



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและเสถียรภาพจากการ
เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรด
ไขมันในระบบจำลองและระบบอาหารประเภทไขมัน

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวรรณ พันพิพัฒน์ และคณะ

วันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและเสถียรภาพจากการ
เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรด
ไขมันในระบบจำลองและระบบอาหารประเภทไขมัน

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวรรณ พันพิพัฒน์
2. รองศาสตราจารย์ ดร. มนัส ชัยจันทร์
3. Assoc. Prof. Dr. Zheng Guo

สังกัด

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
Aarhus University, Denmark

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของเบต้าซิโตสเตอรอล-และกรดไขมัน ซึ่งได้แก่ β -sitosteryl hexanoyl ester (Sito-C6:0 ester) β -sitosteryl lauroyl ester (Sito-C12:0 ester) β -sitosteryl palmitoyl ester (Sito-C16:0 ester) และ β -sitosteryl oleyl ester (Sito-C18:1 ester) เปรียบเทียบกับเบต้าซิโตสเตอรอลในระบบจำลองต่าง ๆ โดยได้ศึกษาผลของการให้ความร้อนสารบริสุทธิ์ (60 100 และ 180 °C) ผลของชนิดของสารตัวกลาง (เมทริกซ์ที่เป็นไขมันและระบบจำลองอิมัลชัน ที่อุณหภูมิ 55 °C) และการออกซิเดชันในอาหารประเภทไขมัน (มาการีน; เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และในสภาวะเร่ง (55 °C)) โดยได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงดัชนีในการออกซิเดชันซึ่งได้แก่ ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (HPV) ค่า TBARS ค่า *p*-anisidine (*p*-AV) 7-ketositosterols ปริมาณไฟโตสเตอรอลที่หลงเหลือ และสร้างกราฟจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของการเกิดออกซิเดชัน จากการทดลองพบว่า การออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์เกิดมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการให้ความร้อน อย่างไรก็ตาม ชนิดของไฟโตสเตอรอลจะตอบสนองต่ออุณหภูมิในรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยอนุพันธ์เอสเทอร์จะเกิดการออกซิเดชันได้สูงกว่าในรูปอิสระเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 และ 60 °C แต่ผลดังกล่าวจะตรงกันข้ามเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °C เมื่อพิจารณาผลของกรดไขมันที่มาเอสเทอร์ไฟต์ต่อการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ พบว่า การเอสเทอร์ไฟต์ด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะทำให้เกิดการออกซิเดชันได้สูงกว่าการเอสเทอร์ไฟต์ด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสายสั้น สายกลางและสายยาว ตามลำดับ ส่วนการศึกษาผลของเมทริกซ์ต่อการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่า การเปลี่ยนแปลงของดัชนีการออกซิเดชัน (HPV TBARS *p*-AV และ 7-keto derivatives) มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของไฟโตสเตอรอลและชนิดของเมทริกซ์ อนุพันธ์ชนิดไม่อิ่มตัว (Sito-C18:1) มีอัตราเร็วในการออกซิเดชันสูงกว่าอนุพันธ์ชนิดอิ่มตัว และเบต้าซิโตสเตอรอลธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบอิมัลชัน สำหรับการออกซิเดชันในมาการีน พบว่า มาการีนที่มีการเติม sito-C18:1 มีอัตราการออกซิเดชันสูงที่สุดตลอดช่วงเวลาในการเก็บรักษาทั้งในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง อย่างไรก็ตาม การเติมอนุพันธ์อื่น ๆ ทำให้ผลยังมีความแปรปรวน จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเกิดออกซิเดชัน พบว่าในทุกระบบจะเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบปฏิกิริยาอันดับ 1 และมีอัตราแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอนุพันธ์ อุณหภูมิ และประเภทของเมทริกซ์

คำสำคัญ: อนุพันธ์เอสเทอร์ของเบต้าซิโตสเตอรอล-และกรดไขมัน ออกซิเดชัน น้ำมัน อิมัลชัน มาการีน

Abstract

Oxidative instabilities of β -sitosterol-fatty acid esters, including β -sitosteryl hexanoyl ester (Sito-C6:0 ester), β -sitosteryl lauroyl ester (Sito-C12:0 ester), β -sitosteryl palmitoyl ester (Sito-C16:0 ester) and β -sitosteryl oleyl ester (Sito-C18:1 ester), were investigated in comparison with native β -sitosterol in different model systems. Effect of heating pure phytosterol and its esters (60, 100 and 180°C), effect of lipid matrix (bulk oil and emulsion stored at 55°C) and oxidation reaction in lipid based food (margarines stored at ambient temperature (25°C) and accelerated temperature (55°C)) were monitored. Oxidative indices including HPV, TBARS, *p*-AV, 7-keto derivatives and remaining phytosterol content were analyzed together with kinetics plot. The results showed that oxidation of phytosterol and its derivatives increased with increasing heating temperature. However, the types of phytosterol or phytosteryl ester responded to temperature differently. Phytosterol esters oxidized faster than the native form when heated at 100 and 60°C but the contradictory result was observed when heated at 180°C. When considering the type of fatty acids esterified, unsaturated fatty acid rendered the ester with higher degree of oxidation when compared with saturated short chain, medium chain and long chain fatty acids, respectively. For the effect of lipid matrix on oxidation during storage, it was found that changes in oxidative indices (HPV, TBARS, *p*-AV and 7-keto derivatives) differed depending on sterol structure and lipid matrix. Unsaturated ester oxidized faster than saturated counterpart and native β -sitosterol, especially in emulsion. For the oxidation in margarine, it was noted that margarine fortified with sito-C18:1 had the highest rate of oxidation throughout the storage at both ambient and accelerated temperatures. However, the results were fluctuated when others derivatives were added. A kinetic evaluation of the loss of β -sitosterol and its esters throughout the storage was performed. All changes fitted a first order kinetic model and the rate of reaction was dependent on sterol structure, temperature and lipid matrix.

Key words: β -sitosterol-fatty acid esters, oxidation, bulk oil, emulsion, margarine

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของกระบวนการให้ความร้อนที่ระดับต่าง ๆ ต่อเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมัน เพื่อศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบจำลองอิมัลชันและระบบตัวทำละลายที่เป็นไขมัน และเพื่อศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบอาหารประเภทไขมัน โดยการวิจัยได้ดำเนินการเสร็จสิ้นบรรลุวัตถุประสงค์ทั้งหมด จากการวิจัยสามารถสรุปได้ว่าอัตราการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอนุพันธ์ อุณหภูมิ และประเภทของเมทริกซ์ โดยทั่วไปแล้วการออกซิเดชันจะเกิดขึ้นได้สูงกว่าในโครงสร้างที่มีการเอสเทอร์ไฟต์ด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันอิ่มตัวสายสั้น สายกลาง และสายยาว ตามลำดับ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าจะทำให้การออกซิเดชันเกิดขึ้นได้มากกว่า และระบบอิมัลชันจะทำให้มีโอกาสเกิดการออกซิเดชันได้สูงกว่าระบบที่เป็นไขมัน

สารบัญ

บทที่	หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		3
บทสรุปผู้บริหาร		4
สารบัญ		5
สารบัญตาราง		6
สารบัญรูป		7
ที่มาและความสำคัญของปัญหา		9
วัตถุประสงค์ของโครงการ		10
การทบทวนวรรณกรรม		11
ระเบียบวิธีการวิจัย		23
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง		26
สรุป		52
เอกสารอ้างอิง		52
Output		58
ภาคผนวก		59

สารบัญตาราง

	หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 1	ผลของไฟโตสเตอรอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยและคนปกติ	14
ตารางที่ 2	ค่าจลพลศาสตร์ของ β -sitosterol และ β -sitosteryl esters ที่เหลืออยู่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 100 และ 180°C เป็นเวลา 2 ชม.	34
ตารางที่ 3	ค่าจลพลศาสตร์ของ β -sitosterol และ β -sitosteryl esters ที่เหลืออยู่ในระบบไตรปาล์มมิดิน และอิมัลชันที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C	42
ตารางที่ 4	ค่าจลพลศาสตร์ของ β -sitosterol และ β -sitosteryl esters ที่เหลืออยู่ในมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C และ 55°C	50

สารบัญรูป

	หัวข้อ	หน้า
รูปที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอล	12
รูปที่ 2	กลไกของไฟโตสเตอรอลในการลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกาย	15
รูปที่ 3	กลไกการเกิดออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล	18
รูปที่ 4	โครงสร้างของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่ใช้ในการทดลอง	24
รูปที่ 5	รูปที่ 5 ค่า HPV ของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.	29
รูปที่ 6	ค่า p-AV ของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.	31
รูปที่ 7	ร้อยละของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่เหลืออยู่เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.	33
รูปที่ 8	ปริมาณ 7-Ketositosterol ของ β -sitosterol และอนุพันธ์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.	35
รูปที่ 9	ค่า HPV ของไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C	37
รูปที่ 10	ค่า TBARS ของไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C	38
รูปที่ 11	ค่า p-AV ของไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C	40
รูปที่ 12	ร้อยละของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในระบบไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C	41
รูปที่ 13	ปริมาณ 7-Ketositosterol ในระบบไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C	43
รูปที่ 14	ค่า HPV ของมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)	45
รูปที่ 15	ค่า TBARS ของมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)	46

		หัวข้อ	หน้า
รูปที่	16	ค่า p -AV ของมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)	47
รูปที่	17	ร้อยละของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)	49
รูปที่	18	ปริมาณ 7-ketositosterol ในมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C และ 55°C	51

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ไฟโตสเตอรอล (phytosterol หรือ plant sterol) คือสารประกอบสเตอรอลที่พบในพืช ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับคอเลสเตอรอล จึงมักใช้เติมลงในอาหาร ใช้ในผลิตภัณฑ์ยาและอาหารเสริม ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบางชนิด เป็นต้น ไฟโตสเตอรอลพบมากในพืชและน้ำมันพืช โดยไฟโตสเตอรอลที่พบในธรรมชาติจะพบในรูปสารผสมของไฟโตสเตอรอลหลายชนิด ได้แก่ เบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) สติกมาสเตอรอล (stigmasterol) แคมป์สเตอรอล (campesterol) และ บราสซิกลาสเตอรอล (brassicasterol) เป็นต้น โดยเบต้า-ซิโตสเตอรอลเป็นไฟโตสเตอรอลชนิดที่พบในปริมาณมากที่สุด คุณสมบัติที่สำคัญของไฟโตสเตอรอลคือ ความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เนื่องจากไฟโตสเตอรอลมีความสามารถในการยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลจากอาหารในบริเวณลำไส้เล็ก (Jones และคณะ, 1999) จากรายงานของ Nissinen และคณะ (2002) ระบุว่าหากรับประทานอาหารที่มีไฟโตสเตอรอลปริมาณ 2 กรัม เป็นประจำทุกวัน เป็นปริมาณที่เพียงพอที่จะให้ผลในการลดระดับการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกายได้ นอกจากนั้น Lees และคณะ (1977) ได้รายงานว่าการบริโภคไฟโตสเตอรอลในปริมาณเล็กน้อย แต่ขึ้นอยู่กับรูปแบบของไฟโตสเตอรอลที่ร่างกายได้รับ สามารถลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกายได้

ไฟโตสเตอรอลที่พบในธรรมชาติโดยทั่วไปมีความสามารถในการละลายน้ำและไขมันได้น้อย จึงส่งผลให้ลำไส้เล็กของมนุษย์สามารถดูดซึมไฟโตสเตอรอลได้ในปริมาณที่ต่ำตามไปด้วย โดยทั่วไปแล้วร้อยละ 50 ของคอเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหารจะถูกดูดซึมเข้าไปในส่วนของลำไส้เล็ก ในขณะที่การดูดซึมไฟโตสเตอรอลจะเกิดขึ้นในปริมาณที่ต่ำกว่านี้มาก ส่งผลให้ความเข้มข้นของไฟโตสเตอรอลที่ออกฤทธิ์ได้ (effective dose) มีค่าค่อนข้างสูง กล่าวคือร่างกายต้องได้รับในปริมาณวันละ 25 กรัม (Hossen และ Hernandez, 2004) นอกจากนี้ลักษณะโครงสร้างที่เป็นผลึกของไฟโตสเตอรอลและความสามารถในการละลายที่ต่ำยังส่งผลให้สารดังกล่าวมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของไฟโตสเตอรอลทั้งในระบบที่มีน้ำและไขมันเป็นตัวทำละลาย โดยวิธีการหลักคือ การลดความมีขั้วของไฟโตสเตอรอลโดยการนำไปเอสเทอร์ไฟต์กับกรดไขมันเพื่อปรับปรุงความสามารถในการละลายในไขมัน ดังรายงานของ Panpipat และคณะ (2013) ซึ่งได้สังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันที่มีโครงสร้างต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ชนิด A เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งให้ผลผลิตอนุพันธ์เอสเทอร์ดังกล่าวสูงกว่าร้อยละ 95 ภายในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนี้ยังได้มีการสังเคราะห์ไฟโตสเตอรอลที่มีความมีขั้วสูงขึ้นด้วยการเชื่อมต่อน้ำมันไฟโตสเตอรอลกับสารประกอบที่มีขั้ว เช่น กรดอะมิโน เป็นต้น เพื่อปรับปรุงความสามารถในการละลายในน้ำของสารดังกล่าว ซึ่งอนุพันธ์ของไฟโตสเตอรอลเหล่านี้มีความสามารถในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีกว่าไฟโตสเตอรอลในรูปผลึกที่พบในธรรมชาติ (Miettinen และ Vanhanen, 1994)

ไฟโตสเตอรอลจัดเป็นไขมันชนิดหนึ่งจึงมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อผ่านการให้ความร้อนหรือเก็บรักษาเป็นเวลานานภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากโครงสร้างของไฟโต

เตอรอลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 ของวงแหวน B ประกอบด้วยพันธะคู่ โดยทั่วไปไฟโตสเตอรอลทุกชนิดรวมทั้งคอเลสเตอรอลสามารถเกิดการออกซิเดชันได้ด้วยกลไกเช่นเดียวกับที่พบในกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (García-Llatas และ Rodríguez-Estrada, 2011) ไฟโตสเตอรอลสามารถเกิดออกซิเดชันได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในชั้นหุติภูมิจะมีความเป็นพิษต่อร่างกายสูง เช่น 7a- และ 7b-hydroxysterols และ 7-ketosterols เป็นต้น (Soupas และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าในระบบที่ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลและสเตอรอลไฮโดรเพอร์ออกไซด์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (epoxidation) ของพันธะคู่ตำแหน่งที่ 5 ในโครงสร้างของไฟโตสเตอรอลทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ 5a,6a- และ 5b,6b-epoxysterols ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องไปเป็นสารประกอบ 3b,5b,6b-triols ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Smet และคณะ, 2012) ทั้งนี้ในสภาวะที่มีการให้ความร้อนจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ไฟโตสเตอรอลเกิดการออกซิเดชัน ซึ่งมีการตรวจพบในอาหารที่ผ่านการปรุงสุกหลายชนิด (Jägerstad และ Skog, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Salen และคณะ (1985) ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลหลายชนิดสามารถดูดซึมและสะสมในซีรัม ตับ และเลือดของหนูทดลอง และสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

สภาวะที่ใช้ในการแปรรูปอาหารที่ส่งเสริมให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันและไฟโตสเตอรอลประกอบไปด้วย การใช้อุณหภูมิสูง การสัมผัสกับออกซิเจน แสง ความชื้น และโลหะ นอกจากนี้กระบวนการแปรรูปอาหารยังส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของไขมันในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งส่งผลในการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของไขมันและออกซิเจน รวมทั้งลดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติ โดยมีการตรวจพบออกไซด์ของไฟโตสเตอรอลค่อนข้างสูงในน้ำมันที่ใช้ทอดมันฝรั่งแท่ง นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบผลิตภัณฑ์ออกไซด์ของไฟโตสเตอรอลในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำขนมปัง (Grandgirard และคณะ, 2004) โดยระดับการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลขึ้นอยู่กับโครงสร้างของอาหาร กล่าวคือภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ไฟโตสเตอรอลจะเกิดออกซิเดชันได้ดีในอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ในขณะที่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ ไฟโตสเตอรอลจะเกิดออกซิเดชันได้ดีในอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จากที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลธรรมชาติ โดยการศึกษาเกี่ยวกับการออกซิเดชันของอนุพันธ์ไฟโตสเตอรอลมีค่อนข้างน้อย (Yanislieva และ Marinova, 1980; Soupas และคณะ, 2005)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมัน ซึ่งมีความยาวสายโซ่และระดับความไม่อิ่มตัวที่แตกต่างกันในระบบจำลองและระบบอาหารประเภทไขมัน ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันดังกล่าว

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อศึกษาผลของกระบวนการให้ความร้อนที่ระดับต่าง ๆ ต่อเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมัน

2.2 เพื่อศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบจำลองอิมัลชันและระบบตัวทำละลายที่เป็นไขมัน

2.3 เพื่อศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบอาหารประเภทไขมัน

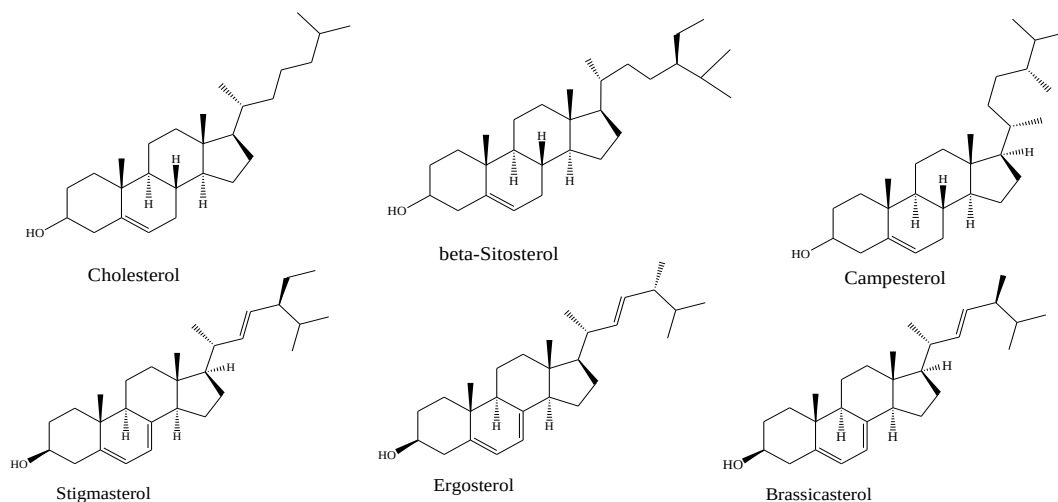
3. การทบทวนวรรณกรรม

3.1 เคมีและประโยชน์ของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์

3.1.1 โครงสร้างทางเคมีของไฟโตสเตอรอล

ไฟโตสเตอรอลเป็นสารประกอบในกลุ่มไตรเทอพีน (triterpene) ที่มีคาร์บอนจำนวน 28 หรือ 29 อะตอม ขึ้นอยู่กับชนิดของไฟโตสเตอรอล โครงสร้างหลักประกอบด้วยส่วนของวงแหวนสเตอรอยด์ที่มีการเชื่อมโยงของหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในวงแหวน A และ D (รูปที่ 1) โดยทั่วไปสเตอรอลเกือบทุกชนิดมีการเชื่อมโยงด้วยพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 ในขณะที่สแตนอล (stanol) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันแต่ไม่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง โดยไฟโตสเตอรอลชนิดที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ เบต้า-ซิโตสเตอรอล สติกมาสเตอรอล แคมป์สเตอรอล และ บราสซิกลสเตอรอล เป็นต้น โครงสร้างทางเคมีของไฟโตสเตอรอลมีความคล้ายคลึงกับคอเลสเตอรอลเป็นอย่างมาก (รูปที่ 1) โดยเบต้า-ซิโตสเตอรอลมีความแตกต่างจากคอเลสเตอรอลเพียงแค่มียูเอทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 24 ของโซ่ข้าง ในขณะที่แคมป์สเตอรอลมีหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งดังกล่าว อย่างไรก็ตามความแตกต่างของโครงสร้างเพียงเล็กน้อยอาจส่งผลให้ความสามารถในการดูดซึมไฟโตสเตอรอลและคอเลสเตอรอลในร่างกายมนุษย์มีความแตกต่างกัน โดยไฟโตสเตอรอลจะถูกดูดซึมในส่วนของลำไส้เล็กได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าคอเลสเตอรอลเป็นอย่างมาก กล่าวคือคอเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายมากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ร่างกายจะดูดซึมไฟโตสเตอรอลจากอาหารเพียงร้อยละ 10-15 เท่านั้น (Salen และคณะ, 1992; Heinemann และคณะ, 1993; Lütjohann และคณะ, 1995)

ไฟโตสเตอรอลจัดเป็นสารในกลุ่ม amphiphilic กล่าวคือมีองค์ประกอบของส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง จุดหลอมเหลวของเบต้า-ซิโตสเตอรอล แคมป์สเตอรอล และสติกมาสเตอรอล คือ 140 157-158 และ 170^oC ตามลำดับ ความไม่มีขั้วหรือไม่มีประจุ (hydrophobicity) ของไฟโตสเตอรอลนั้นจะเกี่ยวข้องกับจำนวนคาร์บอนในส่วน of โซ่ข้าง กล่าวคือหากมีจำนวนคาร์บอนที่โซ่ข้างเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้ความไม่มีขั้วของไฟโตสเตอรอลชนิดนั้น ๆ เพิ่มขึ้น ดังนั้นไฟโตสเตอรอลที่มีคาร์บอน 28 หรือ 29 อะตอม จะมีความไม่มีขั้วสูงกว่าคอเลสเตอรอลซึ่งมีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 27 อะตอม (Nes, 1987; Armstrong และ Carey, 1987) อย่างไรก็ตามการมีพันธะคู่ในส่วน of โซ่ข้างซึ่งพบในไฟโตสเตอรอลบางชนิดจะทำให้ความมีขั้ว (hydrophilic) ของไฟโตสเตอรอลเพิ่มสูงขึ้น โดยทั่วไปไฟโตสเตอรอลในรูปอิสระ (free phytosterol) และอนุพันธ์เอสเทอร์จะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน เป็นต้น



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอล

3.1.2 คุณสมบัติของไฟโตสเตอรอลและการประยุกต์ใช้ในอาหาร

ไฟโตสเตอรอลมีบทบาทสำคัญในหลายลักษณะ เช่น ใช้ในการผลิตสเตียรอยด์ (steroid) ในทางเภสัช (Fernandes และ Cabral, 2007) และเป็นสารยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล โดยใช้เติมลงในอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และต้านการเกิดออกซิเดชัน (Niazi, 2003; Okoli และ Akah, 2004; Nashed และคณะ, 2005; Choi และคณะ, 2003; Berger และคณะ, 2004; Platt และคณะ, 2004) และใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Folmer, 2003) สำหรับในด้านอาหารและโภชนาการนั้น บทบาทที่สำคัญของไฟโตสเตอรอลคือ ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล จึงได้มีการประยุกต์ใช้สารดังกล่าวในอาหารและเครื่องดื่มทางการค้าหลายชนิด โดยไฟโตสเตอรอลในรูปบริสุทธิ์จะถูกเติมลงไปในการผลิตอาหารแล้วบ่งชี้คุณสมบัติในแง่ของการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Marangoni และ Poli, 2010) Engel และ Schubert (2005) รายงานว่านิยมเติมไฟโตสเตอรอลในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนมไขมันต่ำ ทั้งชนิดทั่วไปและชนิดที่มีปริมาณไขมันต่ำ โดยมีการขึ้นฉลากที่มีการเติมไฟโตสเตอรอลได้มีการวางจำหน่ายเชิงพาณิชย์ในลักษณะของผลิตภัณฑ์นมไขมันต่ำเพื่อสุขภาพ ซึ่งระบุว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมดและคอเลสเตอรอลที่รวมตัวกับไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำได้ (cholesterol-low density lipoprotein) (Madsen และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีการเติมไฟโตสเตอรอลในผลิตภัณฑ์เนย (Nestle และคณะ, 2001) โยเกิร์ตไขมันต่ำ (Madsen และคณะ, 2007) มายองเนส น้ำสลัด ซอซโกเลต และผลิตภัณฑ์ขนมอบ (Abumweis และคณะ, 2006) นม (Madsen และคณะ, 2007) และเครื่องดื่ม (Shin และคณะ, 2003) เป็นต้น Abumweis และคณะ (2006) ระบุว่า การเติมไฟโตสเตอรอลในผลิตภัณฑ์มายองเนส น้ำสลัด นม หรือโยเกิร์ต จะให้ผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้ดีกว่าการเติมไฟโตสเตอรอลในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น นอกจากนี้จากรายงานของ Clifton และคณะ (2004) ซึ่งบ่งชี้ว่าการบริโภคไขมันต่ำที่มีการเติมอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันจะมีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้มากกว่า 3 เท่า เมื่อเทียบกับการบริโภคไขมันต่ำที่มีการเติมสารดังกล่าว

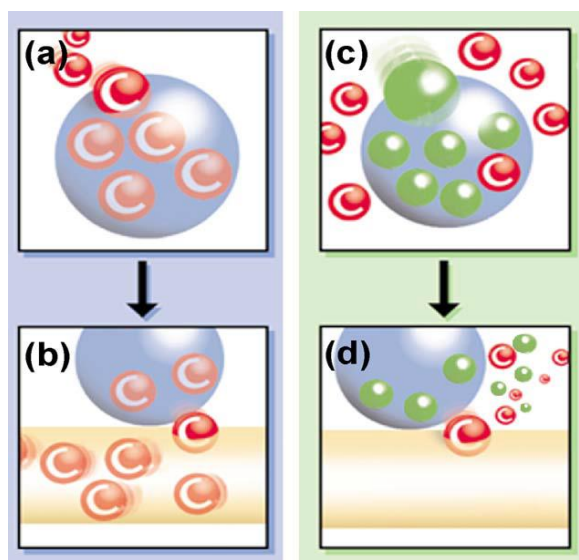
ในรูปอิสระในปริมาณเท่ากัน โดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรปได้ระบุว่าไฟโตสเตอรอลมีความปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหาร (Marangoni และ Poli, 2010)

การมีระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมดหรือปริมาณคอเลสเตอรอลที่รวมตัวกับลิโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำในเลือดสูงนั้น จัดว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคหัวใจ ซึ่งเป็นโรคร้ายแรงที่ก่อให้เกิดการตายของมนุษย์ทั่วโลก (Fernades และ Cabral, 2007) โดยความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลที่บ่งชี้ภาวะการมีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงคือ ≥ 240 มก./ดล. (Shin และคณะ, 2003) ดังนั้นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจคือการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลในเลือดไม่ให้มีปริมาณสูงเกินไป Mel'nikov และคณะ (2004) รายงานว่าการลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือดลงร้อยละ 1 จะทำให้สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจลงได้ประมาณร้อยละ 3 โดยได้เริ่มมีการศึกษาผลของไฟโตสเตอรอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 (Marangoni และ Poli, 2010) ซึ่งผลการวิจัยระบุว่าไฟโตสเตอรอลสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยที่ไม่มีผลข้างเคียงใด ๆ (Wilson และ Rudel, 1994) สอดคล้องกับรายงานของ Lea และ Hepburn (2006) ซึ่งศึกษาความเป็นพิษของไฟโตสเตอรอลในสัตว์ทดลอง พบว่าไม่พบความผิดปกติใด ๆ ในหนู กระต่าย และสุนัขที่ได้รับอาหารที่มีการเติมไฟโตสเตอรอลในปริมาณสูงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี นอกจากนี้ยังไม่พบผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในผู้หญิงที่มีการบริโภคอาหารที่มีการเติมอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและไฟโตสเตอรอล (Lea และ Hepburn, 2006) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของไฟโตสเตอรอลขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ปริมาณ (dosage) และระยะเวลาที่ได้รับ องค์ประกอบและลักษณะทางกายภาพ (physical form) ของไฟโตสเตอรอล และการออกแบบการวิจัย เป็นต้น (Ling และ Jones, 1995) Miettinen และคณะ (1995) รายงานว่าเบต้า-ซิโตสเตอรอล (เบต้า-ซิโตสเตอรอลชนิดที่ไม่มีพันธะคู่) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ดีกว่าเบต้า-ซิโตสเตอรอลเมื่อทดสอบกับมนุษย์ นอกจากนี้ไฟโตสเตอรอลยังแสดงผลร่วม (synergism) ที่ดีเมื่อใช้ร่วมกับยาสแตติน (simvastatin) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ควบคุมปริมาณคอเลสเตอรอลสำหรับผู้ป่วยที่มีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Gylling และคณะ, 1997) Shin และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของการบริโภคเครื่องดื่มที่มีการเติมไฟโตสเตอรอลร้อยละ 0.8 (มีองค์ประกอบของเบต้า-ซิโตสเตอรอลร้อยละ 48 สติกลีเซอรอลร้อยละ 26 และแคมป์สเตอรอลร้อยละ 20) ในผู้ป่วยที่มีระดับไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) และคอเลสเตอรอลในเลือดสูง พบว่าการบริโภคเครื่องดื่มดังกล่าวให้ผลดีในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งโดยปกติแล้วผู้ป่วยดังกล่าวจะบริโภคอาหารที่มีปริมาณไฟโตสเตอรอลต่ำ นอกจากนี้ยังพบผลของการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่มีการบริโภคมาการีนไขมันต่ำร่วมกับนมที่มีการเติมไฟโตสเตอรอล (Madsen และคณะ, 2007) โดยการศึกษาผลของไฟโตสเตอรอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยและคนปกติแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของไฟโตสเตอรอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยและคนปกติ

Phytosterols	Dose	Subject	Decrease in total cholesterol or LDL-cholesterol (%)	References
48% β -sitosterol, 26% stigmasterol and 20% campesterol	1.6 g/d (8 weeks)	Hypercholesterolemia	4.38 (total cholesterol) 8.28 (LDL-cholesterol)	Shin และคณะ (2003)
69% β -sitosterol, 15% campesterol and 8% stigmasterol	2.3 g/d (4 weeks)	Moderately hypercholesterolemia	5.5 (total cholesterol) 7.7 (LDL-cholesterol)	Madsen และคณะ (2007)
71% sitostanol and 29% campestanol	3 g/d (4 weeks)	Non-hypercholesterolemia	13.7 (LDL-cholesterol)	Mensink และคณะ (2002)

กลไกที่มีความเป็นไปได้ของไฟโตสเตอรอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดคือ การลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในทางเดินอาหาร (Fernades และ Cabral, 2007; Marangoni และ Poli, 2010) โดยไฟโตสเตอรอลจะแข่งขันกับคอเลสเตอรอลในการรวมตัวกับน้ำดีในรูปของไมเซล (micelle) (รูปที่ 2) ซึ่งไมเซลดังกล่าวเป็นตัวกลางสำคัญในการลำเลียงสารที่ไม่มีขั้ว โดยเฉพาะไขมัน ผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่เซลล์ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าไฟโตสเตอรอลมีความไม่มีขั้วสูงกว่าคอเลสเตอรอล ดังนั้นการดูดซับไฟโตสเตอรอลในไมเซลจึงน่าจะเกิดขึ้นได้ดีกว่า ทำให้คอเลสเตอรอลที่ไม่ถูกลำเลียงโดยถูกขับถ่ายออกมาพร้อมกับของเสียในร่างกาย อย่างไรก็ตามไฟโตสเตอรอลปริมาณน้อยจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากผนังเซลล์ของลำไส้เล็กสามารถแยกความแตกต่างระหว่างไฟโตสเตอรอลและคอเลสเตอรอลได้เป็นอย่างดี จึงทำให้ไฟโตสเตอรอลส่วนใหญ่ถูกขับออกจากร่างกายพร้อมกับของเสียเช่นเดียวกัน ดังนั้นผลของไฟโตสเตอรอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลจึงไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณของไฟโตสเตอรอล แต่จะขึ้นอยู่กับความสามารถของไฟโตสเตอรอลแต่ละชนิดในการรวมตัวกับสารชนิดอื่น ๆ ในรูปแบบของไมเซล (Rozner และ Garti, 2006)



รูปที่ 2 กลไกของไฟโตสเตอรอลในการลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกาย; การรวมตัวในรูปแบบไมเซลล์ของคอเลสเตอรอล (a), คอเลสเตอรอลถูกเคลื่อนย้ายจากไมเซลล์ไปยังผนังลำไส้และกระแสเลือด (b), การแข่งขันระหว่างไฟโตสเตอรอลและคอเลสเตอรอลในการรวมตัวกับสารชนิดอื่นในรูปแบบไมเซลล์ (c), คอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอลที่ไม่ถูกดูดซึมจะถูกขับออกจากร่างกาย (d)

ที่มา: Rozner และ Garti (2006)

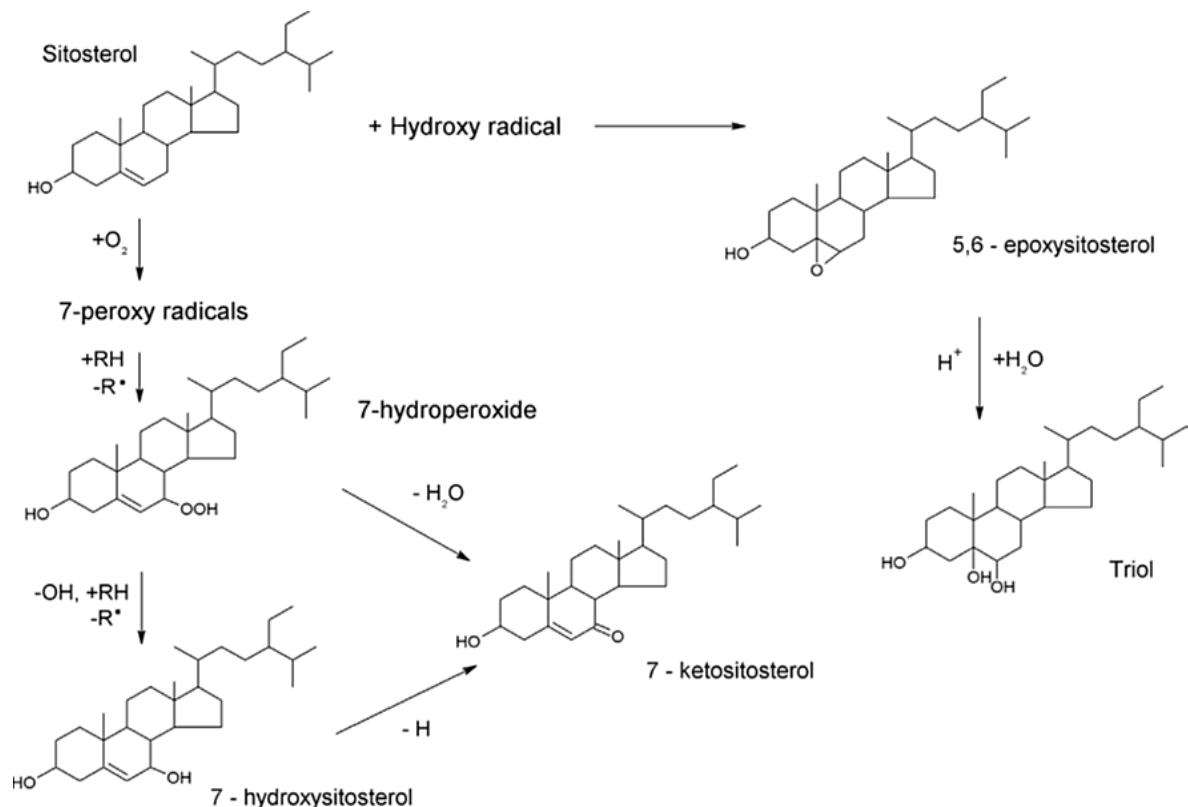
3.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอล

การเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลจะเกิดขึ้นคล้ายคลึงกับที่พบในคอเลสเตอรอล โดยสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากวิถีที่ใช้หรือไม่ใช่เอนไซม์ (Dutta, 2004) ในวิถีที่ไม่ใช่เอนไซม์นั้น สามารถแบ่งการเกิดออกซิเดชันออกเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น ออโตออกซิเดชัน (autooxidation) และ กลไกที่ไม่มีการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น โฟโตออกซิเดชัน (photooxidation) (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) โดยการเกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลจะคล้ายคลึงกับการเกิดออโตออกซิเดชันของกรดไขมัน (Porter และคณะ, 1995) กล่าวคือ ในขั้นเริ่มต้น (initiation) อะตอมไฮโดรเจนจะถูกดึงออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระของสเตอรอล โดยกลไกที่เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต้นยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัดนัก แต่คาดว่าออกซิเจนชนิดที่มีความว่องไวสูง (reactive oxygen species) โลหะ และการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต้น (Dutta และคณะ, 1996) ส่วนการเกิดปฏิกิริยาขั้นต่อเนื่อง (propagation) นั้น เกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจน ($^3\text{O}_2$) ทำให้เกิดอนุมูลเพอรอกซิล และเมื่ออนุมูลอิสระดังกล่าวดึงไฮโดรเจนออกจากไฟโตสเตอรอลโมเลกุลอื่น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฟโตสเตอรอลไฮโดรเพอรอกไซด์ (phytosterol hydroperoxide) ที่แตกต่างกันและทำให้เกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง โดยผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันขั้นปฐมภูมิ (primary products) เหล่านี้ สามารถสลายตัวไปเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิ (secondary products) ได้อย่างหลากหลาย (Dutta และคณะ, 1996) การเริ่มต้นของปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันของสเตอรอลเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระที่ C-7 จากการ

เกิดปฏิกิริยา resonance delocalization ซึ่งเกิดการย้ายตำแหน่งของอนุมูลอิสระไปยังตำแหน่งที่ทำให้โมเลกุลมีพลังงานต่ำสุด โดยการย้ายตำแหน่งของอนุมูลอิสระมายังตำแหน่งที่ 7 เป็นผลมาจากอิทธิพลของพันธะคู่ที่อยู่ระหว่าง C-5 และ C-6 ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันหลักคือ 7-hydroperoxides (Smith, 1987) โดยในระหว่างการให้ความร้อนและการเก็บรักษาพบว่า 7-hydroperoxides สามารถสลายตัวไปเป็น epimeric 7-hydroxysterols และ 7-ketosterols (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) อิพิเมอร์ของ 5, 6-epoxysterols เป็นผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันชนิดทุติยภูมิที่สำคัญชนิดหนึ่ง (รูปที่ 3) แต่มักเกิดขึ้นจากอันตรกิริยาระหว่างไฮโดรเพอรอกไซด์และสเตอรอลที่อยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002; Giuffrida, 2004) จากรายการวิจัยหลายฉบับระบุว่า $5\beta,6\beta$ epoxysterol มีโอกาสเกิดขึ้นได้มากกว่า $5\alpha,6\alpha$ epoxysterol เนื่องจากผลของ steric hindrance ที่มาจากหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-3 (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) แม้ว่าการศึกษาการเกิดออกซิเดชันของสเตอรอลส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การติดตามการเกิดออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล แต่ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันขั้นทุติยภูมิจะเป็นรูปแบบเดียวกัน (Lampi และคณะ, 2002) นอกจากนี้การสูญเสียอะตอมไฮโดรเจนยังเกิดขึ้นได้ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (tertiary carbons) ในโซ่ข้างของไฟโตสเตอรอล โดยจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลสามารถตรวจพบ 24-hydroxysterols (เช่น (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β ,24-diol) และ 25-hydroxysterols (เช่น (24S)-ethylcholest-5,22-dien-3 β ,25-diol) (Johnsson และ Dutta, 2003; Johnsson และคณะ, 2003) ในขณะที่ตรวจพบ 20-hydroxysterols (cholest-5-en-3 β , 20-diol) and 26-hydroxysterols (cholest-5-en- 3 β ,26-diol) เมื่อศึกษาการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล (Smith, 1996) การออกซิเดชันของ brassicasterol และ stigmasterol ที่มีพันธะคู่ระหว่าง C-22 และ C-23 ของโซ่ข้าง ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชัน คือ 5,6;22,23-diepoxysterols (Giuffrida และคณะ, 2004)

การเกิดออกซิเดชันของสเตอรอลเอสเทอร์จะเกิดขึ้นด้วยกลไกการเกิดอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับที่พบในไฟโตสเตอรอลอิสระ (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) นอกจากนี้จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันพบว่าสเตอรอลไฮโดรเพอรอกไซด์ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ C-7 (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) โดยผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของไฮโดรเพอรอกไซด์ดังกล่าว คือ อิพิเมอร์ของ 7-hydroxysterols, 5,6-epoxysterol และ 7-ketosterol รวมทั้ง triol, 20- hydroxysterols, 25- hydroxysterols และอนุพันธ์ 3,5-cholestadien-7-one ซึ่งตรวจพบจากการศึกษาการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (korahani และคณะ, 1982) อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดออกซิเดชันในรูปอิสระและรูปเอสเทอร์จะแตกต่างกัน กล่าวคือในสารละลายต่าง คอเลสเตอรอลอิสระเกิดปฏิกิริยาออกซิไดส์ได้เร็วกว่าคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ แต่ในสภาวะที่มีการให้ความร้อนในสภาวะบรรยากาศหรือละลายในน้ำมันพบการออกซิไดส์ของอนุพันธ์เอสเทอร์ในอัตราที่สูงกว่าในรูปอิสระ (Smith, 1996) นอกจากนี้อัตราการเกิดออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลอิสระที่อยู่ในรูปผลึกจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าคอเลสเตอรอลเอสเทอร์เป็นอย่างมาก แต่เมื่อเกิดการกระจายตัวในน้ำ อัตราการเกิดออกซิเดชันในรูปเอสเทอร์จะเกิดขึ้นได้ช้ากว่า (korahani และคณะ, 1982)

การเกิดออกซิเดชันของสเตอรอลเอสเทอร์อาจเกิดขึ้นได้ทั้งในโมเลกุลของคอเลสเตอรอล และในกรดไขมัน ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันขึ้นปฐมภูมิได้ 3 ชนิด คือ ชนิดที่โมเลกุลของสเตอรอลเกิดการออกซิไดส์แต่กรดไขมันไม่ถูกออกซิไดส์ ชนิดที่ส่วนของสเตอรอลไม่ถูกออกซิไดส์ แต่กรดไขมันเกิดการออกซิไดส์ และชนิดที่เกิดการออกซิไดส์ทั้งส่วนของสเตอรอลและกรดไขมัน (Smith, 1996) เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางโมเลกุลของสเตอรอลเอสเทอร์ทำให้คาดการณ์ได้ว่าการออกซิเดชันจะเกิดขึ้นในโมเลกุลของกรดไขมันก่อนแล้วจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของโมเลกุลสเตอรอลอย่างช้าๆ (Oehrl และคณะ, 2001) Paniangvait และคณะ (1995) ระบุว่า การเกิดออกซิเดชันของสเตอรอลเอสเทอร์อาจเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องภายในโมเลกุล กล่าวคือ กรดไขมันที่ถูกออกซิไดส์จะดึงอะตอมไฮโดรเจนจากส่วนของสเตอรอลที่อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันอย่างต่อเนื่อง โดยการศึกษาทางจุลนพลศาสตร์แสดงให้เห็นว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ในช่วงเริ่มต้นจะเพิ่มขึ้นตามระดับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่มาเชื่อมโยง อย่างไรก็ตามอัตราการออกซิเดชันจะลดลงตามเวลา โดยหลังจากการให้ความร้อนคอเลสเตอรอลเอสเทอร์เป็นเวลามากกว่า 10 ชั่วโมง พบการออกซิไดส์ของคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ที่เชื่อมโยงกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอัตราที่สูงกว่าการออกซิไดส์ของเอสเทอร์ระหว่างคอเลสเตอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัว (korahani และคณะ, 1982) แม้ว่าการศึกษาข้างต้นจะเป็นการศึกษาในคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ แต่เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าการออกซิไดส์ของไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์จะเกิดขึ้นได้ในลักษณะเดียวกัน Yanislleva และ Maslarova (1980) ทำการศึกษาจุลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบต้าซิโตสเตอรอลอิสระและเบต้าซิโตสเตอรอลสเตียเรท พบว่าในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการออกซิเดชันนั้น อนุพันธ์เอสเทอร์จะเกิดการออกซิไดส์ด้วยอัตราที่สูงกว่าเบต้าซิโตสเตอรอลอิสระ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการสะสมของ 7-hydroxysterols และ 7-ketosterols เกิดขึ้นในช่วงหลังของการออกซิเดชัน พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบต้าซิโตสเตอรอลจะเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมาก โดยจากการศึกษาการเกิดออกซิเดชันที่อุณหภูมิ 100°C พบว่าอัตราการเกิดออกซิเดชันของเบต้าซิโตสเตอรอลและเบต้าซิโตสเตอรอลสเตียเรท ในช่วงเริ่มต้นเท่ากับ 1.1×10^{-3} และ 2.1×10^{-2} meq/mole·sec ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด คือ 6.9×10^{-3} และ 2.2×10^{-2} meq/mole·sec ซึ่งพบในช่วงหลังของการเกิดออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ยังมีไม่มากนัก



รูปที่ 3 กลไกการเกิดออกซิเดชันของสเตอรอล

ที่มา: Kmiecik และคณะ (2015)

มีรายงานที่บ่งชี้ถึงผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันชั้นทุติยภูมิอื่น ๆ ซึ่งเกิดขึ้นจากการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ขั้นปฐมภูมิ ซึ่งได้แก่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสูญเสียไฮโดรเจน (sterol dehydration products) เช่น สเตียร์น ผลิตภัณฑ์จากการสูญเสียอะตอมไฮโดรเจน (sterol dehydrogenation products) เช่น monooxygenated sterols ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลแต่ยังคงมีพันธะคู่จำนวน 1 2 หรือ 3 พันธะ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของสเตอรอล (sterol condensation) เช่น disteryl ethers (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) สเตอริน เช่น สเตอร่าไดอิน เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของสเตอรอลที่ไม่ถูกออกซิไดส์และสเตอรอลที่มีพันธะคู่ 2 พันธะที่ตำแหน่ง 3,5 2,4 หรือ 2,5 ส่วนสเตียร์ราไทรอินสามารถเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสูญเสียไฮโดรเจน 2 โมเลกุลของอนุพันธ์สเตอรอลไฮดรอกซิล ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะคู่ 3 พันธะที่ตำแหน่ง 3 4 และ 6 (Bortolomeazzi และคณะ, 2000) หรือเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะคู่ 3 พันธะที่ตำแหน่ง 3 4 และ 22 (Dutta และ Savage, 2002) โดยปฏิกิริยาการสูญเสียไฮโดรเจนของอนุพันธ์ 7-keto ทำให้เกิดการสร้างสเตียร์ราไดอินที่หมู่คีโต ไตสเตียร์ลอีเทอร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการกำจัดน้ำออกจากโมเลกุลของสเตอรอลจำนวน 2 โมเลกุล (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) นอกจากนี้ยังตรวจพบผลิตภัณฑ์ชั้นทุติยภูมิอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นนอกเหนือจากสารประกอบในกลุ่มออกไซด์เมื่อศึกษาการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอล Osada และคณะ (1993) ศึกษาผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลด้วยการให้ความร้อนคอเลสเตอรอลที่อุณหภูมิ $200^{\circ}C$ พบว่ามีการเกิดสารประกอบออกไซด์ค่อนข้างต่ำ และเมื่อ

เปลี่ยนมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C จะตรวจพบปริมาณสารประกอบออกไซด์เพิ่มขึ้นในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการให้ความร้อน และตรวจพบการลดลงของสารดังกล่าวหลังจากนั้น ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าคอเลสเทอรอลและคอเลสเทอรอลออกไซด์เกิดการสลายตัวในระหว่างการให้ความร้อน ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวชนิดอื่น ๆ Kim และ Nawar (1993) ศึกษาการเกิดออกซิเดชันของคอเลสเทอรอลที่อุณหภูมิ 110-180°C เป็นเวลา 80 ชั่วโมง พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นไม่ได้สัมพันธ์กับการออกซิไดส์ของคอเลสเทอรอล ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Nawar และคณะ (1991) ซึ่งพบว่าคอเลสเทอรอลออกไซด์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เกิดจากการออกซิไดส์ของคอเลสเทอรอลเพียงร้อยละ 30 เท่านั้น ส่วนที่เหลือมาจากการสลายตัวของคอเลสเทอรอลผ่านทางวิธีอื่นมากกว่ามาจากการสลายตัวของผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันขั้นปฐมภูมิ ผลที่คล้ายคลึงกันนี้พบในการศึกษาการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลโดย Oerhk และคณะ (2001) เมื่อให้ความร้อนแก่น้ำมันพืชที่อุณหภูมิ 100-180°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของไฟโตสเตอรอลออกไซด์ที่ตรวจวัดได้หลังการให้ความร้อนในน้ำมันที่แตกต่างกันไม่ได้สัมพันธ์กับปริมาณไฟโตสเตอรอลที่ถูกออกซิไดส์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ (polymer formation) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการศึกษาเกี่ยวกับการออกซิเดชันของสเตอรอลจนถึงปัจจุบัน ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในระหว่างการให้ความร้อนเป็นระยะเวลานาน

3.3 เสถียรภาพจากการออกซิเดชันของอาหารที่มีไฟโตสเตอรอลและไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์

มีการตรวจพบผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลในอาหารในช่วงต้นปี ค.ศ. 1960 โดยตรวจพบทั้งผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและสารประกอบสเตอรอลไฮโดรคาร์บอนในระหว่างกระบวนการทำน้ำมันพืชให้บริสุทธิ์ (Soupas และคณะ, 2004) การเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลเกิดขึ้นจากกลไกของการเกิดอนุมูลอิสระเป็นส่วนใหญ่ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดออกซิเดชันในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร เช่น แสง ความร้อน อากาศ น้ำ และอ็อกซิเจนของเหล็กจะมีส่วนช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชันของสเตอรอล (Finocchiaro และ Richardson, 1983; Maerker, 1987) โดยการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลในอาหารจะค่อนข้างซับซ้อน เนื่องจากในอาหารมีองค์ประกอบหลายชนิดจึงทำให้การตรวจติดตามทำได้ยาก ดังนั้นการศึกษากการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลส่วนใหญ่จึงทำในระบบจำลองที่ศึกษาในรูปไฟโตสเตอรอล บริสุทธิ์มากกว่าการทดลองในระบบอาหารจริง ซึ่งอย่างไรก็ตามผลที่ได้จะแตกต่างจากที่เกิดขึ้นในอาหารเนื่องจากอาหารมีองค์ประกอบของไขมันชนิดอื่น ๆ น้ำ โปรตีน และองค์ประกอบอื่นซึ่งอาจมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของสเตอรอล (Chien และคณะ, 1998) นอกจากนี้การเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลยังขึ้นอยู่กับระบบที่ใช้ในการศึกษา เช่น อุณหภูมิ เวลาที่เกิดการออกซิเดชัน และพีเอช เป็นต้น (Kim และ Nawar, 1993)

