smo odredili metodom plinske kromatografije. Udio ukupnih sterola u uzorcima sojinog ulja je u rasponu od 3211 do 5162 mg/kg, dok je najzastupljeniji sterol u svim uzorcima β-sitosterol. U ulju su, također, detektirani kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ5-avenasterol, Δ7-stigmasterol i Δ7-avenasterol.

Ključne riječi: soja, sojino ulje, steroli, plinska kromatografija
Rad sadrži: 26 stranice, 9 slika, 1 tablica, 25 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: Izv.prof.dr.sc. *Dubravka Škevin*
Pomoć pri izradi: Dr.sc. *Marko Obranović, viši asistent*
Rad predan: srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

EFFECT OF SOYBEAN CULTIVARS ON STEROLS IN SOYBEAN OIL

Matea Bosotin, 6431/PT

Abstract: The aim of this study was to determine sterols content and composition in crude soybean oil. We used 11 seed samples of different soybean cultivars grown on the experimental fields of the Faculty of Agriculture in Zagreb in 2015. Oil was produced by the Soxhlet extraction, using hexane as an organic solvent. We determined sterols content and composition using the method of gas chromatography. Content of overall sterols in samples of soybean oil are within range between 3211 and 5162 mg kg^{-1}, while the most common sterol in all samples is β-sitosterol. Other sterols detected in oil were campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ5-avenasterol, Δ7-stigmasterol and Δ7-avenasterol.

Keywords: soybean, soybean oil, sterols, gas chromatography
Thesis contains: 26 pages, 9 figures, 1 table, 25 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *Ph.D. Dubravka Škevin, Associate professor*
Technical support and assistance: *PhD Marko Obranović, Scietific Assisstent*
Thesis delivered: July 2016.

SADRŽAJ

1.UVOD....1
2. SOJA....2
2.1. SOJINO ULJE....3
3. STEROLI....4
3.1. UTJECAJ NA ZDRAVLJE....5
3.2. INDIKATORI PATVORENJA ULJA....6
3.3. PLINSKA KROMATOGRAFIJA....6
4. EKSPERIMENTALNI DIO....10
4.1. ODREĐIVANJE UDJELA I SASTAVA STEROLA....10
5. REZULTATI....16
6. RASPRAVA....18
7. ZAKLJUČCI....23
8. LITERATURA....24

1.UVOD

Soja je jedna od dominantnih biljaka u svjetskoj proizvodnji. Prvenstveno se uzgaja zbog proteina, ali služi i kao sirovina za proizvodnju ulja. Sojino ulje se najčešće proizvodi ekstrakcijom organskim otapalom. Takav postupak, za razliku od prešanja, povećava iskorištenje procesa i ekonomski je isplativije, s obzirom na udio ulja u soji. Sačma, koja zaostaje nakon ekstrakcije, služi kao sirovina za prehranu ljudi i stoke.

Sojino ulje bogato je polinezasićenim masnim kiselinama, od kojih se ističe linolna kiselina. Negliceridni dio sojinog ulja čine, uz tokoferole, fosfolipide, pigmente i skvalene, najznačajnijim dijelom i steroli. Steroli su prirodni spojevi iz grupe steroida koji često služe za identifikaciju patvorenja ulja, te pozitivno utječu na ljudsko zdravlje.

Cilj ovog rada bio je odrediti udjel i sastav sterola u sojinom ulju dobivenog ekstrakcijom po Soxhletu. Kao materijal je korišteno 11 uzoraka sjemena različitih kultivara soje uzgajanih 2015. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima sojinog ulja korištena je propisana metoda plinske kromatografije.

2. SOJA

Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) je jedna od najstarijih uzgajanih biljaka. Kultivacija soje je započela u južnoj Aziji (Pratap, 2016) te se počela širiti po cijelom svijetu. Kao ratarska kultura uzgaja se više od 4000 godina, te je kroz duga stoljeća postala glavni izravni izvor hrane narodima Dalekog Istoka (Vratarić i Sudarić, 2000). Danas je uzgoj soje u najvećoj mjeri koncentriran u samo četiri zemlje – Sjedinjene Američke Države, Brazil, Argentina i Kina. Proizvodnja u ovim zemljama čini oko 90 % svjetske proizvodnje soje (Pratap, 2016). Počeci sijanja soje u Hrvatskoj datiraju od 1970. godine, dok se značajnija proizvodnja razvila krajem 80-ih godina prošlog stoljeća (Duvnjak, 2004).

Soja pripada porodici leguminoza (lat. *Leguminosae*). Jednogodišnja je, uspravna i granata biljka čija morfološka svojstva variraju, ovisno o sorti i vanjskim čimbenicima (Vratarić i Sudarić, 2000). Grmolika stabljika soje može narasti od 20 do 180 cm u visinu, a čvrst i jak razgranati korijen može ući u zemlju i do 2 m. Cvjetovi soje, kao i cvjetovi ostalih leguminoza, bijele su do blijedo ljubičaste boje (Pratap,2016). Listovi soje su jednostavne građe te su prekriveni dlačicama, kao zaštitom od suše. Plod soje je mahuna, slična grašku, koja sadrži jedno do pet zrna. Zrno soje je, ovisno o sorti, različitog oblika, veličine i boje. Prema obliku varira od okruglog do spljoštenog, dok boja sjemenske ljuske varira između žute, zelene, smeđe i crne. Za preradu je najpoželjnija žuta boja zrna (Vratarić i Sudarić, 2000).

Važnost soje proizlazi iz kakvoće njenog zrna (visok udio ptoriena i ulja), pa je jedna od značajnijih proteinskih i uljnih kultura u svijetu. Zrno soje sadrži 35-50 % proteina te 18-24 % ulja, ovisno o sorti i uvjetima uzgoja. Soja je jedna od najiskoristivijih ratarskih kultura jer se koristi u razne svrhe i kod prerade može biti iskorištena 100 %. Kvalitetom proteina, i visokim udjelom ulja, soja je kvalitetan nadomjestak mesu i njena proizvodnja u svijetu raste. Globalne procjene tvrde: *Soja je danas glavna hrana u svijetu, a sutra će biti još i više* (Vratarić i Sudarić, 2000).



Slika 1. Mahune i zrna soje (Anonymous 1, 2016)

2.1. SOJINO ULJE

Sojino ulje je, prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 41/12), ulje dobiveno iz sjemena soje (Glycine max (L.) Merr.). Ovisno o udjelu ulja u sjemenu, sojino ulje se može ekstrahirati mehaničkim prešanjem ili ekstrakcijom organskim otapalom. Za eksperimentalni dio ovog rada proizveli smo sojino ulje ekstrakcijom po Soxhletu uz heksan kao organsko otapalo.

Sojino ulje se sastoji od trigliceridnih i neglicerdinih spojeva. Udio triacilglicerola u sojinom ulju je od 94 do 99 %, dok ostatak čine negliceridni spojevi (1-6 %). Dominantne masne kiseline u sojinom ulju su linolna i oleinska masna kiselina. Negliceridne komponente sojinog ulja uključuju fosfolipide, tokoferole, pigmente, skvalene i sterole. Prema Hammondu (2005) udio fosfolipida u ukupnoj negliceridnoj fazi je 3,7%, tokoferola 8,5 %, a sterola 16 %. Dominantni tokoferol je gama tokoferol, dok je dominantni sterol β-sitosterol.



Slika 2. Sojino sjeme i sojino ulje (Anonymous 2, 2016)

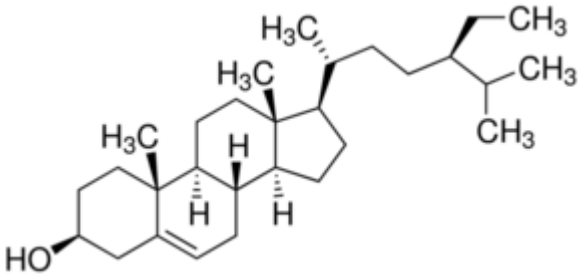
3. STEROLI

Steroli (steroidni alkoholi) se nalaze u skupini najistaknutijih bioloških spojeva, tzv. steroida. Po kemijskom sastavu, steroli su visokomolekularni ciklički alkoholi, derivati ciklopentanofenantrena. Zajednička strukturna karakteristika sterola je tetraciklički prstenasti sustav, odnosno fenantrenska skupina koju čine tri prstena cikloheksana i jedan prsten ciklopentana (Škevin, 2016).

Prekursor u biosintezi sterola je triterpen skvalen, koji nastaje biosintezom iz manjih terpenoida koji potječu iz acetatnih jedinica (Pine, 1994).

Najraširenij sterol u životinjskim mastima, tzv. zoosterol, je kolesterol. Rijetko se nalazi u biljkama, premda je blisko srodan stigmasterolu koji je važan sastojak biljaka. Prekursor je mnogih drugih steroida, kao što su muški i ženski spolni hormoni (Pine, 1994).

S druge strane, fitosteroli se nalaze u višim biljkama. Dijele su u dvije skupine: sterole koji imaju dvostruku vezu u sterolnom prstenu, i stanole, koji dvostruku vezu u sterolnom prstenu nemaju. Kemijski gledano, fitosteroli se jako malo razlikuju od kolesterola. Jedina razlika je u bočnome lancu gdje se događa adicija jednog ili dva ugljikova atoma na C24 i ta alkilna grupa na C24 je karakteristična za sve fitosterole (Beck, 2007). Većina fitosterola su spojevi koji se sastoje od 28-30 C atoma i od jedne do dvije dvostruke ugljikove veze. Najčešće se jedna dvostruka veza nalazi u sterolnoj jezgri, a druga u bočnome lancu (Ohyama, 2008). Do sada je identificirano oko 250 različitih fitosterola od kojih su najčešći kampesterol, β-sitosterol i stigmasterol. U sojinom ulju dominantan je β-sitosterol.



Slika 3. Struktura β-sitosterola (Anonymous 3, 2016)

U eukariotskim stanicama, steroli reguliraju biološke procese i održavaju strukturu staničnih membrana. Kolesterol se nalazi u animalnim membranama u visokoj koncentraciji. Mozak kralježaka sadrži 25 % svog slobodnog kolesterola u organizmu, te je kolesterolom najbogatiji organ. Kolesterol čini 2 % svih živčanih stanica u organizmu kralježaka. Imaju jako važnu ulogu u osiguravanju mehaničke potpore i organizacije membrani, te u kontroliranju rada membranskih proteina (Rog, 2009). Kolesterol regulira propusnost membrane ovisno o temperaturi, te određuje stupanj propusnosti fosfolipidnog dvosloja za molekule topive u vodi. Svojim "umetanjem" kolesterol, pri nižim temperaturama, sprječava čvrsto povezivanje fosfolipida, odnosno povećava fluidnost membrane. S druge strane, pri višim temperaturama, onemogućuje kretanje fosfolipida čime se povećava čvrstoća membrane, odnosno smanjuje fluidnost membrane. Kod biljaka fitosteroli, slično kao i kod životinja kolesterol, reguliraju propusnost membrana ovisno o temperaturi.

3.1. UTJECAJ NA ZDRAVLJE

Fitosteroli značajno utječu na smanjenje apsorpcije LDL kolesterola (engl. low density lipoprotein) u organizmu, što direktno utječe na smanjenje oboljenja od ateroskleroze. Kada se poremeti metabolizam kolesterola, odnosno kada se u organizmu nakupi toliko kolesterola da ga lipoproteini velike gustoće (HDL), koji njegov suvišak nakupljaju na sebe, više ne mogu prihvatiti, nagomilava se LDL kolesterol na stijenkama arterija i stvaraju se zadebljanja koja uzrokuju aterosklerozu i druge krvožilne bolesti. Znanstvenici se slažu kako se unosom 2 g sterola/stanola po danu, reducira LDL kolesterol i do 10 %. Međutim, dokazano je kako je takva redukcija kratkotrajna (Bard, 2015).