Blekas และ Boskou (1989) ศึกษาการให้ความร้อนสติกมาสเตอรอล (ร้อยละ 5) ในระบบไตรเอซิลกลีเซอรอลผสมที่อุณหภูมิ 180°C พบผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของสติกมาสเตอรอลจำนวน 11 ชนิด เช่น 7-hydroxides, 5,6-epoxides และสเตอรอลไฮโดรคาร์บอน เช่น stismasta-3,5,22-triene, stismasta-3,5,22-triene-7-one และ stismasta-4,22-dien-3-one ผลิตภัณฑ์ที่คล้ายคลึงกันนี้พบในการให้ความร้อนเบต้าซิโตสเตอรอล (ร้อยละ 5) ที่อยู่ในระบบไตรสเตียรีน น้ำมันหมู และน้ำมันเมล็ดทานตะวันที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยอัตราการออกซิเดชันของเบต้าซิโตสเตอรอลจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของระดับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันในน้ำมันที่ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตามหากเบต้าซิโตสเตอรอลอยู่ในระบบของน้ำมันที่มีความอิ่มตัวสูง เบต้าซิโตสเตอรอลจะมีความไวต่อการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอล (Yanishlieva-Maslarova และ Marinova-Tasheva, 1986) เมื่อพิจารณาการสูญเสียไฟโตสเตอรอลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้ว พบว่าเสถียรภาพต่อการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลจะขึ้นอยู่กับระดับความไม่อิ่มตัวของโครงสร้างในวงแหวนสเตอรอล กล่าวคือ เบต้าซิโตสเตอรอลซึ่งไม่มีพันธะคู่ภายในวงแหวนจะมีความเสถียรภาพจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด ในขณะที่ ergosterol ที่มีพันธะคู่ 2 พันธะอยู่ในโครงสร้างวงแหวนจะมีเสถียรภาพต่ำที่สุดในระบบที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใน mineral oil หรือน้ำมันเรพชิตแล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงนี้จะทำให้เกิดการสูญเสียไฟโตสเตอรอลในอัตราที่เพิ่มขึ้นตามระดับของความไม่อิ่มตัวของน้ำมันที่ใช้ (Lampi และคณะ, 1999) ผลที่คล้ายคลึงกันพบในรายงานของ Lampi และคณะ (2000) เมื่อไฟโตสเตอรอลถูกให้ความร้อนในระบบของไตรปาล์มิตินและน้ำมันเรพชิตที่อุณหภูมิ 180°C โดยการให้ความร้อนในระบบของไตรปาล์มิตินจะพบการลดลงของไฟโตสเตอรอลน้อยกว่าร้อยละ 10 หลังจากให้ความร้อนเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ในขณะที่พบการสูญเสียไฟโตสเตอรอลประมาณร้อยละ 80 เมื่ออยู่ในน้ำมันเรพชิตหลังจากการให้ความร้อนในระยะเวลาเท่ากัน โดยพบทั้งการสูญเสียไฟโตสเตอรอลและการสะสมของสเตอรอลออกไซด์ในน้ำมันคาโนล่า น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วลิสง และน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 150 และ 180°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในการศึกษาปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระบบที่มีการเติมเบต้า-ซิโตสเตอรอลความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/100 กรัม ของน้ำมัน แล้วจึงนำไปให้ความร้อน พบว่าปริมาณไฟโตสเตอรอลจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการให้ความร้อน แสดงให้เห็นว่ามีการเกิดไฟโตสเตอรอลออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น โดยการให้ความร้อนน้ำมันคาโนล่าที่อุณหภูมิ 100°C พบการลดลงของปริมาณเบต้า-ซิโตสเตอรอลและแคมป์สเตอรอล ร้อยละ 32 และ 33 และเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C จะเกิดการสูญเสีย เบต้า-ซิโตสเตอรอลและแคมป์สเตอรอลร้อยละ 94 และ 95 ตามลำดับ นอกจากนี้การสูญเสียไฟโตสเตอรอลยังพบได้สูงในน้ำมันคาโนล่าและน้ำมันถั่วเหลืองเมื่อเทียบกับในน้ำมันที่มีความอิ่มตัวสูง เช่น เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C จะเกิดการสูญเสียแคมป์สเตอรอลในน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 56 ในขณะที่ในน้ำมันมะพร้าวจะเกิดการสูญเสียแคมป์สเตอรอลไปเพียงร้อยละ 8 และสูญเสียเบต้า-ซิโตสเตอรอลร้อยละ 16 อย่างไรก็ตามเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180°C จะเกิดการ

สูญเสียเบต้า-ซีโตสเตอรอลในน้ำมันมะพร้าวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 98 และสูญเสียแคมป์สเตอรอลไปร้อยละ 97 (Oehrl และคณะ, 2001)

การศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ในระบบอาหาร และผลจากกระบวนการแปรรูปและกระบวนการเก็บรักษาต่อการเกิดออกซิเดชันของสารดังกล่าวยังมีค่อนข้างน้อย โดยการศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาผลของกระบวนการทำบริสุทธิ์น้ำมันต่อปริมาณไฟโตสเตอรอลในน้ำมัน การสูญเสียไฟโตสเตอรอลบางส่วนเป็นผลมาจากขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์น้ำมัน กล่าวคือการสูญเสียไฟโตสเตอรอลเนื่องจากจากปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่ได้มีความสำคัญมากนัก (Piironen และคณะ, 2000) จากรายงานของ Nourooz-Zadeh และ Appelqvist (1992) ระบุว่าไม่พบการเพิ่มขึ้นของไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับน้ำมันดิบ และจากการศึกษาปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในน้ำมันเรพซีดที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูง พบปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ทั้งหมด 70 ไมโครกรัม/กรัม ภายหลังจากนำน้ำมันดังกล่าวไปผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน และเมื่อผ่านกระบวนการกำจัดกลิ่นจะตรวจพบปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในช่วง 69-74 ไมโครกรัม/กรัม ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ (Lambelet และคณะ, 2003) โดยสารประกอบออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้มาจากการออกซิไดส์ที่ C-7 เป็นหลัก (Lambelet และคณะ, 2003) นอกจากนี้ในการศึกษาปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในน้ำมันถั่วลิสง น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันมะกอกที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์จะมีปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ 2.6-9.6 ไมโครกรัม/กรัม 4.5-67.5 ไมโครกรัม/กรัม 4.1-60.2 ไมโครกรัม/กรัม และ 1.5-5.5 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ (Bortolomeazzi และคณะ, 2003) ซึ่งประกอบด้วย 7-hydroxysterols และ 7-ketosterols เป็นหลัก โดยกระบวนการฟอกสีมีผลอย่างยิ่งต่อการลดลงของปริมาณ 7-hydroxysterols แต่จะพบการเพิ่มขึ้นของสเตอรอลไฮโดรคาร์บอน (เช่น steratrienes) โดยภายหลังจากกระบวนการกำจัดกลิ่นจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสูญเสีย (Bortolomeazzi และคณะ, 2003) ในการศึกษาปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในน้ำมันพืชที่ผ่านการใช้งานแล้ว ผลที่ได้จะมีความแปรปรวนสูงเนื่องจากการใช้วิธีในการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน โดยอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของน้ำมันในระหว่างการให้ความร้อนแต่ละวิธีอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งต่อการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลในน้ำมัน Lampi และคณะ (2002) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบต้า-ซีโตสเตอรอลและแคมป์สเตอรอลในน้ำมันเรพซีด โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าสเตอรอลในรูปบริสุทธิ์เมื่อผ่านการให้ความร้อนในสภาวะเดียวกัน โดยปริมาณสารประกอบออกไซด์ทั้งหมดและสารประกอบออกไซด์แต่ละชนิดจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงเวลาของการให้ความร้อน และหลังจากการให้ความร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะตรวจพบปริมาณออกไซด์ของเบต้าซีโตสเตอรอลและแคมป์สเตอรอล (7-hydroxysterols, 5,6-epoxysterols, 7-ketosterols และ 25-hydroxysterols) ในปริมาณ 646 ไมโครกรัม/กรัม และ 452 ไมโครกรัม/กรัม น้ำมัน ตามลำดับ และเมื่อให้ความร้อนน้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันมะกอกที่อุณหภูมิ 150 และ 200°C เป็นเวลา 60 นาที จะตรวจพบปริมาณเบต้าซีโตสเตอรอลออกไซด์ (7-hydroxysterols, 5,6-epoxysterols, 7-ketosterols และ triol) เท่ากับ 241 ไมโครกรัม/กรัม

และ 815 ไมโครกรัม/กรัม ในน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ 37 ไมโครกรัม/กรัม และ 365 ไมโครกรัม/กรัม ในน้ำมันมะกอก ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นจากการออกซิเดชันตลอดระยะเวลาของการให้ความร้อนน้ำมัน คือ 7-ketosterols (Zhang และคณะ, 2005) ในการศึกษาอื่น ๆ ที่มีการให้ความร้อนน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันถั่วลิสง ที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลาต่าง ๆ พบว่าปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ทั้งหมดหลังการให้ความร้อนเป็นเวลา 60 นาที เท่ากับ 24 32 77 และ 77 ไมโครกรัม/กรัม น้ำมัน ตามลำดับ (Dutta และ Svage, 2002) นอกจากนี้ Dutta (1997) ได้ทำการตรวจสอบปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันเรพซีดและน้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันเมล็ดทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูง ทั้งก่อนและหลังการใช้ทอด เฟรนช์ฟรายด์เป็นเวลา 2 วัน พบผลิตภัณฑ์จากการออกซิไดส์ของเบต้าซิโตสเตอรอล เช่น 7-hydroxy 5,6-epoxy 7-keto และอนุพันธ์ triol ของเบต้าซิโตสเตอรอลเป็นหลัก รวมทั้งพบสารประกอบออกไซด์ของแคมป์สเตอรอล และ สเตกมาสเตอรอล ในปริมาณเล็กน้อย โดยชนิดของสารประกอบออกไซด์หลักที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันตามชนิดของน้ำมัน โดยสารประกอบออกไซด์ชนิดหลักที่ตรวจพบในน้ำมันทุกชนิด คือ 5,6-epoxysterols 7-ketosterols หรือ 7 α -hydroxysterols โดยพบการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของปริมาณสารประกอบออกไซด์ในระหว่างการเก็บรักษาน้ำมันผสมระหว่างเรพซีดและน้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันเมล็ดทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกเป็นเวลา 2 วัน โดยมีปริมาณสารประกอบออกไซด์หลังการเก็บรักษาในปริมาณ 59 57 และ 56 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ (Dutta, 1997) เมื่อเก็บรักษาน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ปี จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณเบต้า-ซิโตสเตอรอลออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะเวลาเริ่มต้น โดยปริมาณสารประกอบออกไซด์ในน้ำมันมีค่าต่ำกว่า 0.2 ไมโครกรัม/กรัม ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา (Nourooz-Zadeh และ Appelqvist, 1992) อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำมันเมล็ดทานตะวันไว้ในขวดโปร่งแสงเป็นเวลา 40 ปี จะมีระดับการออกซิเดชันเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 13 ชั่วโมง โดยพบการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลสูงกว่าในกรดไขมัน (Yanishlieva และ Schillar, 1983) ได้มีการศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลในอาหารบางชนิดที่มีการเติมไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ เช่น ไขมันที่ใช้ในการปาดทา กาแฟ แป้งสาลี นม สำหรับทารก เฟรนช์ฟรายด์ และมันฝรั่งแผ่น Johnsson และ Dutta (2006) ตรวจพบปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ไขมันที่ใช้ในการปาดทามีค่าเท่ากับ 12 ไมโครกรัม/กรัม ในขณะที่ Grandgirard และคณะ (2004) พบปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว 68 ไมโครกรัม/กรัม สารประกอบออกไซด์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ไขมันประเภทปาดทาประกอบด้วย 7-hydroxysterols 5,6-epoxystereols 7-ketosterols และ triol (Grandgirard และคณะ, 2004; Conchillo และคณะ, 2005; Johnsson และ Dutta, 2006) 24-hydroxystereols (Johnsson และ Dutta, 2006) 6-hydroxysterols และ 6-ketosterols (Grandgirard และคณะ, 2004) ปริมาณสารประกอบออกไซด์ของเบต้า-ซิโตสเตอรอลและแคมป์สเตอรอลในมันฝรั่งแผ่นที่ผ่านการทอดในน้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และในน้ำมันเมล็ดทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูง ซึ่งผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 0-25 สัปดาห์ ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง โดยปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ในมันฝรั่งแผ่นเริ่มต้น คือ 5 46 และ 35 ไมโครกรัม/กรัม ของไขมัน

ตามลำดับ โดยพบปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์สูงที่สุดในมันฝรั่งแผ่นที่ผ่านการทอดด้วยน้ำมันเมล็ดทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงที่เก็บรักษาเป็นเวลา 25 สัปดาห์ ซึ่งมีปริมาณไฟโตสเตอรอลออกไซด์ 59 ไมโครกรัม/กรัมไขมัน (19 ไมโครกรัม/กรัมของมันเป็นฝรั่ง) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ 7-hydroxy- 5,6-epoxy 7-keto และ triol ของ เบต้า-ซิโตสเตอรอลและแคมป์สเตอรอล (Dutta และ Appelqvist, 1997) นอกจากนี้ Lee และคณะ (1985) ได้รายงานผลการติดตามปริมาณสารประกอบออกไซด์ในมันฝรั่งที่ผ่านการทอดด้วยน้ำมันเมล็ดฝ้ายแล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40°C โดยตรวจพบไฟโตสเตอรอลออกไซด์หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 95 วัน ซึ่งมีผลิตภัณฑ์หลัก คือ 7 α -hydroxysitosterols (13 ไมโครกรัม/กรัมไขมัน) 7 β -hydroxysitosterols (9 ไมโครกรัม/กรัมไขมัน) และ 5,6 epoxysitosterols (6 ไมโครกรัม/กรัมไขมัน) ในขณะที่การศึกษาปริมาณสารประกอบออกไซด์ในผลิตภัณฑ์เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (23°C) นั้น จะไม่สามารถตรวจพบสารประกอบออกไซด์ในผลิตภัณฑ์แม้ว่าจะเก็บรักษาเป็นเวลา 150 วันก็ตาม

4. ระเบียบวิธีการวิจัย

4.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันที่เร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมัน โดยใช้เบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) ซึ่งเป็นไฟโตสเตอรอลชนิดที่พบมากที่สุด ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิ่มตัวชนิดสายสั้น (hexanoic acid) สายกลาง (lauric acid) และสายยาว (palmitic acid) รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (oleic acid) ตามลำดับ (รูปที่ 4) ตามวิธีของ Panpipat และคณะ (2013) โดยใช้ไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* ชนิด A เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์อนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันที่เกิดขึ้นในแต่ละชุดการทดลองด้วยการกำจัดกรดไขมันที่ไม่ทำปฏิกิริยา การกำจัดสเตอรอลอิสระด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และการทำอนุพันธ์เอสเทอร์ให้เข้มข้น (รายละเอียดตามข้อ 2) เก็บตัวอย่างอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันบริสุทธิ์แต่ละชนิดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

180 °C ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวแสดงถึงการพาสเจอไรซ์ สเตอริไลซ์ และการทอด ตามลำดับ ทำการสุ่มตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาของการให้ความร้อน แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) *p*-anisidine ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอล (7-คีโตซีโตสเตอรอล) และไฟโตสเตอรอลที่ไม่ถูกออกซิไดส์ (non-oxidized phytosterol) โดยใช้เบต้า-ซีโตสเตอรอล เป็นตัวอย่างควบคุม จากนั้นทำการสร้างกราฟจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของการเกิดออกซิเดชันของเบต้า-ซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์ของเบต้า-ซีโตสเตอรอลและกรดไขมันชนิดต่างๆ

4.4 การศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบตัวทำละลายที่เป็นไขมันและระบบจำลองอิมัลชัน

4.4.1 การศึกษาในระบบที่มีไขมันเป็นตัวทำละลาย

ทำการละลายเบต้า-ซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์ของเบต้า-ซีโตสเตอรอลและกรดไขมันชนิดต่างๆ ให้มีปริมาณร้อยละ 1 ใน tripalmitin (ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 85) จากนั้นบรรจุตัวอย่างแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ปริมาณ 5 กรัม ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55 °C ในช่วงเวลาต่างๆ นำตัวอย่างที่สุ่มได้ในแต่ละช่วงเวลามาวิเคราะห์ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ TBARS *p*-anisidine TBARS ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอล (7-คีโตซีโตสเตอรอล) และไฟโตสเตอรอลที่ไม่ถูกออกซิไดส์

4.4.2 การศึกษาในระบบอิมัลชันชนิดไขมันในน้ำ

ทำการเตรียมอิมัลชันด้วยการปั่นผสม tripalmitin ร้อยละ 15 กับสารละลาย polyoxyethylene 23 lauryl ether (Brij35; ร้อยละ 1.5 ใน 10 mM acetate-imidazole buffer, pH 7.0) โดยทำการแทนที่ไขมันด้วยเบต้า-ซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์ของเบต้า-ซีโตสเตอรอลและกรดไขมันชนิดต่างๆ ปริมาณร้อยละ 5 ของไขมันทั้งหมด นำของผสมที่ได้ไปโฮโมจีไนส์ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบรรจุตัวอย่างในหลอดทดลอง หลอดละ 5 กรัม เก็บรักษาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 55 °C ในช่วงเวลาต่างๆ นำตัวอย่างที่สุ่มได้ในแต่ละช่วงเวลามาวิเคราะห์ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ *p*-anisidine ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอล (7-คีโตซีโตสเตอรอล) และไฟโตสเตอรอลที่ไม่ถูกออกซิไดส์

4.5 การศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบอาหารประเภทไขมัน

ทำการผลิตมาการีนที่มีการเติมเบต้า-ซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์ของเบต้า-ซีโตสเตอรอลและกรดไขมันชนิดต่างๆ ปริมาณ 1.7 กรัม/มาการีน 100 กรัม โดยส่วนของเฟสไขมัน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 80 ขององค์ประกอบของมาการีนทั้งหมด ประกอบไปด้วย ไขมันและน้ำมันร้อยละ 79.3 และ Dimodan ซึ่งใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ ร้อยละ 0.7 ในส่วนเฟสที่ละลายในน้ำประกอบด้วย เกลือแกงร้อยละ 1 และกรดซิตริกร้อยละ 0.05 การผลิตมาการีนเริ่มต้นจากการหลอมเหลวส่วนของไขมันที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วทำการละลายอิมัลซิไฟเออร์ในไขมันที่ผ่านการหลอมเหลวแล้วปริมาณเล็กน้อย

จากนั้นจึงนำอิมัลชันไฟเออร์มาผสมกับส่วนของไขมันเหลวในอ่างผสม ในส่วนของเฟสที่ละลายในน้ำนั้น ทำการแยกเตรียมสารละลายเกลือแกงและกรดซัลฟิวริกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 °ซ จากนั้นค่อยๆ เติมเฟสที่ละลายน้ำลงในเฟสของไขมันในสภาวะที่มีการปั่นผสมอย่างต่อเนื่อง ทำการเก็บรักษามารุ่นที่เตรียมได้ในกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิ 25 และ 55 °ซ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 20 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ *p*-anisidine ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอล (7-คีโตซีโตสเตอรอล) และไฟโตสเตอรอลที่ไม่ถูกออกซิไดส์

4.6 วิธีการวิเคราะห์

4.6.1 การวิเคราะห์ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide value, HPV) ทำการวิเคราะห์ค่าไฮโดรเปอร์ออกไซด์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Shantha และ Decker (1994)

4.6.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอล (7-คีโตซีโตสเตอรอล)ตามวิธีของ Soupas และคณะ (2004) ด้วยเครื่อง gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

4.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณไฟโตสเตอรอลที่ไม่ผ่านการออกซิไดส์ ทำการวิเคราะห์ปริมาณไฟโตสเตอรอลที่ไม่ผ่านการออกซิไดส์ด้วยวิธี hot saponification ซึ่งพัฒนาโดย Lampi และคณะ (2002)

4.6.4) การวิเคราะห์ค่า *p*-anisidine (*p*-AV) ตามวิธีของ IUPAC (1987)

4.6.5) การวิเคราะห์ค่า thiobarbitutic reactive substance (TBARS) ตามวิธีของ Ke และ Woyewoda (1979)

4.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ตาราง Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan' Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (SPSS for window)

5. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

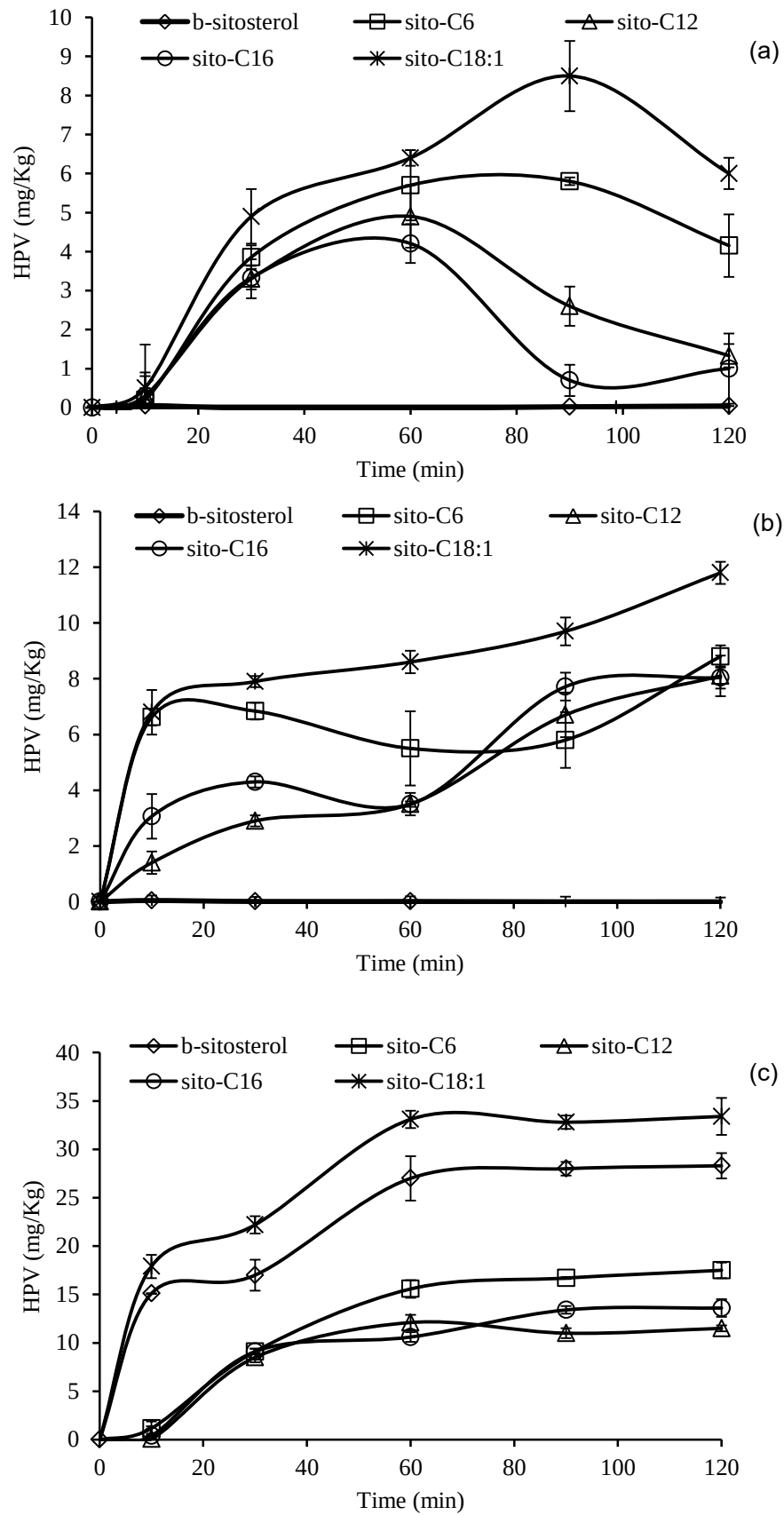
5.1 การศึกษาผลของกระบวนการให้ความร้อนที่ระดับต่างๆ ต่อเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมัน

ไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ขั้นต้นที่เกิดขึ้นจากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์ โดยการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลจะเริ่มต้นจากอะตอมไฮโดรเจนถูกดึงออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระของสเตอรอล โดยออกซิเจนชนิดที่มีความว่องไวสูง (reactive oxygen species) โลหะ และอุณหภูมิในระดับที่สูง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต้นได้ (Dutta และคณะ, 1996) ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันหลัก คือ 7-hydroperoxides (Smith, 1987) จากปฏิกิริยา resonance delocalization ซึ่งเกิดการย้ายตำแหน่งของอนุมูลอิสระไปยังตำแหน่งที่ทำให้

โมเลกุลมีพลังงานต่ำสุด นอกจากนี้จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าสเตอรอลไฮโดรเพอรอกไซด์ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ C-7 (Lercker และ Rodriguez-Estrada, 2002) ผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันขั้นปฐมภูมิ (primary products) เหล่านี้ สามารถสลายตัวไปเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิ (secondary products) ได้อย่างหลากหลาย (Dutta และคณะ, 1996) ดังนั้นการติดตามค่าไฮโดรเพอรอกไซด์จึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์ได้ จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์ โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 100 และ 180 °C เพื่อแสดงถึงการให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์ สเตอริไลส์ และการทอดตามลำดับ เมื่อทำการติดตามค่า HPV ที่เวลาการให้ความร้อนต่าง ๆ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 60 °C (รูปที่ 1a) และ 100 °C (รูปที่ 1b) ซิโตสเตอรอลเอสเทอร์จะออกซิไดส์ได้สูงกว่าซิโตสเตอรอลในรูปอิสระตลอดระยะเวลาของการให้ความร้อน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากที่อุณหภูมิในระดับดังกล่าวซิโตสเตอรอลอิสระมีสถานะเป็นผลึกของแข็ง เนื่องจากมีจุดหลอมเหลวสูง (134.1 °C) ซึ่งผลึกดังกล่าวจะมีเสถียรภาพต่อการเกิดออกซิเดชันเนื่องจากเกิดการสัมผัสกับออกซิเจนได้น้อยกว่าในรูปที่เป็นของเหลว ในขณะที่ซิโตสเตอรอลเอสเทอร์แต่ละชนิดจะมีลักษณะเป็นของเหลวหรือเป็นของเหลวบางส่วน ส่งผลให้ที่ระดับอุณหภูมิดังกล่าวซิโตสเตอรอลในรูปอิสระเกิดการออกซิไดส์ได้ต่ำกว่าในรูปเอสเทอร์ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Lehtonen และคณะ (2011) และ Lehtonen และคณะ (2012) ซึ่งระบุว่าการศึกษาไฮดรอกซีของกรดไขมันมีผลให้คอเลสเตอรอลเอสเทอร์เกิดการออกซิไดส์ได้สูงกว่าในรูปอิสระเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เมื่อเปรียบเทียบระหว่างซิโตสเตอรอลเอสเทอร์แต่ละชนิด พบว่า sito-C18:1 เกิดการออกซิเดชันได้สูงสุด รองลงมาคือ sito-C6 > sito-C12 > sito-C16 (ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความไม่อิ่มตัวของกรดโอเลอิกที่เชื่อมโยงในโมเลกุลของ sito-C18:1 ส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันในอัตราที่สูง ส่วน sito-C6 นั้น จะมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าเอสเทอร์ที่เหลือ ดังนั้นที่อุณหภูมิดังกล่าวจึงทำให้ sito-C6 อยู่ในสถานะที่เป็นของเหลวมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ sito-C12 และ sito-C16 จึงทำให้ออกซิเจนสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ง่าย โดย Panpipat และคณะ (2013) รายงานจุดหลอมเหลวของ sito-C6 sito-C12 และ sito-C16 เท่ากับ 67.7 °C 79.5 °C และ 89.6 °C ตามลำดับ ดังนั้นที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C sito-C6 จะมีลักษณะเป็นของเหลวมากที่สุด รองลงมาคือ sito-C12 และ sito-C16 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลาไม่เกิน 30 นาที ค่า HPV ของซิโตสเตอรอลเอสเทอร์ทุกชนิดมีอัตราการเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่เมื่อให้ความร้อนมากกว่า 30 นาที sito-C6 จะมีอัตราการออกซิเดชันสูงกว่าเอสเทอร์ชนิดอื่น ๆ (ยกเว้นในกรณีของ sito-C18:1) ซึ่งอาจเป็นผลที่เกิดจากอิทธิพลของลักษณะทางกายภาพ กล่าวคือ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C จะเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของซิโตสเตอรอลเอสเทอร์ทุกชนิด ทำให้ในช่วงแรกการออกซิไดส์ของสารดังกล่าวจะไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเวลาของการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น sito-C6 จะเปลี่ยนสถานะไปเป็นของเหลวมากที่สุดเนื่องจากมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง จึงทำให้อัตราการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าสารชนิดอื่นเมื่อมีการให้ความร้อนเป็นเวลานาน นอกจากนี้เป็นที่สังเกตว่าค่า HPV ของซิโตสเตอรอลเอส