Fitosteroli, također, smanjuju rizik od nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Rezultati kliničkih istraživanja pokazali su da je već 10%-tnim smanjenjem LDL kolesterola moguće smanjiti rizik od nastanka kardiovaskularnih oboljenja za čak 20%.

Istraživanja su pokazala da fitosteroli smanjuju rizik od raka debelog crijeva, raka dojke i raka prostate. Fitosteroli, čini se, ometaju napredak tumora, tako što djeluju na hormone rasta endokrinih tumora i usporavaju stanični ciklus tumora (Caballero, 2016). Također, fitosteroli iz afričke šljive blagotvorno djeluju na benignu hiperplaziju prostate

(BPH), dobroćudno povećanje prostate uobičajeno za muškarce iznad 50 godina. Naime, fitosteroli, djelatne tvari ekstrakta kore afričke šljive, inhibiraju djelovanje enzima 5-alfa–reduktaze koji metabolizira testosteron u dihidroksitestosteron. S obzirom da je dihdrotestosteron glavni uzročnik rasta prostate, na taj način se rješavaju tegobe benigne hiperplazije prostate, a posljedično i svi problemi urogenitalnog trakta povezani s prostatom. Između ostalog, steroli pokazuju izrazitu antioksidacijsku aktivnost (Jena, 2016).

3.2. INDIKATORI PATVORENJA ULJA

Analitički parametri koji se koriste za provjeru autentičnosti ulja su, uz sastav masnih kiselina i triglicerida, tokoferola, tokotrienola, i sastav sterola. Steroli u ulju predstavljaju „otisak prsta“, jer su sastav i količina sterola specifični za svaku pojedinu vrstu ulja.

Patvorenje ulja je protuzakonito, oštećuje potrošače i šteti imidžu proizvoda. Da li je neko ulje patvoreno, moguće je odrediti raznim analitičkim parametrima. Kromatografskim metodama određivanja sterola moguće je dokazati da se u neko ulje dodalo drugo ulje, i to u vrlo malim količinama. Određivanje sterola se smatra najpotpunijom metodom za određivanje patvorenja ulja (Mandl, 1999).

3.3. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

U ovom radu određivali smo udjel i sastav sterola u sojinom ulju metodom plinske kromatografije.

Plinska kromatografija (GC) je jedna od najraširenijih analitičkih metoda. Prednosti poput brze analize, visoke rezolucije i mogućnosti razdvajanja, velike osjetljivosti detektora, mogućnosti određivanja vrlo malih koncentracija, potrebne male količine uzorka za analizu, pouzdanosti te ekonomske isplativosti, čine plinsku kromatografiju popularnom metodom.

GC se najčešće koristi za određivanje hlapljivih organskih komponenti. Također se može koristiti i za određivanje komponenti koje nisu u plinovitom stanju na temperaturi određivanja, ali se takve komponente moraju pripremiti kako bi zadovoljile taj preduvjet.

Kako bi došlo do razdvajanja komponenti plinskom kromatografijom, komponente moraju biti stabilne pri povišenim temperaturama te imati tlak para oko 0,1 Torr-a (13,33 Pa) na temperaturi određivanja. Do razdvajanja komponenti dolazi zbog njihove različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Komponenta koja se slabije otapa u stacionarnoj fazi, a bolje u mobilnoj fazi, brže će putovati kroz kromatografski sustav i pojaviti se kao pik na kromatogramu (Lingerman, 2012).

Plinski kromatograf sastoji se od nekoliko glavnih komponenti: injektora (za unošenje uzorka), kolone, detektora te termostata (koji sprječava pregrijavanje kolone), a cijeli sustav je spojen na kompjuterski sistem.

Analiza započinje unošenjem male količine uzorka u injektor, zagrijan na zadanu temperaturu, koji raspline uzorak i miješa ga s mobilnom fazom na početku kolone postavljene u termostatirani prostor. Na kraju kolone mobilna faza s odijeljenim analitom prolazi kroz detektor.

Mobilna faza je plin nosioc koji mora biti kemijski inertan (He, Ar, N_2 ili H_2) prema komponentama i prema stacionarnoj fazi, a izbor ovisi o detektoru. Na dovod plina nositelja postavljaju se regulatori tlaka, ventili i mjerači protoka. Regulatorima tlaka regulira se brzina protoka mobilne faze (Skoog, 2007).

Injektiranje uzorka se vrši pomoću šprice. Prilikom injektiranja moguće je koristiti split ili splitless način analize. Splitless injektiranje je način kada svu količinu injektiranog uzorka unosimo u kolonu, dok kod split načina injektiranja samo zadani dio injektiranog uzorka unosimo na kolonu. Split injektiranje koristi se kod tekućih uzoraka zbog povećanja volumena uzorka prilikom prelaska u plinovito stanje i produženje vremena uvođenja uzorka u kolonu. Način injektiranja ovisi o vrsti spojeva koji se određuju te o vrsti kolone (Lingerman, 2012).

Kolona je glavni dio GC-a. Za razdvajanje spojeva u koloni mogu se koristiti punjene i kapilarne kolone. Punjene kolone su izrađene od staklenih, metalnih ili teflonskih cijevi, a

punjene su sitnozrnatim punilom ili čvrstim nosačem na koji je nanesen tanki sloj stacionarne tekuće faze (Skoog, 2007). Danas se najčešće koriste kapilarne kolone koje se razlikuju prema vrsti stacionarne faze (krutina, tekućina ili tekućina nanesena na čvrsti nosač) te dimenzijama kolone (duljina i debljina kolone, debljina filma stacionarne faze u koloni). Do razdvajanja komponenata na koloni dolazi zbog razlike u polarnosti molekula te zbog razlike u veličini i obliku molekula. Komponente se rasporede između mobilne i stacionarne faze ovisno o konstantama topljivosti pojedine komponente u stacionarnoj, odnosno u mobilnoj fazi. Topljivost pojedine komponente uvjetovana je temperaturom.

Kolona se zagrijava, te kada se postigne određena temperatura dolazi do otpuštanja komponente sa stacionarne faze i ona, u struji plina nosioca, ulazi u detektor. Vrijeme potrebno pojedinoj komponenti da prođe put od injektora do detektora zove se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme. Retencijsko vrijeme je konstantno za pojedinu komponentu pri točno zadanim uvjetima analize (Lingerman, 2012).

Detektori su smješteni na kraju kolone i pokazuju brz odziv na male koncentracije sastojaka tokom njihove eluacije iz kolone. Konvertiraju detektirane promjene u električni signal koji se ispisuje kao kromatogram. Poželjne karakteristike detektora su osjetljivost kao preduvjet za visoku rezoluciju signala svih komponenata u smjesi, primjenjivost do 400℃, te ne smije uništavati uzorak (Skoog, 2007). U praksi se primjenjuje veliki broj detektora. Neki od najkorištenijih su FID (flame ionization detector), ECD (electron capture detector), TCD (thermo conductive detector) i MS (mass spectrometer). Izbor detektora ovisi o karakteristikama spojeva koji se određuju (Lingerman, 2012).

Za određivanje udjela i sastava sterola koristili smo plinski kromatograf s FID detektorom koji ima najširu upotrebu među detektorima. Uzorak se, nakon izlaska iz kolone, miješa sa smjesom zraka i vodika i zapali, pri čemu dolazi do pirolize (cijepanja) uzorka. Pirolizirani ugljikovodici (izuzev –COOH i -CO) stvaraju radikale CH· iz kojih nastaju CHO+ ioni i elektroni. Elektroni se skupljaju na sabirnoj elektrodi, a njihova se struja, proporcionalna broju ugljikovih atoma u plamenu, mjeri ampermetrom. FID detektori su veoma osjetljivi, imaju mali šum, jednostavne su izvedbe, ali uništavaju uzorak (Skoog, 2007).

Kao rezultat analize dobije se kromatogram iz kojeg se može odrediti kvalitativni i kvantitativni sastav uzorka. Kvalitativni sastav određuje se usporedbom retencijskih vremena nepoznatog spoja sa retencijskim vremenom standarda. Količina pojedinog spoja u smjesi može se odrediti pomoću eksternog standarda (baždarna krivulja), internog standarda ili koristeći metodu normizacije površina (Lingerman, 2012).

4. EKSPERIMENTALNI DIO

Kao materijal u ovom radu korišteno je 11 uzoraka sjemena različitih kultivara soje i ulje koje je iz njih dobiveno. Sjeme soje je uzgojeno 2015. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Iz sjemena se proizvelo ulje ekstrakcijom po Soxhletu uz heksan kao organsko otapalo.

4.1. ODREĐIVANJE UDJELA I SASTAVA STEROLA

Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima sojinog ulja korištena je metoda HRN EN ISO 12228:2004.

Metoda se temelji na tome da se sojinom ulju doda α-kolestanol kao unutarnji standard te se podvrgava saponifikaciji s etanolnom otopinom KOH (c=0,5 mol L^{-1}). Neosapunjiva frakcija ekstrahira se dietileterom na koloni ispunjenoj aluminijevim oksidom. Aluminijev oksid zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Iz neosapunjive frakcije se, pomoću tankoslojne kromatografije na bazičnom silikagelu, izdvaja sterolna frakcija. Sterolna frakcija prevodi se dalje u trimetilsililestere te analizira plinskim kromatografom s plameno ionizacijskim detektorom.

Priprema neosapunjive frakcije: U okruglu tikvicu s ravnim dnom od 100 ml izvaže se 0,25 ± 0,001 g uzorka sojinog ulja. U tikvicu s izvaganim uzorkom doda se 1 mL prethodno pripremljenog α-kolestanola (c=1 mg mL^{-1}), 5 mL KOH (c=0,5 mol L^{-1}) i dvije do tri kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice do vrenja. Ostavi se da vrije točno 15 minuta. Nakon 15 minuta tikvica se odvoji od zračnog hladila i pomoću pipete doda se u tikvicu 5 mL etanola. Nakon što se tikvica ohladi, sadržaj tikvice ide na kromatografiju na stupcu.



Slika 4. Priprema neosapunjive frakcije (vlastita fotografija)

Priprema kolone za kromatografiju u stupcu: Kolona za kromatografiju dugačka je 25 cm, ima unutarnji promjer 1,5 cm te sinter na dnu kolone. Na dno kolone stavi se vata i doda se malo etanola, kako bi vata što bolje prionula uz sinter. Pomoću staklenog štapića istisne se zrak, kako ne bi zaostao u vati. Kolona se pričvrsti za metalni stalak. Odvaže se 10 g aluminijevog oksida koji se uz 20 mL etanola kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju. Punjenje kolone potrebno je provesti pažljivo kako bi se izbjegle moguće pukotine u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola se ispusti iz kolone tako da nivo etanola bude za pola centimetra iznad nivoa vrha stupca aluminijevog oksida.



Slika 5. Kolona za kromatografiju (vlastita fotografija)

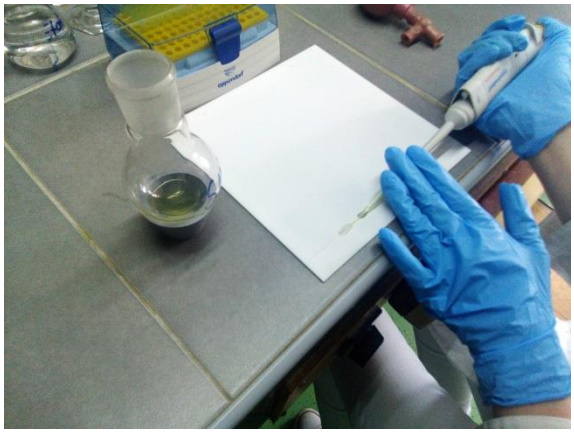
Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom u stupcu: Pomoću pipete, hladan uzorak iz tikvice prebaci se u pripremljenu kolonu. Eluiranje traje dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida. Eluat se skuplja u tikvicu od 100 mL okruglog dna. Nakon toga doda se pipetom, u kolonu za kromatografiju, 5 mL etanola i nastavi se proces eluiranja. Tikvica u kojoj se prethodno nalazio uzorak, ispere se s 10 mL dietiletera te se prenese u kolonu. Nakon što dietileter dosegne vrh sloja aluminijevog oksida, u kolonu se dodaje još 20 mL dietiletera iz menzure, kojim se završava proces eluiranja. Dobiveni eluat se otpari do suhog na rotavaporu pri 40℃.