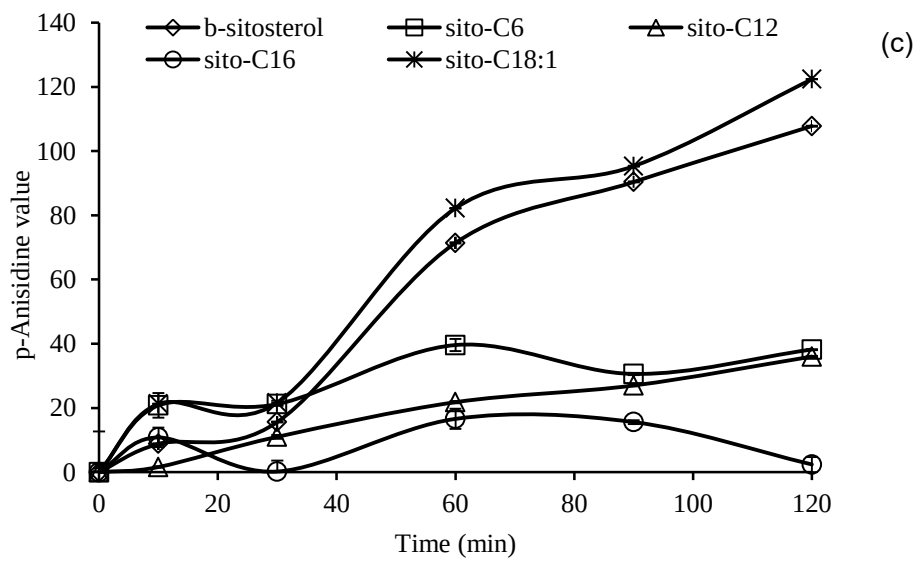
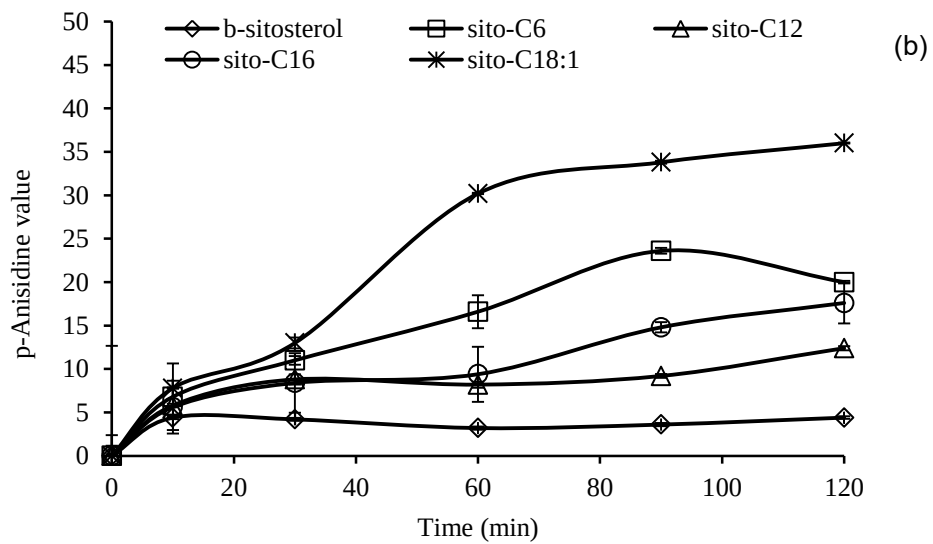
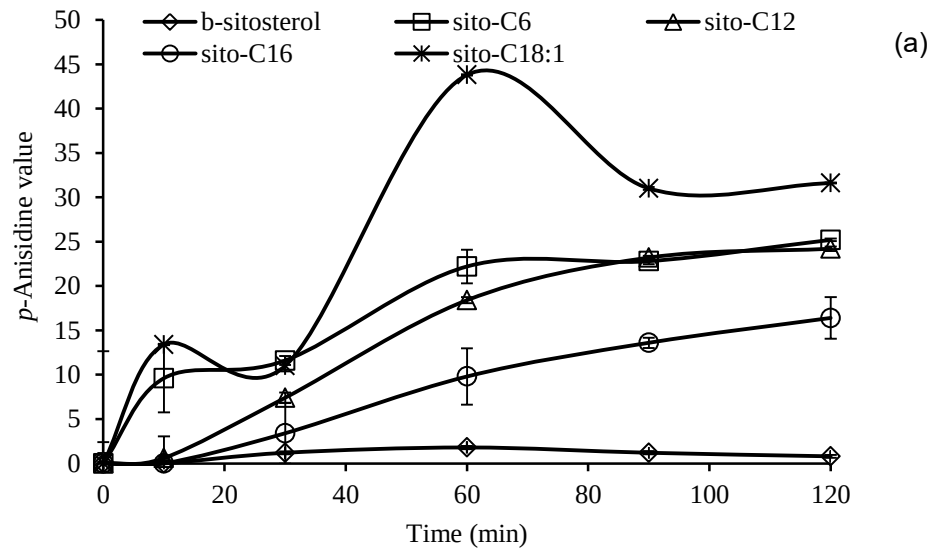
เทอร์เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C จะมีแนวโน้มลดลงหลังจากเวลาให้ความร้อนผ่านไป 60 นาที (รูปที่ 5a) แสดงให้เห็นว่าอัตราการสร้าง HPV จะต่ำกว่าอัตราการสลายตัวของสารดังกล่าวไปเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิ โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C (รูปที่ 5b) จะทำให้เห็นผลที่ชัดเจนขึ้นถึงอิทธิพลของโครงสร้างที่แตกต่างกันของกรดไขมันที่มาเอสเทอร์ไฟต์ กล่าวคือ การเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะทำให้เกิดการออกซิเดชันที่สูงที่สุด ส่วนในกรณีของการเอสเทอร์ไฟต์ด้วยกรดไขมันอิ่มตัวนั้น การเอสเทอร์ไฟต์ด้วยกรดไขมัน C6 ซึ่งทำให้เกิดการลดลงของจุดหลอมเหลวของซิโตสเตอรอลมากที่สุดนั้น และเมื่อนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C สารดังกล่าวจะเกิดการออกซิไดส์ได้สูงกว่า sito-C12 และ sito-C16 ตามลำดับ ซึ่งพบผลดังกล่าวในช่วง 60 นาทีแรกของการให้ความร้อน แต่เมื่อเวลาในการให้ความร้อนนานขึ้นจะทำให้้อัตราการเกิดออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลเอสเทอร์ทุกชนิดที่มีการเอสเทอร์ไฟต์ด้วยกรดไขมันอิ่มตัวมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเอสเทอร์ดังกล่าวเกิดการหลอมเหลวได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 100 °C ส่งผลให้สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้การเอสเทอร์ไฟต์ของกรดไขมันที่มีความยาวของสายโซ่แตกต่างกันในโมเลกุลของซิโตสเตอรอลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 อาจส่งผลให้เกิดความทะอะทะของโมเลกุล (steric hindrance) ในการเข้าทำปฏิกิริยาของ initiator หรือ ออกซิเจน อย่างไรก็ตามผลจากการกรดไขมันอิ่มตัวที่เอสเทอร์ไฟต์ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลนั้น ไม่น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญเนื่องจากกรดไขมันเหล่านี้จะเกิดการออกซิเดชันได้ต่ำ จำเป็นจะต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาหรือเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมากจึงจะเกิดการออกซิไดส์ได้ ดังนั้นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C จึงน่าจะไม่มีผลเหนี่ยวนำให้กรดไขมันอิ่มตัวเกิดการออกซิไดส์ได้

เมื่อพิจารณาผลของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °C พบว่า ผลที่ได้จะสวนทางกับที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C (รูปที่ 5c) กล่าวคือ ซิโตสเตอรอลอิสระจะเกิดการออกซิไดส์ได้สูงกว่าในรูปเอสเทอร์กับกรดไขมันอิ่มตัว อย่างไรก็ตาม sito-C18:1 ยังคงเกิดการออกซิเดชันได้สูงสุด ซึ่งที่อุณหภูมิดังกล่าวสารทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองจะเกิดการหลอมเหลวได้ ดังนั้นอิทธิพลจากสถานะของสารจึงไม่มีผลต่อการออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามการมีโซ่ข้างของกรดไขมันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 อาจทำให้เกิดความทะอะทะของโมเลกุล ส่งผลให้ initiator เข้าทำปฏิกิริยากับซิโตสเตอรอลได้ยากขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Soupas และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าการออกซิไดส์ของไฟโตสเตอรอลอิสระจะสูงกว่าไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 180 °C จะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C (รูปที่ 5c) อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิดังกล่าวเอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวทุกชนิดจะมีอัตราการเกิดออกซิเดชันในระดับที่ใกล้เคียงกัน



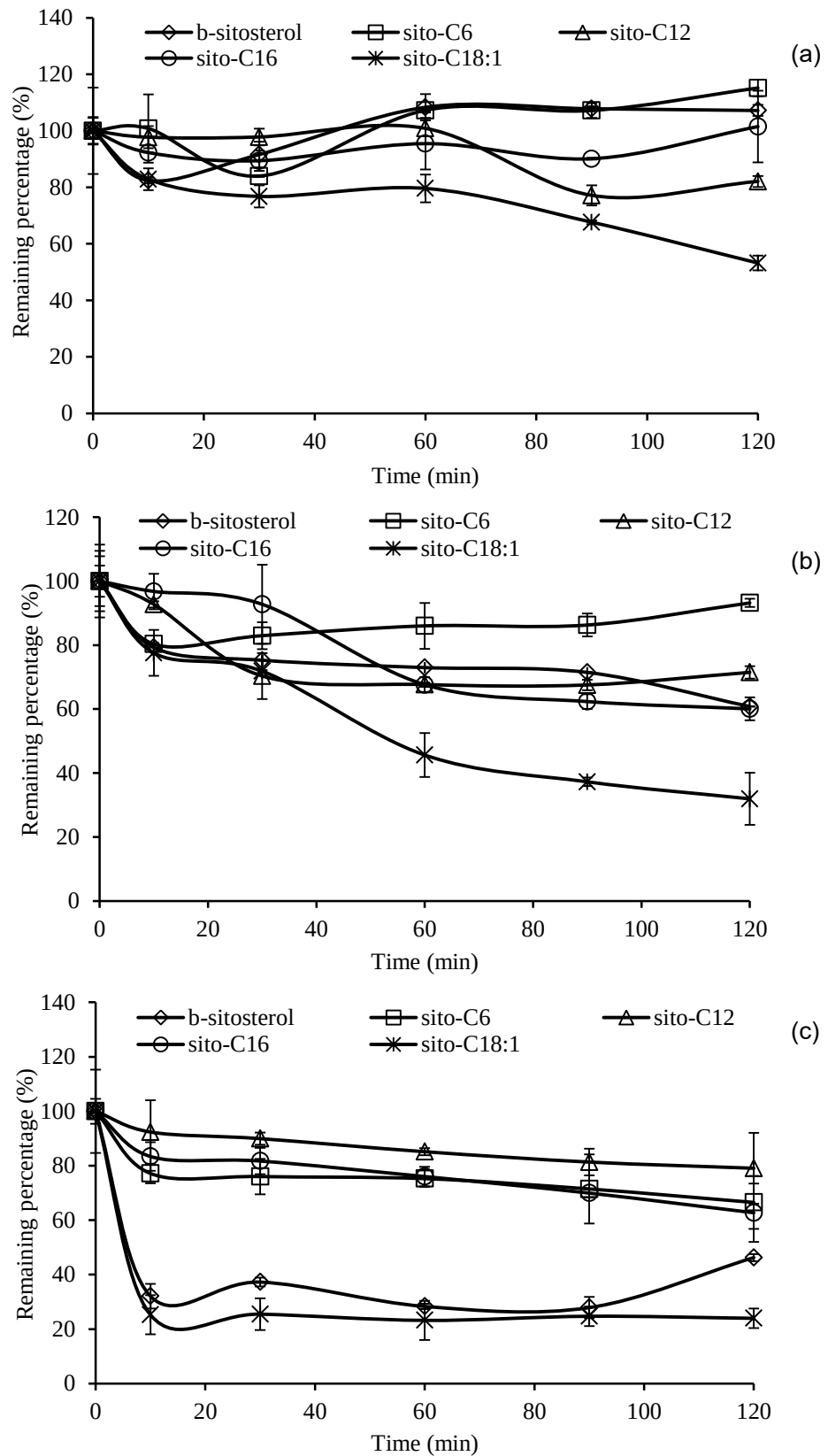
รูปที่ 5 ค่า HPV ของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.

ค่า *p*-AV บ่งชี้ปริมาณสารประกอบในกลุ่มแอลดีไฮด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 2-แอลคีนาล (2-alkenals) และ 2, 4-แอลคาไดอีนาล (2, 4-alkadienals) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยสารประกอบแอลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับสาร *p*-anisidine ภายใต้สภาวะกรดทำให้เกิดสารประกอบที่ให้สีเหลือง โดยค่า *p*-AV ของซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 100 และ 180 °C แสดงดังรูปที่ 6 โดยผลที่ได้จะสอดคล้องกับค่า HPV กล่าวคือ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C ซีโตสเตอรอลเอสเทอร์จะเกิดการออกซิไดส์ได้สูงกว่าในรูปอิสระ (รูปที่ 6a และ 6b) แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมาก (180 °C) ค่า *p*-AV ของซีโตสเตอรอลอิสระจะสูงกว่าอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัว แต่ต่ำกว่า sito-C18:1 (รูปที่ 6c) โดยแนวโน้มของค่า *p*-AV จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการให้ความร้อน โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ค่า *p*-AV มีค่าสูงขึ้น บ่งชี้ถึงการเกิดออกซิเดชันในอัตราที่สูงขึ้น ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Lehtonen และคณะ (2011) ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิจากการออกซิไดส์คอเลสเตอรอลและคอเลสเตอรอล-สเตียเรทที่อุณหภูมิ 100 °C ในระยะเวลา 4 วัน โดยเอสเทอร์จะเกิดการออกซิไดส์ได้สูงกว่าในรูปอิสระ เมื่อพิจารณาถึงผลของการเอสเทอริฟิเคชันของกรดไขมัน พบผลในลักษณะที่คล้ายคลึงกันกับค่า HPV กล่าวคือ sito-C18:1 จะเกิดการออกซิไดส์สูงสุดในทุกอุณหภูมิ ในขณะที่การเอสเทอริฟิเคชันด้วยกรดไขมันอิ่มตัวนั้น ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °C sito-C6 จะเกิดการออกซิไดส์ได้สูงกว่าเอสเทอร์ชนิดอื่นๆ แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °C อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอสเทอร์ทั้ง 3 ชนิดจะมีค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 6 ค่า p -AV ของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.

การเปลี่ยนแปลงปริมาณซีโตสเตอร์รอลและอนุพันธ์ที่ไม่ถูกออกซิไดส์ ซึ่งแสดงด้วยร้อยละของซีโตสเตอร์รอลและอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ เมื่อให้ความร้อนตัวอย่างแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 3 ระดับ แสดงดังรูปที่ 7 โดยทั่วไปการให้ความร้อนในระดับที่ต่ำ (60°C) จะมีการลดลงของสารตั้งต้นในระดับที่ต่ำกว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้น (100 และ 180°C) โดยการให้ความร้อนที่ 180°C จะทำให้เกิดการสูญเสียซีโตสเตอร์รอลและอนุพันธ์ในช่วงร้อยละ 10-80 ในช่วง 10 นาทีแรกของการให้ความร้อน (รูปที่ 7c) ส่วนที่อุณหภูมิ 100°C เกิดการสูญเสียร้อยละ 4-33 และการให้ความร้อนที่ 60°C จะเกิดการสูญเสียร้อยละ 0-12 เมื่อเทียบในช่วงเวลา 10 นาทีเท่ากัน หลังจากนั้นแนวโน้มจะแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาผลของโครงสร้างของซีโตสเตอร์รอลและอนุพันธ์พบว่า อิทธิพลของโครงสร้างจะไม่ชัดเจนที่อุณหภูมิต่ำ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการให้ความร้อนจะเกิดการสูญเสีย sito-C18:1 ในอัตราที่สูงขึ้นกว่าสารชนิดอื่นอย่างชัดเจน และที่อุณหภูมิ 180°C จะเกิดการสูญเสียซีโตสเตอร์รอลในลักษณะที่ใกล้เคียงกับ sito-C18:1 (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ร้อยละของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่เหลืออยู่เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.

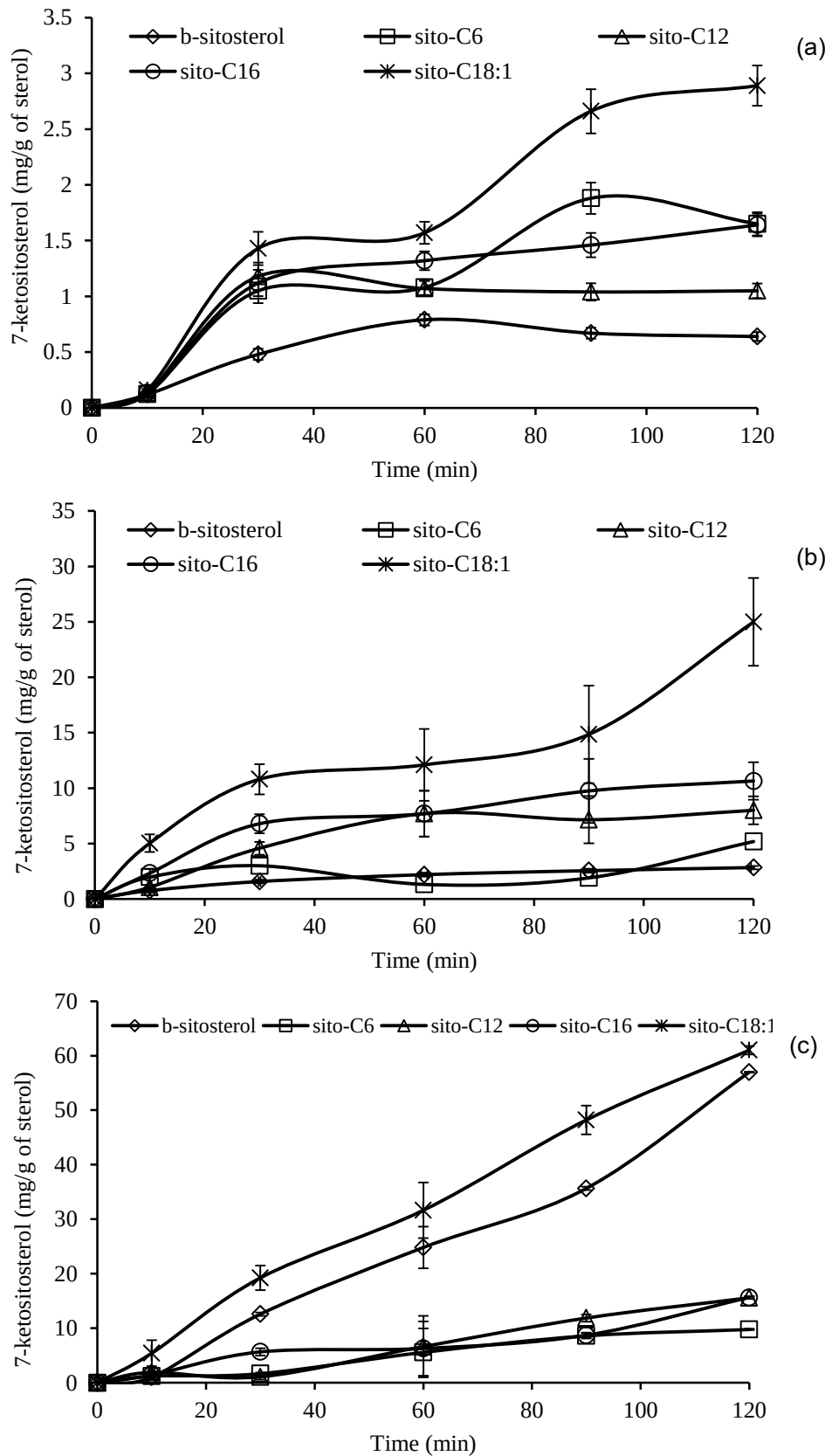
จากการวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่ไม่ถูกออกซิไดส์ก่อนและหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ตารางที่ 2) พบว่า อัตราการการสูญเสียซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้และชนิดของซีโตสเตอรอล กล่าวคือ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ตัวอย่าง ทั้งนี้อัตราการเปลี่ยนแปลงของซีโตสเตอรอล และอนุพันธ์จะเกิดขึ้นในอัตราที่ใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °ซ ยกเว้นในกรณีของ sito-C18:1 แต่ค่าดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °ซ โดยเฉพาะอย่างยิ่งซีโตสเตอรอลและ sito-C18:1 ดังนั้นอุณหภูมิและโครงสร้างของไฟโตสเตอรอลจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ โดยปฏิกิริยาการสูญเสียซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์สอดคล้องกับปฏิกิริยาเคมีอันดับ 1 ซึ่งมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.7343-0.9867 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าจลนพลศาสตร์ของ β -sitosterol และ β -sitosteryl esters ที่เหลืออยู่ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 100 และ 180 °ซ เป็นเวลา 2 ชม.

	Remaining sitosterol and sitosteryl ester					
	60 °C		100 °C		180 °C	
	k (day ⁻¹)	R^2	k (day ⁻¹)	R^2	k (day ⁻¹)	R^2
β -sitosterol	0.0017	0.7610	0.0085	0.7343	0.0575	0.7506
Sito-C6 ester	0.0059	0.7557	0.0057	0.7577	0.0072	0.7778
Sito-C12 ester	0.0006	0.7371	0.0020	0.9835	0.0032	0.7941
Sito-C16 ester	0.0034	0.8230	0.0025	0.9867	0.0059	0.7594
Sito-C18:1 ester	0.0100	0.8260	0.0310	0.7773	0.0639	0.7661

^aFirst order kinetic model corresponding to $\ln \frac{Sitot}{Sito0} = -kt$

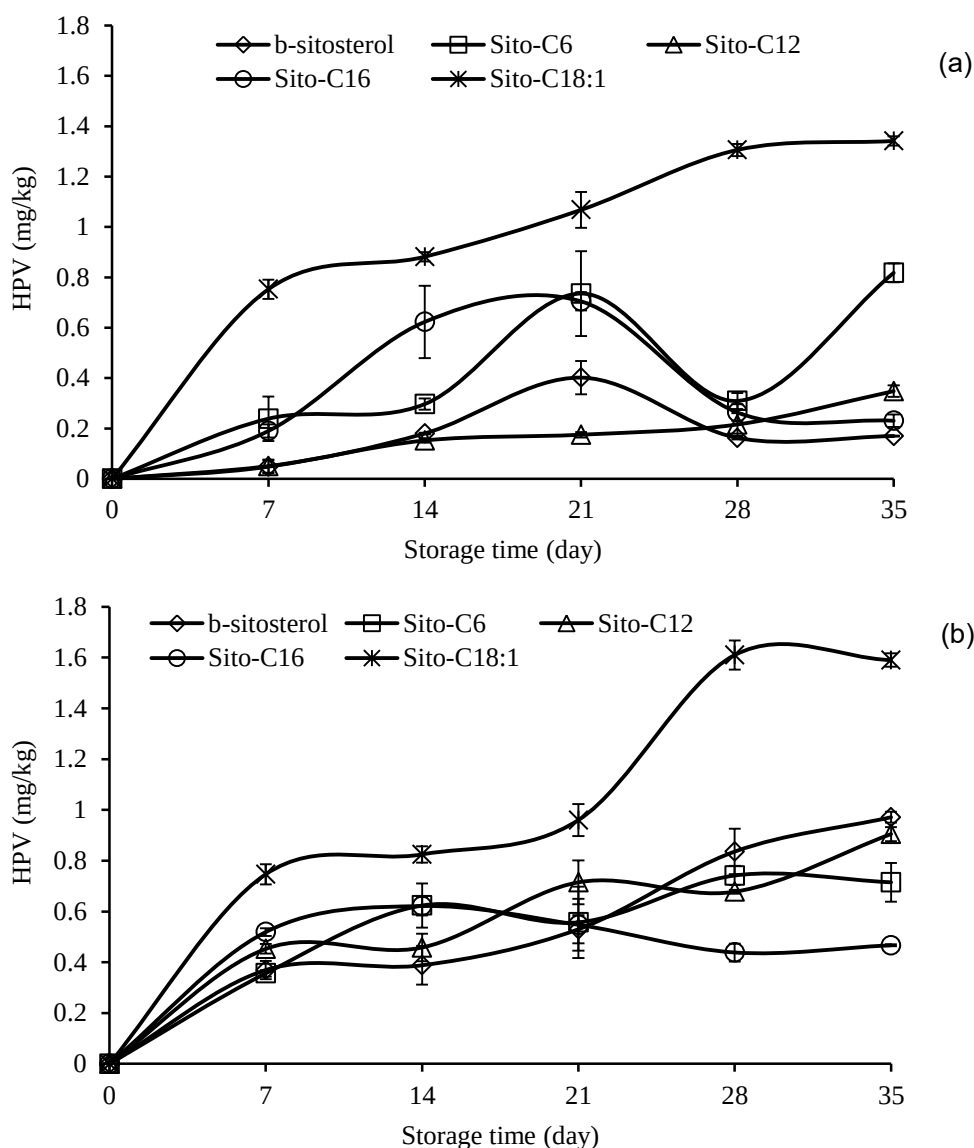
ปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล ในตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนที่แตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 8 โดย sito-C18:1 มีปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล สูงที่สุดในทุกอุณหภูมิของการให้ความร้อน ($p < 0.05$) โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °ซ นั้น พบปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล ในอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่าซีโตสเตอรอล แต่ผลจะสวนทางกันเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °ซ ซึ่งมีแนวโน้มที่สอดคล้องกับค่า HPV (รูปที่ 5) และ p -AV (รูปที่ 6) เมื่อพิจารณาถึงผลของโครงสร้างของอนุพันธ์เฉพาะกับกรดไขมันอิ่มตัวแล้ว พบว่ามีความแปรปรวนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำ (60 และ 100 °ซ) และจะมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °ซ ($p > 0.05$) และปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล ของซีโตสเตอรอลจะสูงเป็นอันดับ 2 รองจาก sito-C18:1 (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ปริมาณ 7-Ketositosterol ของ β -sitosterol และอนุพันธ์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C (a), 100°C (b) และ 180°C (c) เป็นเวลา 2 ชม.