Slika 6. Otparavanje na rotavaporu (vlastita fotografija)

Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom: Uzorak neosapunjive frakcije se otopi u 2 mL dietiletera, te se nanosi mikropipetom na gotovu ploču sa silikagelom (Silikagel F254, veličine 20x20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba ploče. Na istoj se visini ispred ove linije nanese 2-3 μL referentne otopine α-kolesterola s ciljem identifikacije sterola, nakon što se razvije kromatogram. Ploča se postavi u kadu za razvijanje koja sadrži 100 ml otopine heksan:dietileter (1:1, V/V) te se zatvori poklopcem. Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi, do trenutka kad linija otapala dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon toga ploča se suši u digestoru. Osušena ploča ravnomjerno se poprska metanolom. Traka sterola prepoznaje se po referentnoj mrlji. Rubovi mrlje iscrtaju se olovkom, metalnom špatulicom sastruže se silikagel unutar označenih rubova, te se prebaci u lijevak s filter papirom. Nakon toga se doda 0,5 ml 96% otopine

etanola, te se ispire u tri navrata s po 5 mL dietiletera. Sterolna frakcija skuplja se u tikvicu od 50 mL s okruglim dnom. Otopina se otparava na rotavaporu do volumena od 1 mL na temperaturi od 40°C. Koncentrat se prenese u kivetu te osuši pod strujom dušika. Tikvica u kojoj se prethodno skupljala sterolna frakcija, ispere se s 0,5 mL dietiletera i sadržaj se prebaci u kivetu i ponovno suši pod strujom dušika. Ovaj suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju.



Slika 7. Nanošenje neosapunjive frakcije na silikagel (vlastita fotografija)



Slika 8. Razvijanje kromatograma u kadi (vlastita fotografija)

Priprema trimetilsililetera: U kivetu koja sadrži sterolnu frakciju doda se 150 µ L reagensa za sililiranje, koji predstavlja mješavinu piridina, heksametildisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 (V:V:V). Kiveta se začepi, protrese na Vortexu do potpunog otapanja sterola i stavi se u sušionik na temperaturu od 105 ºC na 15 min. Nakon sušenja,

kiveta se ohladi u eksikatoru i centrifugira 10 min na 3000 okretaja u minuti. Odvoji se bistri supernatant od taloga koji se prebaci u vijalice od 2 mL s insertom od 100 μL. Bistra otopina injektira se u plinski kromatogram.

Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom: Pripremljen uzorak analizira se na plinskom kromatografu ATI Unicam 610 (Cambridge, Engleska). Kromatograf je opremljen s injekcionim sustavom i plameno–ionizacijskim detektorom (FID) koji je preko kanala spojen na računalo s instaliranim 4880 softverom (Unicam 4880 Chromatography Data System). U kompjuterskom sustavu zadani su uvjeti analize koji su postavljeni nakon preliminarnih ispitivanja po kojima su odabrani optimalni uvjeti, a to su temperatura kolone, temperatura detektora, temperatura injektora, protok plina i količina uzorka.



Slika 9. Plinski kromatograf (vlastita fotografija)

Uvjeti analize:

• Kolona - kapilarna DB – 17MS (Agilent),

- 30 m x 0,32 mm, debljina filma 0,25 μm

- stacionarna faza: 70% cijanopropil-polisilfenilen siloksan

• Temperatura kolone – programirana

180°C do 250°C – 6 °C min^{-1}

na 250°C zadržava se 35 min

• Temperatura injektora: 280°C

• Količina injektiranog uzorka: 1,0 μL

• Split: 1:50 do 1:100

• Plin nosioc: Helij

• Linearna brzina plina nosioca: 30 – 50 cm/s

• Temperatura detektora: 290°C

• Trajanje analize: 45 minuta

Identifikacija i kvantifikacija pikova: Pojedinačni pikovi sterola raspoznaju se na osnovu poznatih retencijskih vremena te usporedbom s retencijskih vremenima trimetilsililetera standardnih mješavina sterola analiziranih pod jednakim uvjetima.

Udjel ukupnih sterola izražava se u mg kg^{-1} i izračunava se po formuli [1]:

$$\text{Ukupni steroli} = \frac{\sum \text{As} * 1000}{\text{A}\alpha * \text{m}} \qquad [1]$$

gdje je:

As = površina svakog pojedinačnog pika sterola

Aα = površina ispod pika α- kolesterola

m = masa uzorka sojinog ulja.

Udjel pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola te je izračunat po formuli [2]:

$$\%\text{ od ukupnih sterola} = \frac{\text{A} * 100\%}{\sum \text{Ai}} \qquad [2]$$

gdje je:

A = površina ispod pika određenog fitosterola (mg kg^{-1})

Ai = površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola.

5. REZULTATI

U ovom radu provedena je analiza udjela i sastava sterola u sojinom ulju iz 11 uzoraka različitih kultivara soje uzgajanih 2015. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

Dobiveni rezultati analize udjela i sastava sterola prikazani su u Tablici 1., kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Tablica 1. Sastav sterola u sojinom ulju