5.2 การศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบตัวทำละลายที่เป็นไขมันและระบบจำลองอิมัลชัน

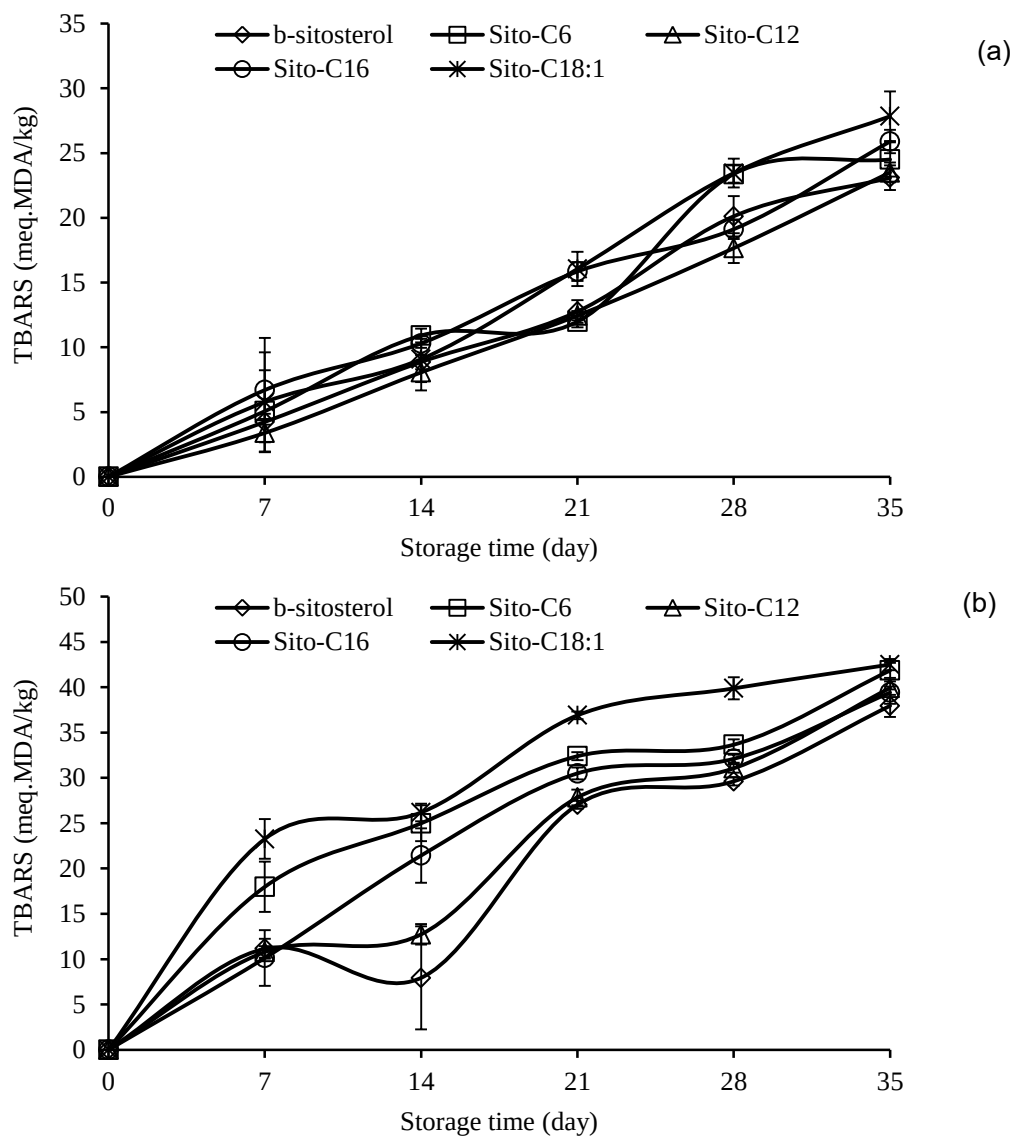
ปริมาณ HPV ในไตรปาล์มมิตินและอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ซึ่งบ่มในสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 55 °C) แสดงดังรูปที่ 9 จากการทดลองพบว่าการเติมอนุพันธ์ sito-C18:1 จะทำให้ค่า HPV ทั้งในระบบไตรปาล์มมิติน (รูปที่ 9a) และอิมัลชัน (รูปที่ 9b) สูงที่สุด ตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา 35 วัน ซึ่งบ่งชี้ถึงระดับการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่สูงกว่า ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากการมีพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้นจากกรดโอเลอิกที่มาเชื่อมโยงกับโมเลกุลของซิโตสเตอรอล โดยอัตราการเกิดออกซิเดชันของไขมันจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุล (Akhori และ Min, 2000) ในกรณีของโครงสร้างของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์นั้น การออกซิเดชันของไขมันจะพบในระบบที่มีการเติมอนุพันธ์ $\text{sito-C6} \approx \text{sito-C16} > \text{sito-C12} \approx$ ซิโตสเตอรอล ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการเติมกรดไขมันสายสั้นและสายยาวในโมเลกุลของซิโตสเตอรอล ทำให้ได้อนุพันธ์ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าการเติมกรดไขมันสายกลาง (กรดลอริก) เมื่ออยู่ในระบบตัวทำละลายไขมัน โดยการเติมกรดไขมันสายกลางทำให้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่แตกต่างจากซิโตสเตอรอลดั้งเดิม นอกจากผลของโครงสร้างของกรดไขมันที่มีต่อเสถียรภาพของซิโตสเตอรอลแล้ว ผลในแง่ของจุดหลอมเหลวก็อาจนำมาใช้เพื่ออธิบายการเกิดออกซิเดชันที่แตกต่างกันของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในตัวทำละลายไขมันได้ กล่าวคือ ซิโตสเตอรอลยังคงมีโครงสร้างที่เป็นผลึกในสภาวะที่ใช้ในการออกซิเดชัน (55 °C) เนื่องจากมีจุดหลอมเหลวสูงมาก ซึ่งอาจจะกระจายตัวอยู่ใน matrix หรือ ตกตะกอนแยกออกจาก matrix ของไตรปาล์มมิติน ทำให้ออกซิเจนหรือตัวเหนี่ยวนำการออกซิเดชัน (initiator) อาจเข้าไปทำปฏิกิริยากับซิโตสเตอรอลดังกล่าวได้ยาก จึงต้องใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาช่วงเวลาหนึ่ง การออกซิเดชันจึงจะเกิดขึ้น (รูปที่ 9a) ส่วนในระบบอิมัลชันนั้น การออกซิเดชันของอิมัลชันที่เติมซิโตสเตอรอลและซิโตสเตอรอลเอสเทอร์ชนิด Sito-C6 Sito-C12 และ Sito-C16 มีค่าใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา แต่ค่า HPV จะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ต่ำภายหลังจากวันที่ 7 ของการเก็บรักษา ทั้งนี้การเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ดังกล่าวในอิมัลชันอาจทำให้เกิดการกระจายของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในอนุภาคน้ำมันมากกว่าที่จะอยู่ในเฟสของน้ำ (ไม่มีการตกตะกอนแยกออกไปของซิโตสเตอรอลเช่นเดียวกับที่อาจจะพบได้ในระบบน้ำมัน) จึงทำให้ทั้งอิมัลชันที่เติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่า HPV ใกล้เคียงกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า HPV ของอิมัลชันจะมีแนวโน้มสูงกว่าในระบบตัวทำละลายไขมันเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง การเติมซิโตสเตอรอลหรืออนุพันธ์ชนิดเดียวกัน (รูปที่ 9a และ 9b) ทั้งนี้เนื่องจากอิมัลชันมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูง ทำให้ออกซิเจนหรือตัวเร่งปฏิกิริยาทำปฏิกิริยากับไขมันได้ดีกว่า นำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สูงกว่า



รูปที่ 9 ค่า HPV ของไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$ ซ

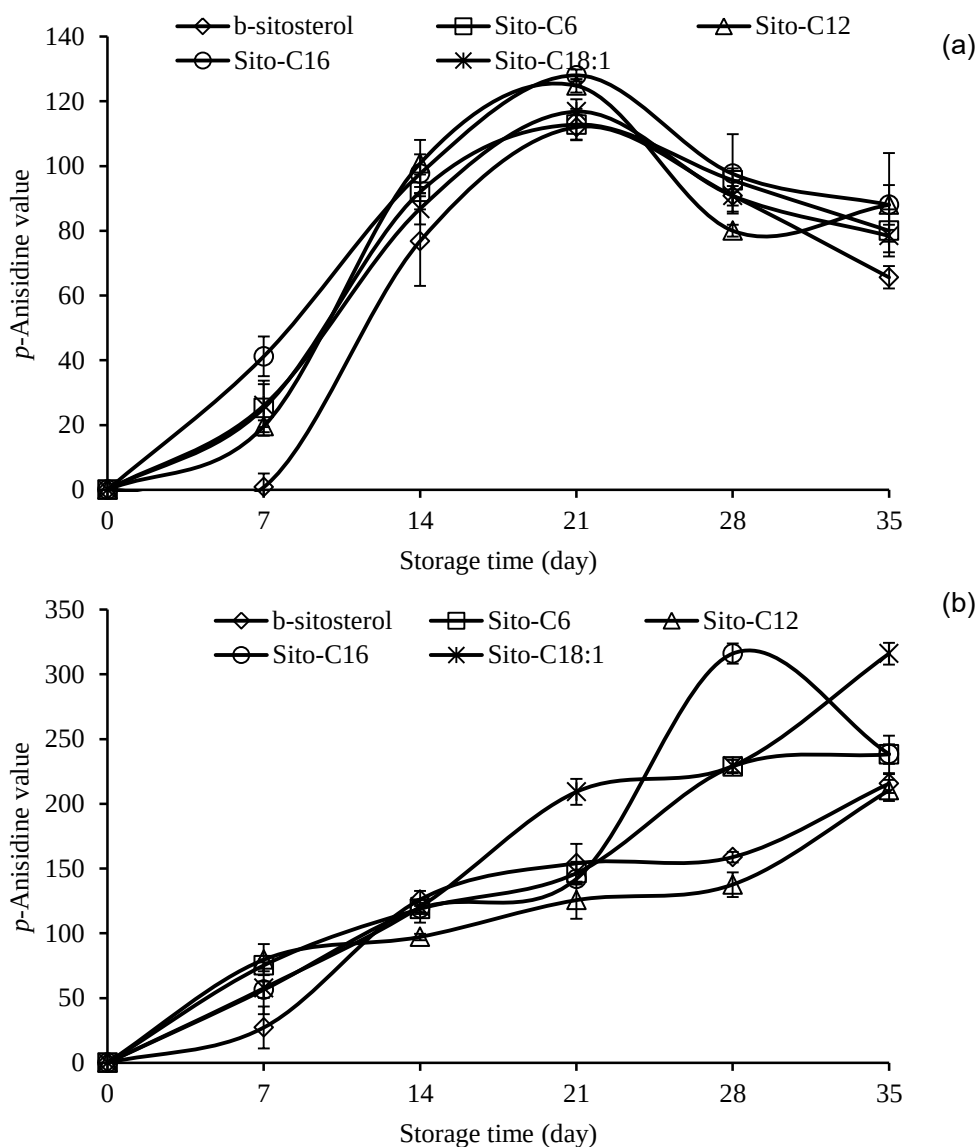
ค่า TBARS ในระบบไตรปาล์มมิตินและอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ ซึ่งผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 35 วัน แสดงดังรูปที่ 10 พบว่าค่า TBARS ในไตรปาล์มมิตินที่เติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์แต่ละชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา โดยในช่วง 14 วันแรก จะไม่พบความแตกต่างของค่า TBARS ในระหว่างไตรปาล์มมิตินที่ผ่านการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษามากขึ้น ค่า TBARS ของไตรปาล์มมิตินที่มีการเติม sito-C18:1 จะมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่มีการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ชนิดอื่น โดยในระบบไตรปาล์มมิตินจะมีค่า TBARS สูงสุดเท่ากับ 23-28 มก. MDA/กก. น้ำมัน ซึ่งพบในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา Cercaci และคณะ (2007) ระบุว่าค่าเฮกซะนัล (hexanal) ของน้ำมันข้าวโพดที่มีไฟโตสเตอรอล 6481 มก./กก. น้ำมัน มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา 40 วัน ที่อุณหภูมิ

55°C ส่วนในระบบอิมัลชันนั้น พบแนวโน้มในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ ค่า TBARS มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา โดยอิมัลชันที่มีการเติม sito-C18:1 มีค่า TBARS สูงสุด รองลงมาคือ sito-C6 และ sito-C16 ตามลำดับ โดยอิมัลชันที่มีการเติมซีโตสเตอรอลและ sito-C12 จะมีค่า TBARS ต่ำที่สุด ซึ่งในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา (วันที่ 35) ค่า TBARS ของอิมัลชันมีค่าในช่วง 38-43 มก. MDA/กก. น้ำมัน เป็นที่น่าสังเกตว่า ค่า TBARS ในอิมัลชันมีค่าสูงกว่าในไตรปาล์มมีดินประมาณร้อยละ 35 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Carcaci และคณะ (2007) ซึ่งพบการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลในอิมัลชันมีค่าสูงกว่าในน้ำมันข้าวโพด เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าทั้งโครงสร้างของซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์และโครงสร้างของอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดออกซิเดชันของซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะเร่ง



รูปที่ 10 ค่า TBARS ของไตรปาล์มมีดิน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C

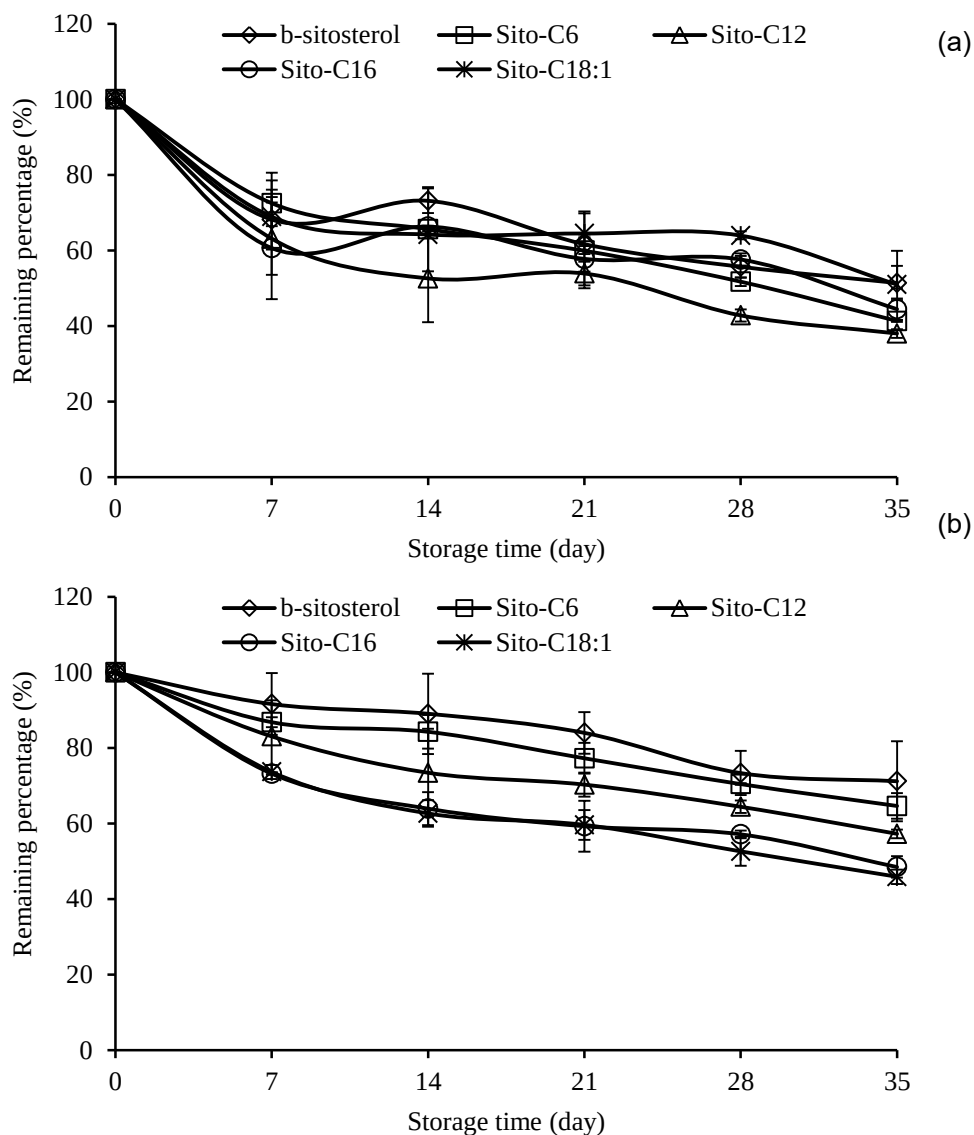
ค่า p -AV ในระบบไตรปาล์มมิตินและอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำที่มีการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ แสดงดังรูปที่ 11 โดยค่า p -AV ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามค่า p -AV ในระบบไตรปาล์มมิตินจะมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 21 ของการเก็บรักษา จากนั้นจะมีค่าลดลง โดยไตรปาล์มมิตินที่เติมซิโตสเตอรอลมีค่า p -AV ต่ำสุด ส่วนในระบบอิมัลชันนั้น จะมีค่า p -AV ประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับระบบไตรปาล์มมิติน โดยที่ค่า p -AV มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา ยกเว้นในอิมัลชันที่เติม sito-C16 ซึ่งจะมีค่า p -AV ลดลงในช่วงสุดท้าย เมื่อเปรียบเทียบค่า p -AV ในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา พบว่าอิมัลชันที่มีการเติม sito-C18:1 จะมีค่า p -AV สูงที่สุด ($p < 0.05$) รองลงมาคือ sito-C6 $\approx$ sito-C16 และ sito-C12 $\approx$ ซิโตสเตอรอล ตามลำดับ มีรายงานว่าค่า p -AV ถูกนำมาใช้ในการติดตามการเกิดออกซิเดชันของสเปรตที่มีการเติมไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6 °C (Nieminen และคณะ, 2016) และผลที่ได้จะแตกต่างจากการทดลองนี้ โดยพบการเพิ่มขึ้นของค่า p -AV ในสเปรตเพียงเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นเป็นเวลา 22 วัน โดยสรุปแล้วการเติมซิโตสเตอรอลเอสเทอร์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาเอสเทอร์ไฟส์จะมีแนวโน้มเกิดการออกซิเดชันของไขมัน (แสดงด้วยค่า HPV TBARS และ p -AV) สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบอิมัลชัน ในขณะที่การออกซิเดชันของอนุพันธ์ที่เอสเทอร์ไฟส์ด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่กรดไขมันและโครงสร้างของอาหาร



รูปที่ 11 ค่า p -AV ของไตรปาล์มมีติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$ C

ปริมาณซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์มีแนวโน้มลดลงตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา ซึ่งแสดงด้วยการลดลงของร้อยละซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในระบบไตรปาล์มมีตินและอิมัลชัน (รูปที่ 12) เป็นที่น่าสังเกตว่าร้อยละของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลืออยู่มีค่าลดลงมากในระบบอิมัลชันเมื่อเทียบกับไตรปาล์มมีติน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Cercaci และคณะ (2007) ซึ่งพบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลที่สูงกว่าในอิมัลชันเมื่อเทียบกับน้ำมัน โดยในระบบน้ำมันนั้น จะพบการลดลงของร้อยละของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในอัตราที่ต่ำลงตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา และพบการลดลงของ sito-C18:1 ในอัตราสูงสุด ตามด้วย sito-C16 sito-C12 sito-C6 และซิโตสเตอรอล ตามลำดับ ส่วนในระบบอิมัลชันจะพบปริมาณ sito-C18:1 เหลืออยู่ในระดับต่ำที่สุดเช่นกัน ในขณะที่ซิโตสเตอรอลมี

แนวโน้มคงที่ตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีเสถียรภาพสูง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับค่า TBARS (รูปที่ 10) อย่างไรก็ตาม ซีโตสเตอรอลอาจเกิดการตกตะกอนทั้งในระบบไตรปาล์มมิตินและระบบอิมัลชัน เนื่องจากสารดังกล่าวมีความสามารถในการละลายในไขมันได้ต่ำ ในขณะที่อนุพันธ์เอสเทอร์จะละลายอยู่ในไตรปาล์มมิตินหรืออาจจัดเรียงตัวอยู่ระหว่างรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมันในระบบอิมัลชัน ส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันของสารดังกล่าวได้ในระดับที่สูงกว่า โดยอนุพันธ์ของซีโตสเตอรอลที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถเกิดการกระจายตัวในระดับนาโน (nanodispersion) ได้ และจะมีเสถียรภาพที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้าง (Panpipat และคณะ, 2013) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปริมาณซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในทั้ง 2 ระบบ จะขึ้นอยู่กับระดับและช่วงของการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งพิจารณาได้จากรูปแบบที่แตกต่างกันในตัวอย่างที่มีการเติมซีโตสเตอรอลและอนุพันธ์ชนิดต่างๆ และอิทธิพลของโครงสร้างของอาหาร



รูปที่ 12 ร้อยละของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในระบบไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C

การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของการสูญเสียซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในระหว่างการเก็บรักษาในระบบไตรปาล์มมิดินและอิมัลชันแสดงดังตารางที่ 3 โดยพบความสัมพันธ์สอดคล้องกับปฏิกิริยาอันดับ 1 ซึ่งมีค่า R^2 ค่อนข้างสูง (0.7612-0.9819) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Ansorena และคณะ (2013) ซึ่งพบการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอลเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับ 1 โดยอัตราการออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลจะมีค่าต่ำที่สุด รองลงมาคือ อนุพันธ์ที่มีการเอสเทอร์ไฟส์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบผลของโครงสร้างอาหารทั้ง 2 แบบ พบว่า อัตราการลดลงของซิโตสเตอรอลมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่า k ในระบบไตรปาล์มมิดินและอิมัลชันมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3) ส่วนในกรณีของซิโตสเตอรอลเอสเทอร์นั้น อัตราการสูญเสียอนุพันธ์เอสเทอร์จะมีค่าสูงกว่าในระบบอิมัลชันเมื่อเทียบกับไตรปาล์มมิดิน อย่างไรก็ตามการสูญเสียซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์ในระบบไตรปาล์มมิดินมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมากกว่าในระบบอิมัลชัน เนื่องจากมีค่า R^2 ที่สูงกว่า ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเกิดการออกซิเดชันหรือปฏิกิริยาการสลายตัวอื่นๆ อย่างต่อเนื่องของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในระบบไตรปาล์มมิดิน ในขณะที่ปฏิกิริยาดังกล่าวอาจเกิดขึ้นอย่างมากในระบบอิมัลชัน ส่งผลให้อัตราการสูญเสียซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์ในระบบนี้มีความแปรปรวน โดยที่อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันและอัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจมีความแตกต่างกันสำหรับซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์เอสเทอร์แต่ละชนิด ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของผลที่ได้ระหว่างระบบไตรปาล์มมิดินและระบบอิมัลชัน

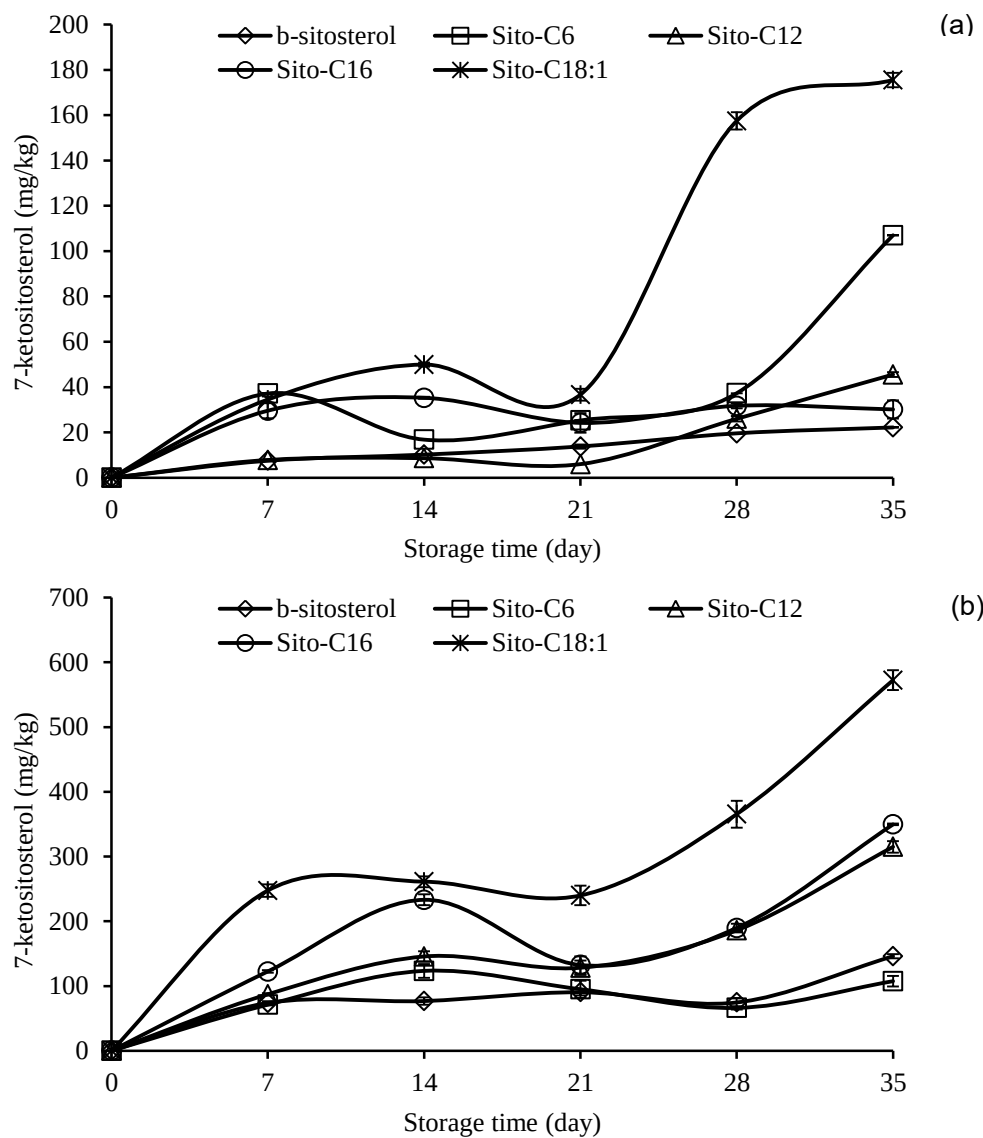
ตารางที่ 3 ค่าจลนพลศาสตร์ของ β -sitosterol และ β -sitosteryl esters ที่เหลืออยู่ในระบบไตรปาล์มมิดินและอิมัลชันที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C

Sample	Remaining β -sitosterol and β -sitosteryl ester ^a			
	Bulk oil		Emulsion	
	k (day ⁻¹)	R ²	k (day ⁻¹)	R ²
β -sitosterol	0.0099	0.9648	0.0085	0.9819
Sito-C6 ester	0.0118	0.9819	0.0168	0.8613
Sito-C12 ester	0.0147	0.9637	0.0147	0.7633
Sito-C16 ester	0.0181	0.9052	0.0177	0.7612
Sito-C18:1 ester	0.0202	0.9391	0.0244	0.8838

^aFirst order kinetic model corresponding to $\ln \frac{Sitot}{Sitot_0} = -kt$

ปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล ในระบบไตรปาล์มมิดินและอิมัลชันที่มีการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่แตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 13 โดยทั่วไปปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอลจะมีค่าสูงกว่าในระบบอิมัลชันเมื่อเทียบกับระบบไตรปาล์มมิดิน ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Cercaci และคณะ (2007) ซึ่งพบปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล ในอิมัลชันมีค่าสูงกว่าในน้ำมัน ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า

อนุพันธ์ 7-คีโต จะถูกสร้างขึ้นในระบบอิมัลชันได้เร็วกว่าในน้ำมัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิมัลชันมีพื้นที่ผิวที่ค่อนข้างสูง ส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันได้ในอัตราที่สูงกว่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้มาก โดยปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล ในทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา ตัวอย่างที่มีการเติม sito-C18:1 จะมีปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล สูงที่สุดในทั้ง 2 รูปแบบของ matrix ($p < 0.05$) จึงแสดงให้เห็นถึงผลของความไม่เสถียรของโครงสร้างอนุพันธ์เอสเทอร์เมื่อมีการเชื่อมโยงกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยในระบบไตรปาล์มมิตินั้น จะตรวจพบปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอล ในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษาตามลำดับดังนี้ $\text{sito-C18:1} > \text{sito-C6} > \text{sito-C12} > \text{sito-C16} > \text{ซีโตสเตอรอล}$ โดยมีแนวโน้มบางส่วนคล้ายคลึงกับค่า HPV (รูปที่ 9a) อย่างไรก็ตามในระบบอิมัลชันจะพบลำดับที่แตกต่างจากนี้ กล่าวคือ ปริมาณ 7-คีโตซีโตสเตอรอลจะพบสูงสุดในอิมัลชันที่เติม $\text{sito-C18:1} > \text{sito-C16} > \text{sito-C12} > \text{sito-C6} \approx \text{ซีโตสเตอรอล}$



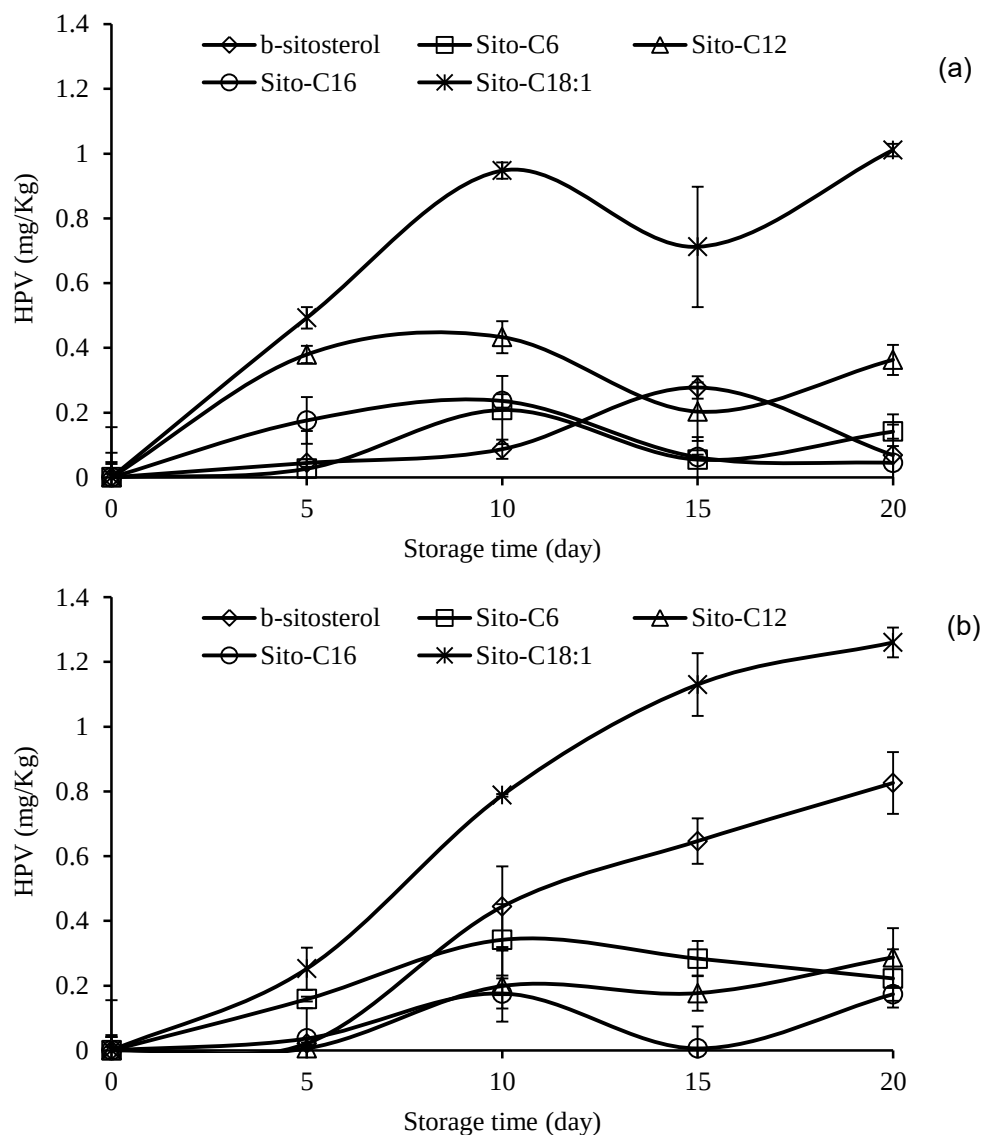
รูปที่ 13 ปริมาณ 7-Ketositosterol ในระบบไตรปาล์มมิติน (a) และอิมัลชัน (b) ที่เติม β -sitosterol และอนุพันธ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55°C

5.3 การศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุพันธ์เอสเทอร์ของไฟโตสเตอรอลและกรดไขมันในระบบอาหารประเภทไขมัน

การศึกษานี้ได้ทำการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่มีโครงสร้างแตกต่างกันในมาการีนเชิงการค้า ซึ่งมีการใช้น้ำมันคาโนลาและน้ำมันดอกทานตะวันร้อยละ 65 เป็นไขมันหลัก โดยทำการติดตามการออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และในสภาวะเร่ง (55°C) เป็นเวลา 20 วัน การศึกษาในส่วนนี้จะทำให้เห็นผลของการเติมไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในอาหารประเภทไขมันอย่างแท้จริง โดยใช้มาการีนเป็นตัวแทนของกลุ่มอาหารประเภทไขมัน ซึ่งในต่างประเทศมีการจำหน่ายมาการีนที่เติมไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์เชิงการค้าอยู่แล้ว นอกจากการศึกษาในส่วนนี้จะแสดงให้เห็นผลของการเติมไฟโตสเตอรอลที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันจากการที่มีกรดไขมันต่างชนิดมาเอสเทอริไฟด์แล้ว ยังอาจสะท้อนให้เห็นผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา และ food matrix ต่อการเกิดออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลดังกล่าว ซึ่งลักษณะของ matrix นี้ เป็นลักษณะที่แท้จริงของอาหารมากกว่าการทดลองในส่วนที่ 5.2

เมื่อทำการติดตามค่า HPV (รูปที่ 14) พบว่า มาการีนที่มีการเติม sito-C18:1 มีค่า HPV สูงที่สุดตลอดช่วงเวลาในการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ทั้งในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง ทั้งนี้เนื่องจากอนุพันธ์ดังกล่าวมีการดัดแปลงที่มีพันธะคู่ ส่งผลให้การออกซิเดชันของไขมันเกิดได้มากขึ้น โดยการเกิดออกซิเดชันจะเกิดขึ้นทั้งในส่วนของไขมันในมาการีนและอนุพันธ์ของซิโตสเตอรอลที่เติมลงไป เป็นที่น่าสังเกตว่า การเติม Sito-C12 จะแนวโน้มให้ค่า HPV สูงกว่าซิโตสเตอรอล sito-C6 และ sito-C16 ในช่วง 10 วันแรกของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นค่า HPV มีแนวโน้มไม่แตกต่างกัน ส่วนในสภาวะเร่งนั้น การเติมซิโตสเตอรอลจะทำให้ค่า HPV มีค่าสูงรองจากการเติม sito-C18:1 โดยเฉพาะหลังจากวันที่ 15 ของการเก็บรักษา ในขณะที่มาการีนที่เติม sito-C6 sito-C12 และ sito-C16 มีค่า HPV ใกล้เคียงกันและมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา ดังนั้นจึงยังสรุปได้ยากถึงความแตกต่างของการเติมซิโตสเตอรอล sito-C6 sito-C12 และ sito-C16 ต่อการเกิดออกซิเดชันของมาการีน เนื่องจากผลยังมีความแปรปรวน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสเตอรอลเหล่านี้อาจมีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน โดย White และ Armstrong (1986) และ Gordon และ Magos (1983) ระบุว่าไฟโตสเตอรอลมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของไขมัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของไฟโตสเตอรอล ดังนั้นค่า HPV ที่มีความแปรปรวนนี้อาจเกี่ยวข้องกับสมบัติในการต้านออกซิเดชันและการเกิดออกซิเดชันของสเตอรอลและอนุพันธ์นั้นๆ ในมาการีนในระหว่างการเก็บรักษา โดยผลที่หักล้างกันระหว่างสมบัติในการต้านออกซิเดชันและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้ได้ค่าสุทธิของการเกิดออกซิเดชันในระบบนั้น จึงส่งผลให้ค่า HPV ของมาการีนที่เติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ดังกล่าวมีความแปรปรวน ซึ่งผลในลักษณะนี้จะไม่พบในมาการีนที่เติม sito-C18:1 ซึ่งอาจเป็นเพราะอนุพันธ์ดังกล่าวเกิดการออกซิเดชันที่สูงมากกว่าสมบัติในการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากอิทธิพลของพันธะคู่ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อค่า HPV ของมาการีน พบว่าการเก็บรักษามการีนที่

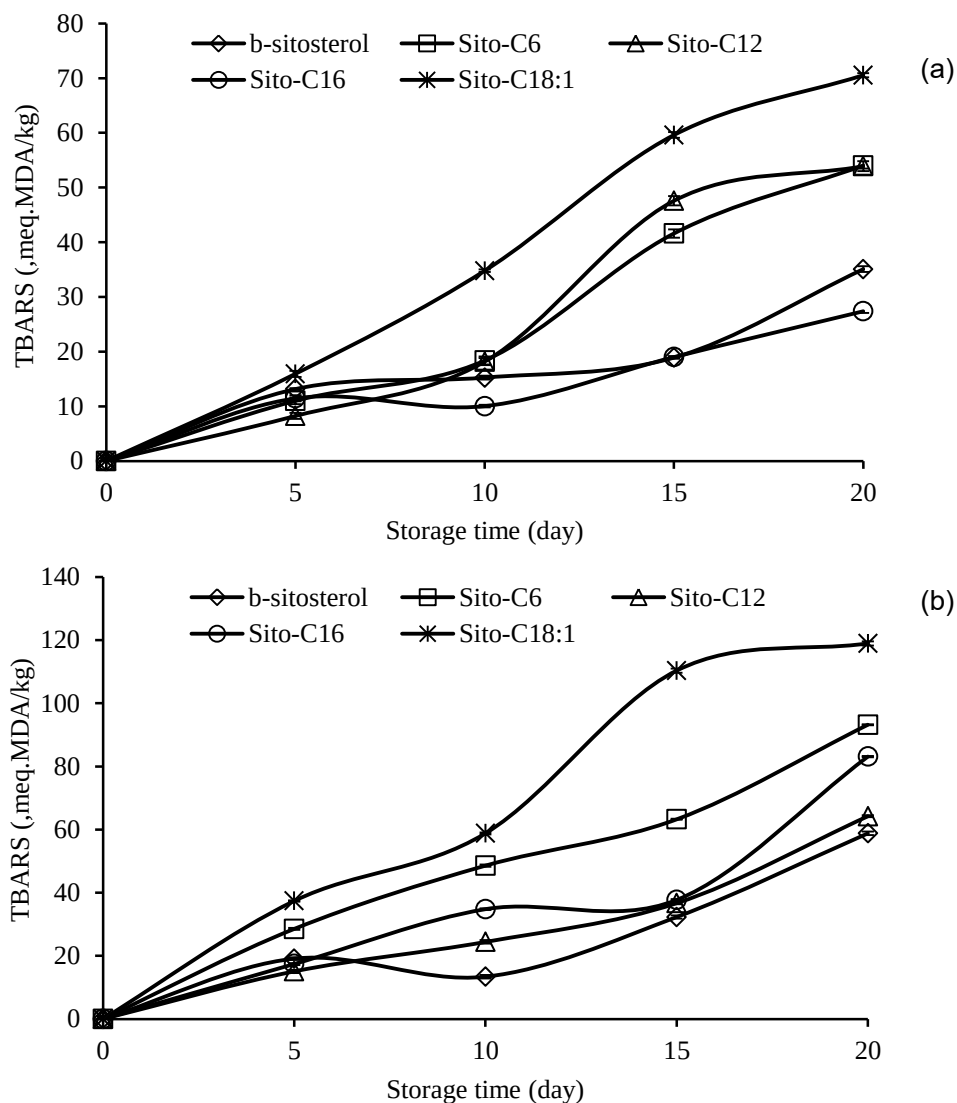
สภาวะเร่ง จะทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันในมาการีนสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 14) ซึ่งพบผลดังกล่าวในมาการีนทุกชนิดที่ผ่านการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 14 ค่า HPV ของมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)

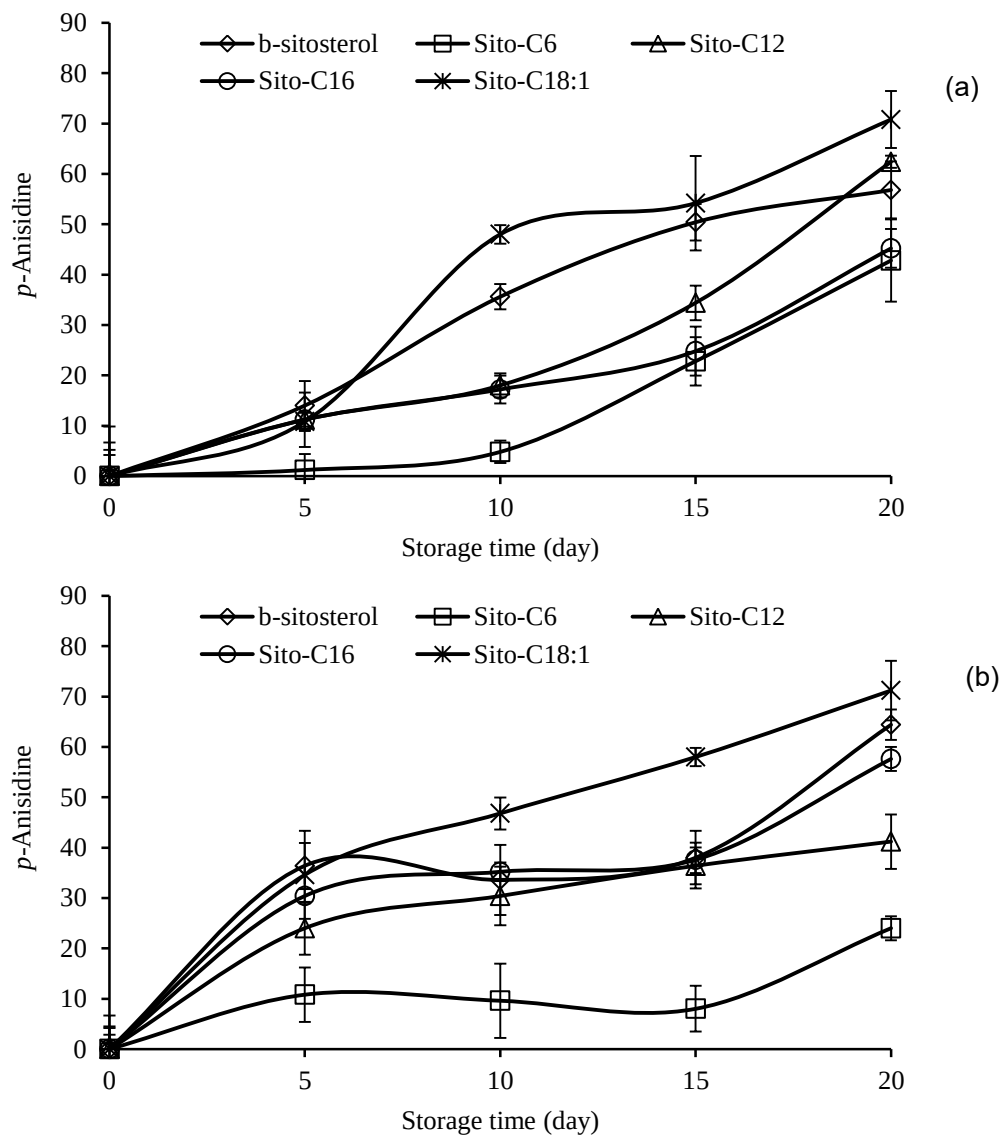
เมื่อพิจารณาค่า TBARS ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิของปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (รูปที่ 15) พบว่าค่า TBARS มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับค่า HPV (รูปที่ 14) กล่าวคือ การเกิดออกซิเดชันของไขมันในมาการีนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษาทั้งมาการีนที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและในสภาวะเร่ง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Rudzińska และคณะ (2014) ซึ่งพบการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษามการีนที่มีการเติมไฟโตสเตอรอลชนิดต่างๆ โดยมาการีนที่มีการเติม sito-C18:1 มีค่า TBARS สูงที่สุดตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษาในทั้ง 2 สภาวะ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามพบความแปรปรวนของค่า TBARS ในมาการีนที่มีการเติมซิโต

เตอรอลและอนุพันธ์อื่น กล่าวคือ ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนั้น มาการีนที่เติม sito-C6 และ sito-C12 มีค่า TBARS รองจากมาการีนที่เติม sito-C18:1 และมีค่าสูงกว่ามาการีนที่เติมซิโตสเตอรอลหรืออนุพันธ์ที่เหลือ (รูปที่ 15a) ในขณะที่หากเก็บรักษาในสภาวะเย็นแล้ว มาการีนที่เติม sito-C6 มีค่า TBARS ต่ำกว่ามาการีนที่เติม sito-C18:1 แต่มีค่าสูงกว่ามาการีนที่เติมซิโตสเตอรอลหรืออนุพันธ์อื่นๆ ที่เหลือ (รูปที่ 15b) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากค่า TBARS มีแนวโน้มว่ามาการีนที่เติม sito-C18:1 มีการเกิดออกซิเดชันของไขมันสูงกว่ามาการีนที่เติม sito-C6 > sito-C12 $\approx$ sito-C16 $\approx$ sitosterol ซึ่งอาจนำไปประเด็นเรื่องจุดหลอมเหลวของสารแต่ละชนิดมาอธิบายประกอบ กล่าวคือ อนุพันธ์ sito-C6 มีค่าต่ำกว่าซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลือ (ยกเว้น sito-C18:1) ส่งผลให้มีโครงสร้างแบบผลึก (crystalline) น้อยที่สุดหรือมีการสูญเสียโครงสร้างที่มีระเบียบแบบแผนมากที่สุดเมื่อเทียบกับซิโตสเตอรอล sito-C12 และ sito-C16 จึงทำให้ออกซิเจนเข้าทำปฏิกิริยาการออกซิเดชันได้มากที่สุดนั่นเอง



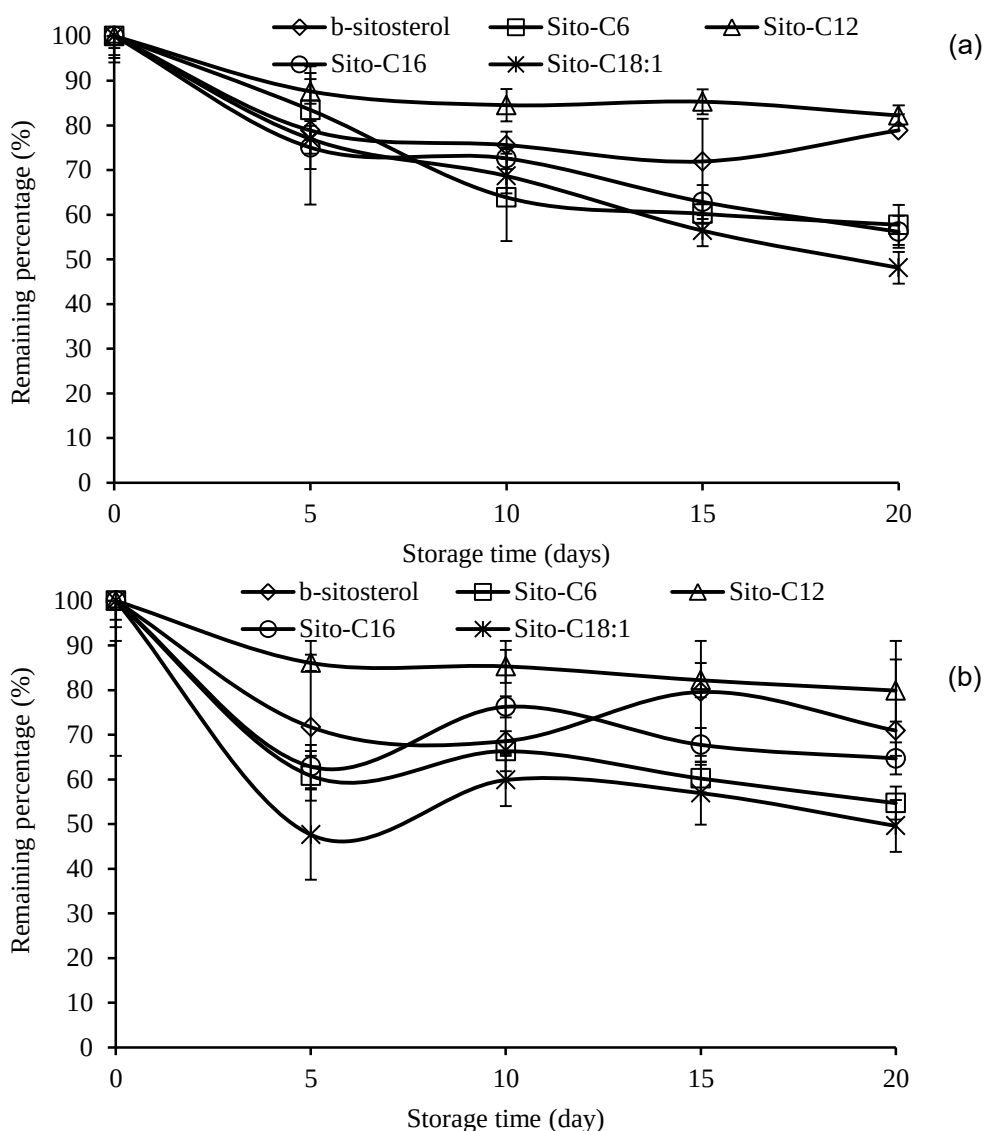
รูปที่ 15 ค่า TBARS ของมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)

การเปลี่ยนแปลงค่า *p*-anisidine ซึ่งบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันชั้นทุติยภูมิเช่นเดียวกับ TBARS ในมาการีนที่ผ่านการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่แตกต่างกันในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 20 วัน แสดงดังรูปที่ 16 ซึ่งค่า *p*-AV มีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า HPV (รูปที่ 14) และ TBARS (รูปที่ 15) กล่าวคือมาการีนที่มีการเติม sito-C18:1 มีค่า *p*-AV สูงที่สุดตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษาทั้งในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่ง โดยผลนี้จะชัดเจนหลังจากวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ส่วนค่า *p*-AV ของมาการีนที่มีการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ชนิดอื่นๆ ยังมีลักษณะแปรปรวน แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา ซึ่งบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มากขึ้น



รูปที่ 16 ค่า *p*-AV ของมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (a) และ 55°C (b)

ปริมาณสเตอรอลที่เหลืออยู่ (ร้อยละ) เมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้นในมาการีนที่ผ่านการเติมซิโตสเตอรอลที่แตกต่างกันแสดงดังรูปที่ 17 โดยพบว่าปริมาณซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์แต่ละชนิดที่เติมลงไปในการมีปริมาณลดลงตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษามการีนในทั้ง 2 อุณหภูมิ โดยมีแนวโน้มเกิดการสูญเสียซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในอัตราที่สูงกว่าโดยเฉพาะในช่วง 5 วันแรกของการเก็บรักษาในการมีที่เก็บในสภาวะเร่งมากกว่าเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง แสดงให้เห็นถึงบทบาทของอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหารต่อการสูญเสียซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในการมี ทั้งนี้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงจะเร่งให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการมีเกิดการออกซิเดชัน และส่งผลต่อเนื่องให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ โดยทั่วไปไฟโตสเตอรอลเป็นไขมันที่มีเสถียรภาพสูงต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันถ้าเทียบกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือไขมันชนิดอื่น ดังนั้นการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เป็น matrix จะมีผลเหนี่ยวนำการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลที่เติมลงไปด้วย Rudzin'ska และคณะ (2014) พบการลดลงของปริมาณไฟโตสเตอรอลทั้งหมดในการมีร้อยละ 24 และ 31 เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 20 °C ตามลำดับ นอกจากนี้พบการลดลงของปริมาณไฟโตสเตอรอลทั้งหมดร้อยละ 60 ในนมผงที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที และให้ความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที (Menendez-Carreno และคณะ, 2008) Grandgirard และคณะ (2004) พบการออกซิไดส์ของสแตนอล (stanols) และสเตอรอลร้อยละ 0.08 ในสเปรด (spread) อย่างไรก็ตาม Soupas และคณะ (2006) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไฟโตสเตอรอลที่ละลายในไขมันและน้ำมันชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 เดือน เมื่อพิจารณาผลของชนิดของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ต่อการเกิดออกซิเดชันของมาการีน พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแสดงด้วยค่า HPV (รูปที่ 14) TBARS (รูปที่ 15) และ *p*-AV (รูปที่ 16) โดยมาการีนที่มีการเติม sito-C18:1 จะพบการสูญเสียปริมาณ sito-C18:1 สูงที่สุดในช่วง 5 วันแรกของการเก็บรักษา คือ ร้อยละ 25 และ 50 เมื่อทำการเก็บรักษามการีนที่อุณหภูมิห้องและ 55 °C ตามลำดับ และมาการีนที่เติม sito-C6 พบการสูญเสียอนุพันธ์ดังกล่าวอย่างน้อยที่สุดเมื่อเก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิ ส่วนซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลือมีอัตราการสูญเสียใกล้เคียงกัน (รูปที่ 17) .