UZORAK	kampesterol	kampestanol	stigmasterol	β-sitosterol	Δ 5 avenasterol	Δ7 stigmasterol	Δ7 avenasterol	n.i.	UKUPNO (mg/kg)
S1	26,6%	1,8%	14,4%	54,1%	0,2%	1,7%	0,8%	0,4%	**3465**
S2	24,8%	1,6%	19,0%	48,7%	0,1%	1,2%	0,7%	3,8%	**5162**
S3	25,5%	1,9%	19,9%	46,1%	0,5%	2,0%	1,3%	2,8%	**3384**
S4	23,1%	1,9%	19,8%	49,9%	0,5%	1,4%	0,9%	2,5%	**3937**
S5	22,7%	2,1%	24,0%	46,3%	0,1%	1,6%	0,8%	2,5%	**3211**
S6	23,8%	2,1%	14,7%	55,1%	0,2%	1,6%	0,8%	1,7%	**3298**
S7	27,3%	1,6%	13,6%	53,2%	0,7%	1,4%	1,0%	1,1%	**3420**
S8	25,6%	2,3%	14,4%	54,2%	0,1%	1,6%	0,7%	1,1%	**3458**
S9	26,5%	2,2%	18,2%	48,9%	0,1%	1,2%	0,5%	2,2%	**3378**
S10	22,7%	3,0%	15,2%	51,5%	0,2%	2,1%	1,0%	4,4%	**4417**
S11	21,0%	1,7%	23,8%	47,8%	0,1%	2,0%	0,7%	2,8%	**4075**

6. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti udio i sastav sterola u sojinom ulju. Korišteno je 11 uzoraka sjemena različitih kultivara soje, uzgojenih 2015. godine na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Ulje je proizvedeno ekstrakcijom po Soxhletu uz heksan kao organsko otapalo. Udio i sastav sterola određeni su metodom plinske kromatografije.

Usporedili smo rezultate ispitivanja s rezultatima ispitivanja udjela i sastava sterola iz prijašnje dvije godine u uzorcima ulja iz sjemena soje koje se uzgajalo na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Rezultati ispitivanja udjela i sastava sterola u uzorcima sojinog ulja ulaze u raspone udjela zadanih Pravilnikom (2012). Međutim, rezultati ovogodišnjeg ispitivanja udjela ukupnih i pojedinačni sterola kod nekih uzoraka odstupaju od zadanih raspona.

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima udio ukupnih sterola kreće se u rasponu od 1800 do 4500 mg kg^{-1}. Provedenom analizom uzoraka soje, utvrđeno je da se udio ukupnih sterola kreće od 3211 (S5) do 5162 (S2) mg kg^{-1} (Tablica 1). Analizirani uzorci, osim uzorka S2, unutar su raspona udjela ukupnih sterola propisanog Pravilnikom (2012). Uzorak S2 odstupa od propisanog raspona.

U istraživanjima iz 2013. Smoković navodi kako se udio ukupnih sterola kreće u rasponu od 3483 do 5340 mg kg^{-1}. Sve vrijednosti ukupnih sterola u uzorcima ulaze u raspon propisanih Pravilnikom, osim uzorka S7 (5340 mg kg^{-1}) koji odstupa od vrijednosti propisanih Pravilnikom. S druge strane, u istraživanjima iz 2014. Knezović navodi kako se sve vrijednosti za ukupne sterole u uzorcima nalaze unutar raspona propisanog Pravilnikom, a vrijednosti analiziranih uzoraka za ukupne sterole se kreću u rasponu od 3206 do 3939 mg kg^{-1}, dok je uzorak S8 (5340 mg kg^{-1}) imao najviši udio ukupnih sterola.

Dijkstra (2016) navodi da je udio ukupnih sterola u sirovom sojinom ulju u rasponu od 1210 do 4050 mg kg^{-1}. Prema tom rasponu, uzorci S2, S10 i S11 odstupaju, dok su vrijednosti sterola ostalih uzoraka unutar raspona. Prema Piironen i sur. (2000) sojino ulje može sadržavati između 2290 i 4490 mg kg^{-1} sterola. I prema ovom navodu uzorak S2 odstupa s udjelom ukupnih sterola od 5162 mg kg^{-1}.

Kultivar, odnosno genetski faktori, značajno utječe na udio ukupnih sterola u sojinom ulju, ali i na sastav sterola. Na sastav i udio sterola u sojinom ulju, također, mogu utjecati klimatski faktori, te proizvodni proces, kao što Mailer i sur. (2010) navode za maslinovo ulje. Također, u svom istraživanju povezuju udio sterola s geografskom lokacijom, odnosno navode kako kulture koje se uzgajaju u sjevernijim krajevima, imaju manji udio sterola.

U drugom istraživanju, Vlahakis i Hazebroek (2000) navode kako temperatura i genetski faktori utječu na promjenu u sastavu i udjelu sterola. Prema njihovom istraživanju, udio ukupnih sterola raste s porastom temperature, te porast temperature ima značajan utjecaj na sastav sterola.

Promatra li se razlika u sastavu i udjelu sterola u ulju dobivenog od uzoraka soje uzgajanih 2015. godine s uljem dobivenog od uzoraka soje uzgajanih prijašnjih godina, možemo pretpostaviti kako su klimatske prilike tokom 2015. godine utjecale na promjenu u sastavu i udjelu sterola s čime se mže objasniti razlika u ukupnom i pojedinačnom udjelu sterola.

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima sojino ulje ima najviše β-sitosterola. Udio β-sitosterola u analiziranim uzorcima je u rasponu od 46,1% do 55,1%. S obzirom da je udio β-sitosterola prema Pravilniku (2012) u rasponu od 47% do 60%, vidimo da uzorci S3 (46,1%) i S5 (46,3%) neznatno odstupaju, dok je udio β-sitosterola u ostalim uzorcima unutar navedenog raspona. Uzorak S6 ima najveći udio β-sitosterola (55,1%), dok uzorak S3 ima najmanji udio β-sitosterola (46,1%).

Smoković (2013) u svom istraživanju navodi da je udio β-sitosterola u uzorcima sojinog ulja u rasponu od 49,1 do 55,6 % što odgovara Pravilniku (2012). Najveći udio β-sitosterola ima, također, uzorak S6 (55,6%), dok najmanji udio ima S7 (49,1%). S druge strane, Knezović (2014) u svom istraživanju također navodi da raspon vrijednosti udjela β-sitosterola (47,2-56,0%) odgovara Pravilniku, dok najveći udio β-sitosterola ima uzorak S7 (56,0%), a najmanji S8 (47,2%).