รูปที่ 17 ร้อยละของ β -sitosterol และอนุพันธ์ที่เหลืออยู่ในมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °ซ (a) และ 55 °ซ (b)

จลนพลศาสตร์ของการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์ในมาการีนที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 20 วัน แสดงดังตารางที่ 4 โดยพบความสัมพันธ์ของการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์ในมาการีนในระหว่างการเก็บรักษาสอดคล้องกับปฏิกิริยาเคมีอันดับ 1 (first order reaction) โดยมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.7422-0.9874 ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างสูงระหว่างการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์และเวลาของการเก็บรักษา เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ออัตราการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์ในมาการีน พบว่าการเก็บรักษาที่สภาวะเร่งจะทำให้เกิดการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์ทุกชนิดในมาการีนสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยค่า k ของการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์ที่อุณหภูมิห้องมีค่าอยู่ในช่วง 0.0084-0.0285 day^{-1} ในขณะที่ค่า k ที่อุณหภูมิ 55 °ซ มีค่าอยู่ในช่วง 0.0099-0.0355 day^{-1} บ่งชี้ถึงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการสูญเสียโทสเตอรอลและอนุพันธ์ในมาการีนได้มากกว่า โดย sito-

C18:1 มีค่าอัตราการสูญเสียสูงที่สุดในทั้ง 2 อุณหภูมิของการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดออกซิเดชันซึ่งแสดงด้วยค่า HPV (รูปที่ 14) TBARS (รูปที่ 15) และ *p*-AV (รูปที่ 16) ที่มีค่าสูงสุดในขณะที่ sito-12 มีค่า *k* ต่ำสุด อย่างไรก็ตามการสูญเสียฟิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ในมาการีนอาจไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเพียงอย่างเดียว Rudzińska และคณะ (2009) ตรวจพบผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟิโตสเตอรอล เช่น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกของโมเลกุลฟิโตสเตอรอล (fragmented phytosterol molecules) สารประกอบที่ระเหยง่าย (volatile compound) และโอลิโกเมอร์ (oligomer) เป็นต้น ในระหว่างการให้ความร้อนฟิโตสเตอรอล

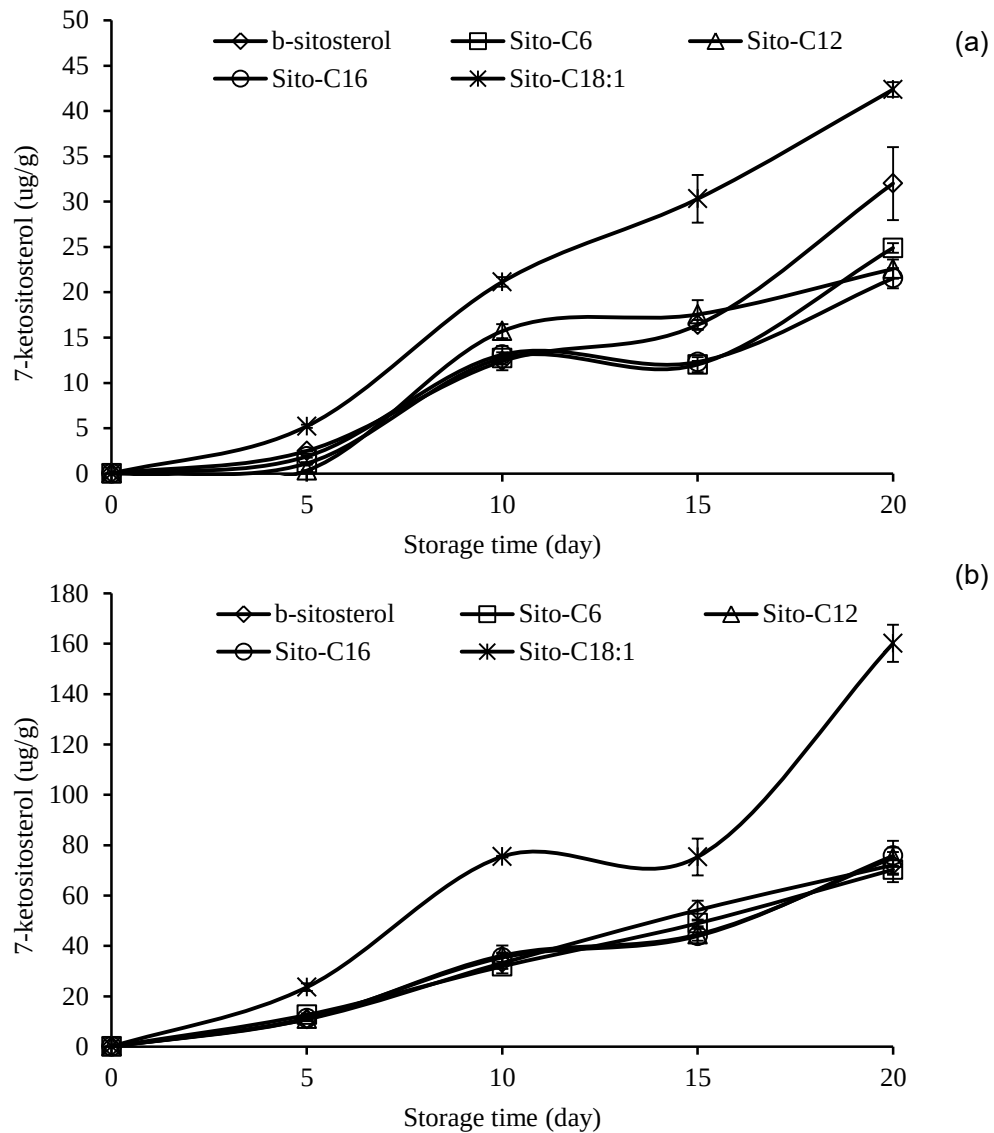
ตารางที่ 4 ค่าจลพลศาสตร์ของ β -sitosterol และ β -sitosteryl esters ที่เหลืออยู่ในมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C และ 55°C

	Remaining sitosterol and sitosteryl ester ^a			
	25°C		55°C	
	<i>k</i> (day ⁻¹)	R ²	<i>k</i> (day ⁻¹)	R ²
β -sitosterol	0.0133	0.8855	0.0117	0.8597
Sito-C6 ester	0.0245	0.9874	0.0243	0.8246
Sito-C12 ester	0.0084	0.9047	0.0099	0.7658
Sito-C16 ester	0.0159	0.9331	0.0266	0.7422
Sito-C18:1 ester	0.0285	0.7448	0.0355	0.8126

^a First order kinetic model corresponding to $\ln \frac{Sitot}{Sitot0} = -kt$

ปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักชนิดหนึ่งจากการเกิดออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์แสดงดังรูปที่ 18 โดยมาการีนที่ผ่านการเก็บรักษาที่สภาวะเร่งจะมีปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอลสูงกว่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 14-16) Scholz และคณะ (2016) รายงานปริมาณผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของมาการีนที่เติม phytosteryl/phytostanyl fatty acid esters แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ตู้อบ และทอดในกระทะ โดยพบว่าการนำมาการีนบรรจุในถาดแล้วให้ความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 200°C เป็นเวลา 20 นาที จะทำให้มีปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล (24.5 มก./กก.) และผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของฟิโตสเตอรอลทั้งหมด (225.5 มก./กก.) สูงที่สุด ในขณะที่การให้ความร้อนมาการีนด้วยไมโครเวฟที่กำลัง 800 วัตต์ เป็นเวลา 4 นาที จะมีปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล (3.8 มก./กก.) และผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันของฟิโตสเตอรอลทั้งหมด (43.4 มก./กก.) ต่ำที่สุด โดยทั่วไปปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอลจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษามาการีนที่ผ่านการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ชนิดต่างๆ (รูปที่ 18) แสดงถึงการเกิดออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาถึงผลของชนิดของซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เติมในมาการีนต่อปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล พบว่ามาการีนที่ผ่านการเติม sito-C18:1 มีปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล สูงที่สุดตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา 20

วัน ในทั้ง 2 อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ($p < 0.05$) ในขณะที่พบปริมาณ 7-คีโตซิโตสเตอรอล ในมาการีนที่ผ่านการเติมซิโตสเตอรอลและอนุพันธ์ที่เหลือในลักษณะใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามในระหว่างการออกซิเดชันของซิโตสเตอรอลสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์จากการออกซิเดชันอื่นๆ เช่น 5,6 β -epoxysitosterol 5,6 α -epoxysitosterol 7 α -hydroxysitosterol และ 7 β -hydroxysitosterol (Johnsson และ Dutta, 2006; Scholz และคณะ, 2016; Lin และคณะ, 2016)



รูปที่ 18 ปริมาณ 7-ketositosterol ในมาการีนที่ผ่านการเติม β -sitosterol และอนุพันธ์ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C และ 55°C

6. สรุป

จากการศึกษาเสถียรภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเบต้าซิโตสเตอรอลที่ถูกเอสเทอร์ไรฟ์ด้วยกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ β -sitosteryl hexanoyl ester (Sito-C6:0 ester) β -sitosteryl lauroyl ester (Sito-C12:0 ester) β -sitosteryl palmitoyl ester (Sito-C16:0 ester) β -sitosteryl oleyl ester (Sito-C18:1 ester) เปรียบเทียบกับเบต้าซิโตสเตอรอลในระบบจำลองต่าง ๆ สามารถสรุปได้ว่าอัตราการออกซิเดชันของไฟโตสเตอรอลและอนุพันธ์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอนุพันธ์ อุณหภูมิ และประเภทของเมทริกซ์ ทั้งนี้โครงสร้างที่มีการเอสเทอร์ไรฟ์ด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสามารถเกิดการออกซิเดชันเกิดขึ้นได้สูงกว่าในโครงสร้างที่มีการดัดไขมันอิ่มตัวสายสั้น สายกลาง และสายยาวตามลำดับ นอกจากนี้การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าจะทำให้ไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์มีการออกซิเดชันได้มากกว่า และการเติมไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ในระบบอิมัลชันจะทำให้มีโอกาสเกิดการออกซิเดชันได้สูงกว่าระบบที่เป็นไขมันเพียงอย่างเดียว

7. เอกสารอ้างอิง

- Abumweis, S.S., Vanstone, C.A., Ebine, N., Kassis, A., Ausman, L.M. and Jones, P.J. 2006. Intake of a single morning dose of standard and novel plant sterol preparations for 4 weeks does not dramatically affect plasma lipid concentrations in humans. *J. Nutri.* 136: 1012-1016.
- Akihisa, T., Kokke, W. and Tamura, T. 1991. Naturally occurring sterols and related compounds from plants. In: *Physiology and biochemistry of sterols*. G.W. Peterson and W.D. Nes (eds.), pp. 172-228. AOCS, Champaign, IL.
- Ansorena, D., Barriuso, B., Cardenia, V., Astiasarán, I., Lercker, G. and Rodriguez-Estrada, M.T. 2013. Thermo-oxidation of cholesterol: Effect of the unsaturation degree of the lipid matrix. *Food Chem.* 141: 2757-2764.
- Barriuso, B., Otaegui-Arazola, A., Menéndez-Carreño, M., Astiasarán, I. and Ansorena, D. 2012. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. *Food Chem.* 135: 706-712.
- Blekas, G. and Boskou, D. 1989. Oxidation of stigmasterol in heated triacylglycerols. *Food Chem.* 33: 301-310.
- Bortolomeazzi, R., Cordaro, F., Pizzale, L. and Conte, L.S. 2003. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2394-2401.

- Bortolomeazzi, R., De Zan, M., Pizzale, L. and Conte, L.S. 2000. Identification of new steroidal hydrocarbons in refined oils and the role of hydroxyl sterols as possible precursors. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1101-1105.
- Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G. and Decker, E.A. 2007. Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chem.* 102: 161-167.
- Chien, J.T., Wang, H.C. and Chen, B.H. 1998. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2572-2577.
- Christie, W.W. 2012. Sterols and their conjugates from plants and lower organisms: Structure, occurrence, biochemistry and analysis (online). www.lipidlibrary.aocs.org.
- Conchillo, A., Cercaci, L., Ansorena, D., Rodriguez-Estrada, M.T., Lercker, G. and Astiasarán, I. 2005. Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7844 -7850.
- Dutta, P.C. 1997. Studies on phytosterol oxides. II: Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 659-666.
- Dutta, P.C. 2002. Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. In: *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*, F. Guardiola, P.C. Dutta, R. Codony and G.P. Savage (eds.), pp. 335-374. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Dutta, P.C. 2004. Chemistry, analysis, and occurrence of phytosterol oxidation products in foods. In: *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, P.C. Dutta (ed.), pp. 397-417. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Dutta, P.C. and Appelqvist, L.-Å. 1996. Sterols and sterol oxides in the potato products, and sterols in the vegetable oils used for industrial frying operations. *Grasas Aceites.* 47: 38-47.
- Dutta, P.C., Przybylski, R., Appelqvist, L.-Å. and Eskin, N.A.M. 1996. Formation and analysis of oxidized sterols in frying fat. In: *Deep Frying: Chemistry, Nutrition, and Practical Applications*, E.G. Perkins and M.D. Erickson (eds.), pp. 112-150. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Finocchiaro, E.T. and Richardson, T. 1983. Sterol oxides in foodstuffs: a review. *J. Food Prot.* 46: 917-925.
- Frankel, E.N. 1998. *Lipid Oxidation*. The Oily Press Ltd, Dundee.
- Garcia-Llatas, G. and Rodriguez-Estrada, M.T. 2011. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food, *Chem. Phys. Lipids.* 164: 607-624.

- Giuffrida, F., Destailats, F., Robert, F., Skibstedt, L.H. and Dionisi, F. 2004. Formation and hydrolysis of triacylglycerol and sterol epoxides: role of unsaturated triacylglycerol peroxy radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 104-114.
- Gordon, M.H., and Magos, P. 1983. The Effect of Sterols on the Oxidation of Edible Oils. *Food Chem.* 10: 141–147.
- Grandgirard, A., Martine, L., Joffre, C., Juaneda, P. and Berdeaux, O. 2004. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives. Application to a phytosterolenriched food. *J Chromatogr A.* 1040: 239-250.
- Hossen, M. and Hernandez, E. 2004. Phospholipid D-catalysed synthesis of novel phospholipid-phytosterol conjugates. *Lipids.* 39: 777-782.
- IUPAC. 1987. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* 7th Ed. International Union of Pure and Applied Chemistry Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK,; Methods 2.501, 2.505.
- Jägerstad, M. and Skog, K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mut. Res.* 574: 156-172.
- Jimenez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A.B. and Saura-Calixto, F. 2006. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet, *J. Agric. Food Chem.* 54: 3462-3471.
- Johnsson, L. and Dutta, P.C. 2006. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chem.* 97: 606-613.
- Jones, P.J.H., Ntanos, F.Y., Raeini-Sarjaz, M. and Vanstone, C.A. 1999. Cholesterol lowering efficiency of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men. *Am. J. Clin. Nutri.* 69: 1144-1150.
- Ke, P.J. and Woyewoda, A.D. 1979. Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. *Analytica Chimica Acta.* 106: 279-284.
- Kim, S.K. and Nawar, W.W. 1993. Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids.* 28: 917-922.
- Korahani, V., Bascoul, J. and Crastes de Paulet, A. 1982. Autoxidation of cholesterol fatty acid esters in solid state and aqueous dispersion. *Lipids* 17: 703-708.
- Lambelet, P., Grandgirard, A., Gregoire, S., Juaneda, P., Sebedio, J.-L. and Bertoli, C. 2003. Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols during refining of low erucic acid rapeseed oil. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4284-4290.

- Lampi, A.-M., Hovi, R.-L., Toivo, J. and Piironen, V. 1999. Stability of plant sterols and their effects on oils at 180°C. In: *Proceedings of the Euro Food Chem X. Functional Foods – A New Challenge for the Food Chemist*, vol. 2., R. Lásztity, W. Pfannhauser, L. Simon-Sarkadi and S. Tömösközi (eds.), pp. 513-516. Publishing company of TUB, Budapest.
- Lampi, A.-M., Juntunen, L., Toivo, J. and Piironen, V. 2002. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *J. Chromatogr. B* 777: 83-92.
- Lampi, A.-M., Toivo, J., Hovi, R.-L. and Piironen, V. 2000. Stability of plant sterols and formation of oxidation products in oils during heating. *Czech J. Food Sci.* 18 (special issue): 208-209.
- Lee, K., Herian, A.M. and Higley, N.A. 1985. Sterol oxidation products in French fries and in stored potato chips. *J. Food Prot.* 48: 158-161.
- Lees, A.M., Mok, H.Y.I., Lees, R.S., McCluskey, M.A. and Grundy, S.M. 1977. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis*. 28: 325-338.
- Lehtonen, M., Kemmo, S., Lampi, A. M. and Piironen, V. 2011. Effects of esterification on the formation and decomposition of steryl hydroperoxides. *Euro. Food Res. Tech.* 232: 255-264.
- Lehtonen, M., Lampi, A. M., Agalga, F., Struijs, K. and Piironen, V. 2012. The effects of acyl moiety and temperature on the polymerization of sterols. *Euro. J. lipid Sci. Tech.* 114: 677-686.
- Lehtonen, M., Lampi, A. M., Ollilainen, V., Struijs, K. and Piironen, V. 2011. The role of acyl moiety in the formation and reactions of steryl ester hydroperoxides. *Euro. Food Res. Tech.* 233: 51-61.
- Lin, Y., Knol, D. and Trautwein, E.A. 2016. Phytosterol oxidation products (POP) in foods with added phytosterols and estimation of their daily intake: A literature review. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 118: 1423-1438.
- Lingnert, H. 1992. Influence of food processing on lipid oxidation and flavor stability. In: *Lipid Oxidation in Food*, A.J. St. Angelo (ed.), pp. 292-301. American Chemical Society, Washington, District of Columbia.
- Maerker, G. 1987. Cholesterol autoxidation-current status. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64: 388-392.
- Maki, K.C., Davidson, M.H., Umporowicz, D.M., Schaefer, E.J., Dicklin, M.R., Ingram, K.A., Chen, S., McNamara, J.R., Gebhart, B.W., Ribaya-Mercado, J.D., Perrone, G. Robins, S.J. and Franke, W.C. 2001. Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat

- spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 33-43.
- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D. and Astiasarán, I. 2008. Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9997–10002.
- Miettinen, T.A. and Vanhanen, H. 1994. Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis*. 105: 217-226.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D. and Hicks, K.B. 2002. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* 41: 457-500.
- Nawar, W.W., Kim, S.K., Li, Y.J. and Vajdi, M. 1991. Measurement of oxidative interactions of cholesterol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 496-498.
- Nieminen, V., Laakso, P., Kuusisto, P., Niemelä, J. and Laitinen, K. 2016. Plant stanol content remains stable during storage of cholesterol-lowering functional foods. *Food Chem.* 196: 1325-1330.
- Nissinen, M., Gylling, H., Vuoristo, M. and Miettinen, T.A. 2002. Micellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am. J. Physiol.* 282: G1009-G1015.
- Nourooz-Zadeh, J. and Appelqvist, L.-Å. 1992. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat flour. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 288-293.
- Oehrl, L.L., Hansen, A.P., Rohrer, C.A., Fenner, G.P. and Boyd, L.C. 2001. Oxidation of phytosterols in a test food system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 1073-1078.
- Official European Standard ISO 8420. 1990. Animal and vegetable fats and oils –Determination of polar compounds content.
- Osada, K. 2002. Cholesterol oxidation products: other biological effects. In: *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*, F. Guardiola, P.C. Dutta, R. Codony and G.P. Savage (eds.), pp. 278-318. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Paniangvait, P., King, A.J., Jones, A.D. and German, B.G. 1995. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 60: 1159-1174.
- Panpipat, W., Dong, M., Xu, X. and Guo, Z. 2013. Thermal properties and nanodispersion behavior of synthesized β -sitosteryl acyl esters: A structure–activity relationship study. *J. Colloid Interface Sci.* 407: 177-186.

- Panpipat, W., Xu, X. and Guo, Z. 2013. Improved acylation of phytosterols by *Candida antarctica* lipase A with superior catalytic activity. *Biochem. Eng. J.* 70: 55-62.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. and Lampi, A-M. 2000. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 80: 939-966.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. and Mills, K.A. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 30:277-290.
- Roozen, J.P., Linssen, J.P.H. 1992. Factors affecting lipid autoxidation of a spray-dried milk base for baby food. In: *Lipid Oxidation in Food*, AJ St. Angelo (ed.), pp.302-309. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- Rudzińska, M., Przybylski, R. and Wąsowicz, E. 2009. Products formed during thermo-oxidative degradation of phytosterols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86: 651-662.
- Rudzińska, M., Przybylski, R. and Wąsowicz, E. 2014. Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines. *Food chem.* 142: 294-298.
- Salen, G., Kwiterovich Jr., P.O., Shefer, S., Tint, G.S., Horak, I., Shore, V., Dayal, B. and Horak, E. 1985. Increased plasma cholestanol and 5 alpha-saturated plant sterol derivatives in subjects with sitosterolemia and xanthomatosis. *J. Lipid Res.* 26: 203-209.
- SCF (European Union Scientific Committee on Food). 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads. SCF/CS/NF/DOS/1 Final.
- Scholz, B., Menzel, N., Lander, V. and Engel, K.H. 2016. Heating two types of enriched margarine: complementary analysis of phytosteryl/phytostanyl fatty acid esters and phytosterol/phytostanol oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* 64: 2699-2708.
- Sevilla, C.L., Becker, D. and Sevilla, M.D. 1986. An electron spin resonance investigation of radical intermediates in cholesterol and related compounds: relation to solid-state autoxidation. *J. Phys. Chem.* 90: 2963-2968.
- Shantha, N.C. and Decker, E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. AOAC Inter.* 77: 421-424.
- Smet, E.D., Mensink, R.P. and Plat, J. 2012. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 1058-1072.
- Smith, L.L. 1996. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids.* 31: 453-487.
- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M. and Piironen, V. 2006. Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *Eur. Food Res. Tech.* 222: 266-273.

- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.M. and Piironen, V. 2005. Esterification affects phytosterol oxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 107-118.
- Soupas, L., Juntunen, L., Lampi, A.M. and Piironen, V. 2004a. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6485–6491.
- Soupas, L., Juntunen, L., Säynäjoki, S., Lampi, A.M. and Piironen, V. 2004b. GC-MS method for characterization and quantification of sitostanol oxidation products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 135-141.
- Tai, C.Y., Chen, Y.C. and Chen, B.H. 2000. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: and overview (part II). *J. Food Drug Anal.* 8: 1-15.
- Turchetto, E., Lercker, G. and Bortolomeazzi, R. 1993. Oxisterol determination in selected coffees. *Toxicol. Ind. Health.* 9: 519-527.
- White, P.J. and Armstrong, L.S. 1986. Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 525–529.
- Yanishlieva, N. and Marinova, E. 1980. Autoxidation of sitosterol. I: Kinetic studies on free and esterified sitosterol. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 57: 477-480.
- Yanishlieva, N.VI. and Schiller, H. 1983. Effect of sitosterol on autoxidation rate and product composition in a model lipid system. *J. Sci. Food Agric.* 35: 219-224.
- Yanishlieva-Maslarova, N.VI. and Marinova-Tasheva, E.M. 1986. Effect of the unsaturation of lipid media on the autoxidation of sitosterol. *Grasas Aceites.* 37: 343-347.
- Zhang, X., Julien-David, D., Miesch, M., Geoffroy, P., Raul, F., Roussi, S., Aoudé-Werner, D. and Marchioni, E. 2005. Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids.* 70: 896-906.
- Zunin, P., Calcagno, C. and Evangelisti, F. 1998. Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *J. Dairy Res.* 65: 591-598.

Output ที่ได้จากโครงการ

- นำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัยในการประชุม นักวิจัยใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 15 เรื่อง Thermo-oxidative stability of phytosterol fatty acid esters ในระหว่างวันที่ 5-8 มกราคม 2559
- ส่งต้นฉบับงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ใน *Journal of Food Properties* (แนบในภาคผนวก)

ภาคผนวก

A relationship between β -sitosteryl esters structure and oxidation reaction in bulk oil and emulsion model systems

Journal:	<i>International Journal of Food Properties</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Panpipat, Worawan; Walailak University, Agro-Industry Chaijan, Manat; Walailak University, Agro-Industry Guo, Zheng; Aarhus Universitet
Keywords:	β -sitosteryl esters, Bulk oil, Emulsion, oxidation, Stability

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**A relationship between β -sitosteryl esters structure and oxidation reaction
in bulk oil and emulsion model systems**

Running title: β -sitosteryl esters oxidation in model matrices

Worawan Panpipat^{1*}, Manat Chaijan¹ and Zheng Guo²

¹Food Technology and Innovation Research Center of Excellence, Department of Agro-
Industry, School of Agricultural Technology, Walailak University, Thasala, Nakhon Si
Thammarat, 80161, Thailand
²Department of Engineering, Faculty of Science and Technology, Aarhus University, Gustav
Wieds Vej 10, DK-8000 Aarhus C, Denmark

To be submitted to International Journal of Food Properties

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +6675 672372
Fax: +6675 672302 e-mail: pworawan@wu.ac.th

ABSTRACT

Oxidations of β -sitosteryl esters of hexanoic, lauric, palmitic and oleic acids were evaluated in bulk oil and emulsion during storage at 55°C for 35 days in comparison with native β -sitosterol. Changes in oxidative indices (HPV, TBARS, AnV and 7-keto derivatives) differed depending on sterol structure and lipid matrix. Losses of sterol esters in both matrices fitted a first order kinetic model. Unsaturated ester oxidized faster ($k = 0.0244 \text{ day}^{-1}$, $R^2 = 0.8838$) than saturated counterpart and native β -sitosterol, especially in emulsion. Sterol structure and lipid matrix were thus the main factors determining the oxidative stability of phytosterol ester during storage.

Keywords: β -sitosteryl esters, Bulk oil, Emulsion, Oxidation, Stability

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

75 **INTRODUCTION**

76 Phytosterol esters have been fortified into various food products as a functional ingredient
77 due to their cholesterol lowering properties [1-5]. Due the lipid soluble capacity, phytosterol
78 esters are commonly supplied into food products rather than its crystalline free form in order
79 to achieve the effective dose. Abumweis et al. [5] suggested that the incorporation of
80 phytosterols into spreads, mayonnaise/salad dressing and milk/yoghurt was associated with a
81 greater efficacy in LDL-cholesterol reduction than incorporation into other foods, suggesting
82 the important role of the food matrix in the cholesterol-lowering effect.

83 Phytosterols and derivatives as lipid compounds are prone to oxidation, particularly when
84 being subjected to heat treatments and long term storage. Autoxidation of phytosterol fatty
85 acid esters involves the same free radical mechanism as that of oxidation of free phytosterols
86 [6] and the mechanism of sterol oxidation is similar to free radical oxidation of fatty acids
87 [7]. Oxidation studies have revealed that sterol hydroperoxides mainly form in the allylic C-7
88 position [6]. In addition, the same major decomposition products, the epimers of 7-
89 hydroxysterols, 5,6-epoxysterols and 7-ketosterol, as well as triol, 20-hydroxysterol, 25-
90 hydroxysterol and 3,5-cholestadien-7-one derivatives, have been found during oxidation of
91 cholesterol esters [8]. Evidence of the negative biological effects, mainly cytotoxicity, of
92 secondary phytosterol oxidation products (POPs) and their presence in plasma of healthy
93 humans have raised the question of what are the critical conditions under which the oxidative
94 reactions take place [9-10]. Different oxidation rates of sterols have been observed. For
95 instance, in aqueous alkali, free cholesterol oxidized faster than its esterified counterpart, but
96 when heated in air or dissolved in oil, the situation was the opposite [11]. Furthermore, in the
97 solid state, the autoxidation rate of free cholesterol was much lower than that of cholesterol
98 esters, but in water dispersion the oxidation rates were reversed [8].

99 Elevated temperatures and exposure to oxygen, light, water and metals (pro-oxidants) during
100 food processing can enhance lipid and phytosterol oxidations [12]. Food processes can also
101 lead to redistribution of lipid compounds in the food products, causing enlargement of the
102 contact area with oxygen and reduction in the activity of natural antioxidants [13].
103 Phytosterols would be particularly prone to oxidation when they are incorporated in
104 emulsions [14]. In the vegetable oils the phytosterol oxide contents increased after frying
105 [15]. In commercial spread enriched with phytosteryl esters, negligible amounts of
106 phytosterols were observed to be oxidized [16]. Heat processing and extended storage can
107 induce phytosterol oxidation in enriched samples and the extent of oxidation has been shown
108 to be matrix dependent [17]. At high temperatures, the phytosterols oxidized more in the
109 saturated lipid matrix, and at low temperatures, in the unsaturated matrix [17]. So far, only a
110 few studies have been carried out on phytosteryl fatty acid esters oxidation. Korahani et al.
111 [8] studied the autoxidation of cholesteryl fatty acid esters in solid-state and aqueous
112 dispersion. Yanishlieva et al. [18] studied the autoxidation of β -sitosteryl stearate in its pure
113 state. In addition, Soupas et al. [19] reported that phytosteryl esters were more reactive than
114 free phytosterols during prolonged heating at 100°C whereas free phytosterols were slightly
115 more reactive than phytosteryl esters at 180°C. Soupas et al. [17] established that the
116 structure and lipid matrix are the main factors affecting the formation of oxidative
117 derivatives. In the case of unsaturated lipid matrix, the oxidation of lipid matrix and sterol
118 was coupled. The oxidative process has started with oxidation of the unsaturated lipids and
119 spreads to the sterol compounds [17].
120 However, no systematic research has been carried out on phytosterol fatty acid ester
121 oxidation. Thus, the aim of this study was to evaluate the oxidative stability of four
122 synthesized phytosterol fatty acid esters including β -sitosteryl hexanoate (Sito-C6), β -
123 sitosteryl laurate (Sito-C12), β -sitosteryl palmitate (Sito-C16) and β -sitosteryl oleate (Sito-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

124 C18:1), in comparison with native phytosterol (β -sitosterol), during accelerated storage in
125 bulk oil and emulsion model systems at 55°C for 35 days. The structure-stability relationship
126 and the influence of matrix on the rate of oxidation were mainly focused in this study.

127

128 **MATERIAL AND METHODS**

129 **Chemicals**

130 β -Sitosterol was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hexanoic acid, lauric
131 acid, palmitic acid and oleic acid were from Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN, USA) with a
132 minimum purity of 95%. Immobilized *Candida antarctica* lipase A, NZL-101 was purchased
133 from Codexis, Inc. (Pasadena, CA, USA). All solvents such as methanol, diethyl ester, *n*-
134 hexane and acetone were of HPLC grade and obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,
135 USA).

136 **Synthesis of phytosteryl fatty acid esters**

137 In this study, β -sitosterol was selected as a model substrate for synthesis of phytosteryl fatty
138 acid esters because it is the most abundant phytosterol found naturally in plants and plant
139 products. A series of aliphatic fatty acid esters of β -sitosterol were prepared according to the
140 method of Panpipat et al. [20] by mixing β -sitosterol with short chain- (hexanoic acid),
141 medium chain- (lauric acid), long chain- (palmitic acid) and unsaturated- fatty acid (oleic
142 acid) at a mole ratio of 1.0:1.0 (mol/mol). The concentrations of β -sitosterol and fatty acid
143 were fixed at 0.2 M. The reaction was typically performed at 40°C for 24 h with agitation at
144 500 rpm using hexane as a solvent in the presence of 5% *Candida antractica* lipase A (CAL
145 A) (wt% of β -sitosterol). The reaction was terminated by filtering out the enzyme. The
146 resulting reaction mixtures were applied onto a thin layer chromatography (TLC) with silica

1
2
3 147 gel to confirm the formation of products. The plates were developed with cyclohexane/ethyl
4
5 148 acetate (4:1, v/v).

6
7 149 To remove unreacted fatty acids, the reaction mixture (1 g) was dissolved in 10 ml diethyl
8
9 150 ether. The extracts were deacidified by three consecutive treatments with 6 ml, each, of 2%
10
11 151 aqueous sodium carbonate solution, followed by repeated extractions with water, to remove
12
13 152 the unesterified fatty acids as sodium salts. The diethyl ether phase was dried over anhydrous
14
15 153 sodium sulfate to yield 530 mg of a product containing <2% unesterified fatty acids. Future
16
17 154 more, the deacidified reaction mixture (around 0.5 g), as obtained earlier, was dissolved in 5
18
19 155 ml hexane:diethyl ether (9:1, v/v) and applied to a column (20 cm×1.5 cm i.d.) packed with
20
21 156 Silica Gel 60 (Merck) as a slurry in hexane. Elution with 30 ml hexane:diethyl ether (95:5,
22
23 157 v/v) yielded 168 mg crude reaction products containing 67% steryl esters. Subsequent elution
24
25 158 with 30 ml hexane:diethyl ether (1:1, v/v) yielded unreacted fatty acids together with small
26
27 159 proportions of unreacted sterols. Thereafter, 130 mg of the crude steryl esters from column
28
29 160 chromatography, was dissolved in 2 ml acetone at 50°C. Water, 0.2 ml, was added dropwise
30
31 161 under shaking. After cooling to 7°C, the acetone-water mixture was centrifuged and the
32
33 162 supernatant removed. The pellet was redissolved in 2 ml acetone and the procedure repeated.
34
35 163 After four cycles, the pellet (85 mg) consisted of 90% steryl esters. The resulting products
36
37 164 were then dissolved in diethyl ester and subsequently applied to TLC in order to confirm the
38
39 165 purity.

166 **Oxidation in bulk oil**

40
41 167 Tripalmitin (purity minimum 85%), which was being used as the matrix for bulk oil, was
42
43 168 enriched with β -sitosteryl esters with different fatty acids incorporated or commercial β -
44
45 169 sitosterol at a level equivalent to 1% (w/w). The oxidation of the enriched samples (5.0 g)
46
47 170 was carried out in glass vials in an oven (Memmert, Schwabach, Germany) at 55°C
48
49 171 (accelerated lipid oxidation system) for 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days. The vials were taken
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

from the oven at each sampling point and cooled in a desiccator before analysis. Samples were subjected to analyze for lipid hydroperoxide (HPV), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), *p*-Anisidine value (AnV), 7-keto derivatives and non-oxidized phytosterol esters. Remaining of phytosterol esters and their kinetic parameters were also calculated.

Oxidation in emulsion

Oil-in-water emulsions were prepared by blending tripalmitin with a polyoxyethylene lauryl ether solution (Brij35; 1.5% w/w in 10 mM acetate-imidazole buffer, pH 7.0) at a final lipid concentration of 15% (w/w). β -sitosterol esters and commercial β -sitosterol were added at 5% of total fat content (w/w). Emulsion was made by homogenizing the lipid and aqueous phases for 5 min, using an IKA Labortechnik homogenizer (Selangor, Malaysia) at 20,000 rpm. Samples (5.0 g) were placed in glass vials and left in an oven at 55°C (accelerated lipid oxidation system) for 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days. The vials were taken from the oven at each sampling point and cooled in a desiccator before analysis. The oxidation of enriched steryl esters emulsions was determined as same as in bulk oil system.

Determination of lipid hydroperoxide value (HPV)

HPV was determined using a modified method of Shantha and Decker [21]. Samples were mixed with 2.8 ml of choloform/methanol (2:1, v/v) and 30 μ l of thiocyanate/ Fe^{2+} solution and then vortexed. The thiocyanate/ Fe^{2+} solution was made by mixing one part of 3.94 M thiocyanate solution with one part of 0.072 M Fe^{2+} solution (obtained from the supernatant of a mixture of one part of 0.144 M FeSO_4 and one part of 0.132 M BaCl_2 in 0.4 M HCl). After 20 min, the absorbance was measured at 510 nm using a UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). HPV was determined using a cumene hydroperoxide standard curve.

196 Determination of *p*-Anisidine value (AnV)

197 AnV was determined spectrophotometrically using the standard method 2504 IUPAC [22] using a
198 UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)

199 Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

200 TBARS was determined by using spectrophotometric method as described by Ke and
201 Woyewoda [23]. Sample (50 mg) was mixed with 5 ml of TBA solution. The solution was
202 incubated in boiling water for 45 min. Mixed solution was cooled down to room temperature
203 by using ice bath. Thereafter, TCA solution (4 ml) was added. The resulting solution was
204 centrifuged at 2,500×*g* in a RC-5B plus centrifuge (Sorvall, Norwalk, CT, USA) for 10 min
205 in order to separate the pink water phase from the chloroform phase (bottom). The water
206 phase was collected and subjected to measure the absorbance at 538 nm against blank that
207 was prepared as above without oil sample. Standard curve was made by varying
208 concentration of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) from 0-1.4 mg/l.

209 Analysis of phytosterol oxide

210 Analysis of phytosterol oxide was carried out according to the method of Soupas et al. [24]
211 by using 19-hydroxycholesterol as an internal standard in which the main steps were cold
212 saponification (overnight at 25°C), extraction of unsaponifiable material with diethyl ether,
213 purification of oxides by SiOH-SPE, derivatization of oxides to TMS ethers and analysis by
214 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The oxidized sample was dissolved in 5
215 ml of hexane/diethyl ether (9:1, v/v) and purified by the SiOH-SPE. In brief, the SiOH-SPE
216 cartridge was activated with 5 ml of hexane, after that 1 ml of oxidized sample was applied.
217 The cartridge was washed with 5 ml of hexane/diethyl ether (9:1 v/v) and 5 ml of
218 hexane/diethyl ether (1:1 v/v) to remove a polar compounds and non-oxidized phytosterols,
219 respectively. Phytosterol oxides were eluted with 5 ml of acetone. 19-Hydroxycholesterol (10
220 µg) was added to these acetone extracts to act as references, and the extracts was then dried

1
2
3 221 under nitrogen, dissolved in 100 µl of pyridine, and subjected to silylation by BSTFA/TMCS
4
5 222 (100 µl) overnight at room temperature. The reagent was evaporated and trimethylsilyl
6
7 223 (TMS) ether derivative was dissolved in 200 µl of hexane before GC-MS analysis. GC
8
9
10 224 conditions were set as follows: column: Rtx-5MS w/ Integra Guard capillary column (cross
11
12 225 bond 5% diphenyl–95% dimethyl polysiloxane), film thickness 0.10 µm, 60 m × 0.25 mm
13
14 226 i.d.; carrier gas: helium, 1.2 ml/min (constant flow); temperature program: 70°C (1 min),
15
16 227 40°C/min to 280°C (35 min). MS conditions were set as follows: interface temperature,
17
18 228 280°C; ion source, 230°C; ionization: electron impact (EI) 70 eV. Quantification of
19
20 229 phytosterol oxides was performed by comparison the peak areas of the internal standard (19-
21
22 230 hydroxycholesterol). The GC response factor of phytosterol oxide was considered equal to 1.

23 231 **Analysis of sterol remaining**

24
25
26
27 232 Non-oxidized sterol contents of the samples were analyzed using a hot saponification method
28
29 233 [25]. In brief, lipid samples (0.25 g) were weighed into a 50 ml test tube. The internal
30
31 234 standard, dihydrocholesterol (0.4 mg) was added, and the samples were subjected to hot
32
33 235 saponification and extraction of unsaponifiables with 20 ml of hexane/diethyl ether (1:1, v/v)
34
35 236 after the addition of 12 ml of water. Phytoterol was silylated with
36
37 237 bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TCMS) and
38
39 238 analyzed using gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID). Analysis parameters
40
41 239 was set as follows: oven temperature 290°C; injector and detector (FID) temperatures 310°C;
42
43 240 carrier gas, helium at 1.6 ml/min. Phytosterols was identified by comparing their retention
44
45 241 times (relative to 5a-cholestane) with those of β-sitosterol standards. The sterol remaining
46
47 242 was calculated as follow:

48
49
50
51
52
$$\text{Sterol remaining (\%)} = \frac{\text{Sterol content at time interval}}{\text{Initial sterol content}} \times 100$$

53
54

55 243
56
57 244
58
59
60

245 Statistical Analysis

246 Data were subjected to analysis of variance (ANOVA). Comparison of means was carried out
247 by Duncan's multiple-range test to identify significant differences ($p < 0.05$) among treatments
248 [26]. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Science
249 (SPSS 10.0 for windows, SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).

250

251 RESULTS AND DISCUSSION

252 HPV

253 HPVs of β -sitosterol and its esters carried different fatty acid chain lengths during incubation
254 at 55°C for 35 days in bulk oil and emulsion model systems are presented in Fig.1A and 1B,
255 respectively. Generally, sitosterol oxides can be major products of β -sitosterol oxidation [27].
256 The oxidation of steryl esters in lipid media has been previously studied by measuring
257 peroxide values [18, 28] and peroxide values reflect all hydroperoxyl groups presented in the
258 sample [29]. Thus, HPV can be used to evaluate the degree of oxidation of β -sitosterol and its
259 esters. From the results, in bulk oil system, the highest HPV at all time points was found in
260 Sito-C18:1, an unsaturated fatty acid derivative ($p < 0.05$). HPV of Sito-C18:1 continuously
261 increased with increasing incubation time. For the native β -sitosterol, the HPV tended to have
262 the lowest value at the end of the incubation time, even though it gradually increased up to 21
263 days and declined thereafter. For a short chain fatty acid ester, Sito-C6, the change in HPV
264 was found with the same trend as native β -sitosterol but the values were higher at all time
265 points, especially at the end ($p < 0.05$). The most structural similarity between native β -
266 sitosterol and short chain fatty acid ester (Sito-C6) would result in the same pattern of
267 hydroperoxide formation during incubation but short chain saturated fatty acid incorporated

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

268 may undergo oxidation faster than long chain counterpart. With increasing carbon chain
269 length, from C12-C16, different changes in HPV were noticeable. HPV in Sito-C12 tended to
270 gradually increase throughout the storage time whereas changes in HPV of Sito-C16 had the
271 same trend with native β -sitosterol. Overall, at the end of storage, the lowest HPV was found
272 in native β -sitosterol, followed by Sito-C16, Sito-C12, Sito-C6 and Sito-C18:1, respectively
273 ($p<0.05$). It can be postulated that structure of β -sitosterol with unsaturated fatty acid led to a
274 greater formation of HPV than that with saturated fatty acid. Among β -sitosterol-saturated
275 fatty acid esters, the shorter the chain length incorporated, the greater the HPV can be found.
276 The degree of hydroperoxide formation in β -sitosterol-saturated fatty acid esters at the end of
277 storage would in a relation with their fat-solubility. It has been reported that esterification of
278 β -sitosterol with fatty acids introduced an aliphatic acyl group into sterol structure and
279 resulted in a significant decrease in melting points [20]. Native β -sitosterol, Sito-C6, Sito-
280 C12, Sito-C16 and Sito-C18:1 had a melting point of 134.1, 67.7, 79.5, 89.6 and 58.5°C,
281 respectively [20]. Fat solubility of β -sitosterol-saturated fatty acid ester with shorter chain
282 length should be more given. As a consequence, the shorter the chain length, the greater the
283 opportunity to oxidize to form primary product, hydroperoxide, can be expected in bulk oil.
284 In case of emulsion, the greater HPV accumulation was also found in Sito-C18:1 ($p<0.05$)
285 and the HPV in emulsion system was generally higher than in bulk oil suggesting the
286 profound effect of matrix on oxidation of β -sitosterol esters. HPV of native β -sitosterol, Sito-
287 C6 and Sito-C12 in emulsion tended to increase throughout the storage whereas Sito-C16
288 exhibited the different pattern. HPV of Sito-C16 increased gradually during the first 2 weeks
289 and decreased thereafter.

290
291
292

TBARS

TBARS of β -sitosteryl esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C for 35 days in bulk oil and emulsion model systems are presented in Fig.2A and 2B, respectively. In bulk oil system, TBARS in all samples increased markedly throughout storage ($p<0.05$). During the first 14 days, non-significant differences in TBARS in bulk oil among samples were found ($p>0.05$). With increasing storage time, Sito-C18:1 tended to have the highest TBARS value. Since decomposition of hydroperoxides yield aldehydes resulting in increased the secondary lipid oxidation products as measured by TBARS. The maximum TBARS value in bulk oil system was found to be 23-28 mg MDA equivalent/kg at the end of storage. It has been reported that headspace hexanal concentration in bulk corn oil containing $6,481\pm220$ mg phytosterol/kg oil increased with increasing storage time up to 40 days at 55°C [28]. For the emulsion system, TBARS in all samples also increased with increasing storage time ($p<0.05$) and the highest content of TBARS was found in Sito-C18:1, followed by Sito-C6 and Sito-C16, respectively. Native β -sitosterol and Sito-C12 had the lowest TBARS values ($p<0.05$). At the end of storage (day 35), the maximum TBARS values in emulsion system were found in the ranges of 38-43 mg MDA equivalent/kg. Generally, the degree of TBARS formation in emulsion was higher than in bulk oil with approximately 35%. The results were in agreement with Cercaci et al. [28] who found markedly higher phytosterol oxidation as shown by greater hexanal content in corn oil-in-water emulsion when compared to bulk oil during storage at 55°C. The results suggested that both nature of alkyl side chain and the food matrix were the main factors affecting the oxidation of β -sitosteryl esters during storage at elevated temperature.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

318 ***p*-Anisidine value (AnV)**

319 AnV of β -sitosteryl esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C
320 for 35 days in bulk oil and emulsion model systems are presented in Fig.3A and 3B,
321 respectively. AnV of all treatments changed differently in which they tended to increase with
322 increasing storage time. However, in bulk oil, the AnV of all treatments increased up to day
323 21 and dropped thereafter ($p<0.05$). The lowest AnV could be seen in native β -sitosterol. In
324 emulsion, the AnV showed doubly higher than in bulk oil. AnV of all samples increased
325 continuously till the end of storage ($p<0.05$) excepted for Sito-C16 which was reduced at the
326 end. At the end, the highest AnV in emulsion was noticeable in Sito-C18:1, followed by Sito-
327 C6/Sito-C16 and Sito-C12/native β -sitosterol, respectively. It has been reported that AnV
328 was used to monitor the oxidation of spreads enriched with plant stanol ester ingredient
329 during refrigerated storage (6°C) [30] and the result differed considerably from this study. It
330 was noted that, under low temperature storage, the AnV of spreads negligibly changed during
331 22 days of storage whereas, with higher temperature (55°C) and different matrix, the AnV
332 increased faster in this study. Overall, unsaturated structure of β -sitosteryl ester was more
333 prone to oxidation especially within emulsion as evidenced by the highest HPV, TBARS and
334 AnV whereas the oxidation of saturated counterparts was dependent on chain length and food
335 matrix.

336 **7-ketositosterol**

337 Fig. 4A and 4B show the concentrations of 7-keto derivatives of β -sitosterol and its fatty acid
338 esters in bulk oil and emulsion, respectively. In general, the 7-ketositosterol distribution was
339 higher in emulsion system when compared with bulk oil system. The same trend has been
340 also noticed by Cercaci et al. [28] who found the higher content of 7-keto derivatives in oil-
341 in-water emulsion than in bulk oil. The result suggested that 7-keto derivatives formation was
342 faster in the emulsified oil than in the bulk oil. This was due to the fact that the surface area

of the oil in the emulsion is high. The contents of 7-keto derivatives in all samples tended to increase throughout the storage. In both matrices, sample containing Sito-C18:1 had higher content of 7-keto derivatives ($p < 0.05$), suggesting the enhancement effect of unsaturated structure on phytosteryl ester instability. At the end of storage in bulk oil, the 7-keto derivatives content was found in order of Sito-C18:1 > Sito-C6 > Sito-C12 > Sito-C16 > native β -sitosterol. This trend was somehow similar with HPV (Fig. 1A). However, in emulsion system, different orders were noticeable in which Sito-C18:1 > Sito-C16 > Sito-C12 > native β -sitosterol > Sito-C6.

Remaining of phytosterol esters and kinetics evaluation

The content of β -sitosterol and its fatty acid esters decreased during storage as shown by a reduction in remaining percentage of β -sitosterol and its fatty acid esters in both bulk oil (Fig. 5A) and emulsion (Fig. 5B) ($p < 0.05$). The effect was much more seen in emulsion when compared to bulk oil, especially at the end of storage, in which the lower remaining content of β -sitosterol and its fatty acid esters was found in emulsion. The result was in agreement with Cercaci et al. [28] who found that a higher phytosterols oxidation products level and formation rate was found in the emulsion than in the bulk oil. In bulk oil, remaining percentage of β -sitosterol and its esters gradually decreased throughout the storage and the degree of loss was highest in Sito-C18:1 ($p < 0.05$) followed by Sito-C16, Sito-C12, Sito-C6 and β -sitosterol, respectively. In emulsion, the lowest remaining content was also found in Sito-C18:1 and native β -sitosterol tended to show the highest stability during storage. This was in agreement with the TBARS values of these sterols throughout the storage. In both matrices, some of native β -sitosterol may precipitate due to its poor solubility in fat. Although, surface tension measurements showed that phytosterols had a high degree of surface activity [28]. However, for phytosterol esters, they should behave differently between two matrices. In bulk oil, phytosterol esters may solubilize in oil whereas they may align at

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

368 both oil-water interface and oil phase in emulsion system. Phytosterol esters may have higher
369 degree of surface activity than native phytosterol, which would allow them to migrate to the
370 oil-water interface of the emulsion droplets where oxidative stress is high. Thus, the degree of
371 oxidation was higher in emulsion system. Since the oxidation can be enhanced at the
372 interface when compared to oil or water phase [28]. All tested β -sitosterol fatty acid esters in
373 this study can form nanodispersions and their stabilities were different depending on their
374 structures [20].

375 From the results, the remaining β -sitosterol and its fatty acid esters contents could depend on
376 the degree and stage of oxidation. Since different pattern of changes among samples and
377 matrices were noticeable for HPV (Fig. 1), TBARS (Fig. 2), AnV (Fig. 3) and 7-
378 ketositosterol content (Fig. 4) during storage. HPV referred to the primary oxidation product
379 whereas TBARS, AnV and 7-ketositosterol measured the secondary oxidation products. Total
380 changes of both primary and secondary stages of lipid oxidation resulted in the decrease of
381 remaining β -sitosterol and its fatty acid esters contents.