Od ukupnih sterola u sojinom ulju, β-sitosterol je najzastupljeniji. Vlahakis i Hazebroek (2000), u svom istraživanju navode kako udio β-sitosterola ovisi o klimatskim promjenama, odnosno o temperaturi. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da se

povećanjem temperature, smanjuje udio β-sitosterola u maslinovom ulju. Mailer i suradnici (2010), s druge strane, navode kako ovisno o kultivaru utjecaj geografskog položaja i klimatski uvjeti ne utječu značajno na promjenu udjela β-sitosterola.

Udio kampesterola u analiziranim uzorcima je u rasponu od 21,0% do 27,3%. Pravilnik (2012) navodi da je udio kampesterola u rasponu od 15,8% do 24,2%. Prema Pravilniku, vrijednosti udjela kampesterola u uzorcima S4 (23,1%), S5 (22,7%), S6 (23,8%), S10 (22,7%) i S11 (21,0%) odgovaraju zadanom rasponu. Najviše kampesterola se nalazi u uzorku S7 (27,3%), a najmanje u uzorku S11 (21,0%).

Prema istraživanju iz 2013. godine Smoković navodi kako vrijednosti udjela kampesterola odgovaraju vrijednostima zadanih Pravilnikom, a kreću se u rasponu od 15,9 do 20,0%. Navjeći udio kampesterola ima uzorak S3 (20,0%), dok uzorak S7 (15,9%) ima najmanji udio. Knezović (2014) u svom istraživanju, također, navodi kako sve vrijednosti udjela kampesterola u rasponu od 17,1 do 23,4% odgovaraju Pravilniku (2012). Prema tom istraživanju najveći udio kampesterola ima uzorak S2 (23,4%), a najmanji udio ima uzorak S5 (17,1%).

Pod utjecajem povišene temperature, udjeli kampesterola se ovisno o kultivaru mjenjaju. Prema Vlahakisu i Hazebroeku (2000) se udio kampesterola povećava s povećanjem temperature, što je isto potvrđeno i u istraživanju Mailera i suradnika (2010).

Udio stigmasterola, prema Pravilniku (2012), je u rasponu od 14,9% do 19,1%. U analiziranim uzorcima udio stigmasterola se nalazi u rasponu od 13,6% do 24%. Nešto manje vrijednosti udjela stigmasterola od onih zadanih Pravilnikom, imaju uzorci S1 (14,4%), S6 (14,7%), S7 (13,6%) i S8 (14,4%), dok uzorci S5 (24,0%) i S11 (23,8%) imaju nešto veća odstupanja od vrijednost udjela stigmasterola od udjela zadanih Pravilnikom. Uzorak S5 ima najveći udio stigmasterola, dok uzorak S7, koji ima najveći udio kampesterola, ima najmanji udio stigmasterola.

U istraživanju Smoković (2013) navodi se kako je vrijednost udjela stigmasterola u rasponu od 16,2 % do 23,9%, te da samo uzorci S1 (17,3%) i S3 (16,2%) odgovaraju vrijednostima udjela stigmasterola zadanih Pravilnikom. Svi ostali uzorci pokzuju više vrijednosti od propisanog Pravilnika. U istraživanju Knezović (2014) navodi se kako je

raspon vrijednosti udjela stigmasterola za uzorke (17,3-27,8%) veći od propisanog Pravilnikom, te da jedino uzorci S1 (17,3%), S2 (18,0%) i S7 (18,2%) odstupaju od propisanog raspona.

Udio stigmasterola, prema Maileru i sur. (2010), ovisno o kultivaru, mjenja se ovisno o geografskom polažaju i klimatskim uvjetima. Oni navode kako se udio stigmasterola smanjuje povišenjem temperature, te je veći udio stigmasterola u maslinovom ulju kod biljaka koje su uzgajane u južnijim krajevima. Vlahakis i Hazebroek (2000) također navode da se udio stigmasterola smanjuje po utjecajem povišene temperature, ovisno o kultivaru.

Osim navedenih sterola, analizom plinskom kromatografijom utvrđeno je da se u svim analiziranim uzorcima nalaze i kampestanol, Δ5-avenasterol, Δ7-stigmasterol i Δ7-avenasterol. Vrijednosti kampestanola nisu utvrđene Pravilnikom. Vrijednosti udjela Δ5-avenasterola u svim analiziranim uzorcima su ispod granice utvrđene Pravilnikom (1,5-3,7%). Prema Pravilniku udio Δ7-stigmasterola je 1,4% do 5,2%, od čega manje odstupaju uzorci S2 (1,2%) i S9 (1,2%). Udio Δ7-avenasterola je, prema Pravilniku, u rasponu od 1,0% do 4,6%, čemu odgovaraju uzorci S3 (1,3%), S7 (1,0%) i S10 (1,0%). Uzorak S7, uz to što ima najveći udio kampesterola i najmanji udio stigmasterola, ima najmanji udio kampestanola (1,6%) i najveći udio Δ5-avenasterola (0,7%). Uzorak S3, koji ima najmanji udio β-sitosterola, ima najveći udio Δ7-avenasterola (1,3%).

U istraživanjima Smoković (2013) i Knezović (2014) su, također, detektirani i kampestanol čiji udio nije propisan Pravilnikom, Δ5-avenasterol, Δ7-stigmasterol i Δ7-avenasterol. U istraživanju iz 2013. udio Δ5-avenasterola je iznosio od 0,8 do 2,2 %, te su uzorci S1 (1,9%), S4 (1,7%), S10 (2,1%) i S11 (2,2%) odgovarali rasponu zadanog Pravilnikom, dok je u istraživanju iz 2014. udio Δ5-avenasterola iznosio od 0,5% do 1,6%, te je samo uzorak S4 (1,6%) odgovarao propisanom rasponu. Udio Δ7-stigmasterola je prema istraživanju iz 2013. u rasponu od 1,7 do 5,7 %, te je uzorak S3 (5,7%) odstupao od propisanog raspona, dok su vrijednosti udjela Δ7-stigmasterola za ostale uzorke bile unutar propisanog raspona. S druge strane, istraživanje iz 2014. navodi kako je udio Δ7-stigmasterola iznosio od 1,9 do 5,0%, te su vrijednosti udjela Δ7-stigmasterola za sve uzorke unutar raspona propisanog Pravilnikom. Smoković u svom istraživanju iz 2013. navodi kako je udio Δ7-avenasterola od 0,5 do 1,7 %, te da uzorci S2 (0,8%), S5 (0,8%) i S7 (0,5%) odstupaju od propisanog raspona. Knezović u svom istraživanju iz 2014. navodi kako je udio

Δ7-avenasterola u rasponu od 0,3 do 1,4%, te da su uzorci koji odstupaju od propisanog raspona u Pravilniku S5 (0,7%), S6 (0,6%), S7 (0,3%), S9 (0,7%) i S10 (0,6%).

Kolesterol i brasikasterol, čija je vrijednost utvrđena Pravilnikom, nisu utvrđeni analizom. Analizom je, također, utvrđeno nekoliko neidentificiranih spojeva za svaki uzorak, kojih ima najviše u uzorku S10 (4,4%), a najmanje u uzorku S1 (0,4%).

U istraživanjima iz 2013. i 2014. nisu analizom utvrđeni kolesterol i brasikasterol, čija je vrijednost utvrđena Pravilnikom. Također, utvrđeni su neidentificirani spojevi u uzorcima. U 2013. u svim uzorcima su utvrđeni neidentificiranu spojevi, najviše u uzorku S7 (8,8%), a najmanje u uzorcima S5 (0,6%) i S11 (0,6%). U 2014., s druge strane, u uzorcima S2, S5 i S8 nisu utvrđeni neidentificirani spojevi, dok je najviše neidentificiranih spojeva bilo u uzorku S11 (2,6%), a najmanje u uzorcima S3 (0,1%) i S4 (0,1%).

7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedene analize te dobivenih i obrađenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Udio ukupnih sterola u uzorcima sojinog ulja je u rasponu od 3211 do 5162 mg kg^{-1}.

2. Najzastupljeniji sterol u svim uzorcima sojinog ulja bio je β-sitosterol, a najviše ga ima u uzorku S6 (55,1%).

3. U svim uzorcima su prisutni, uz β-sitosterol, i kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ5-avenasterol, Δ7-stigmasterol i Δ7-avenasterol. Kolesterol i brasikasterol nisu detektirani.

8. LITERATURA

Anonymous 1 <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3_rpt.htm>. Pristupljeno 11.6.2016.

Anonymous 2 <http://www.krenizdravo.rtl.hr/prehrana/dodaci-prehrani/nesto-sto-sigurno-niste-znali-o-africkoj-sljivi>. Pristupljeno 13.6.2016.

Bard, J.M., Paillard, F., Lecerf, J.M. (2015) Effect of phytosterols/stanols on LDL concentration and other surrogate markers of cardiovascular risk. *Diabetes Metab.* **41**, 69-75.

Beck, J.G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S., Dufourc, E.J. (2007) Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* **21**, 1714-1723.

Dijkstra, A.J. (2016) Soybean oil. U: Encyclopedia of Food and Health (Caballero, B., Finglas, P.M., Toldra, F., ured.), 1. izd., Academic Press, str. 58-63.

Duvnjak, T. (2004) Phomopsis longicolla Hobbs Uzročnik truleži sjemena soje u Hrvatskoj, Poljoprivredni institut Osijek, Osijek.

Hammond, E.G., Johnson, L.A., Su, C., Wang, T., White, P.J. (2005) Soybean Oil. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products (Shahidi, F., ured.), 6.izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 577-653.

HRN EN ISO 12228:2004, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola - Metoda plinske kromatografije.

Jena, A.K., Vasisht, K., Sharma, N., Kaur, R., Dhingra, M.S., Karan, M. (2016) Amelioration of testosterone induced benign prostatic hyperplasia by Prunus species. *J. Ethnopharmacol.* **190**, 33-45.

Knezović, N. (2014) Sastav sirovog sojinog ulja proizvedenog iz novih kultivara, Diplomski rad.

Lingerman, F. (2012) How to select technique, < http://www.chromedia.org >. Pristupljeno 16.6.2016.

Mailer, R.J., Ayton, J., Graham, H. (2010) The Influence of Growing Region, Cultivar and Harvest Timing on the Diversity of Australian Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*. **87**, 877-884.

Mandl, A., Reich, G., Lindner, W. (1999) Detection of alduration of pumpkin seed oil of content and composition of specific Δ7-phytosterols. *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 400-406.

Ohyama, C., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., Muranaka, K. (2008) Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in Arabidopsis. *PNAS* **106**, 725-730.

Pine, S.H. (1994) Organska kemija (prijevod I. Bregovec i V. Rapić), Školska knjiga, Zagreb

Piironen, V., Lindsay, D., Miettinen, T., Toivo, J., Lampi, A. (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric*. **80**, 939-966.

Pratap, A., Gupta, S.K., Kumar, J., Mehandi, S., Pandey, V.R. (2016) Soybean. U: Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production (Gupta, S.K., ured.), 1. izd., Academic Press, str. 293-315.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **41**, Zagreb.

Rog, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., Karttunen, M. (2009) Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta*. **1788**, 97-121.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2007) Principles of Instrumental Analysis, 6.izd., *Brooks/Cole*, 788-816.

Smoković, B. (2013) Utjecaj kultivara na sastav sirovog sojinog ulja, Diplomski rad.

Škevin, D. (2016) Predavanja iz kolegija Kemija i tehnologija ulja i masti

Tsuji, P.A., Galinn, S.E., Hartman, J. (2016) Cancer: Diet in Cancer Prevention. U: Encyclopedia of Food and Health (Caballero, B., Finglas, P.M., Toldra, F.). Academic Press, 614-620.

Vlahakis, C., Hazebroek, J. (2000) Phytosterol accumulation in canola, sunflower and soybean oils: effects of genetics, planting location and temperature. *J. Amer. Oil Chem. Soc*. **77**, 49–53.

Vratarić, M., Sudarić, A. (2000) Soja *Glycine max* (L.) Merr. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek.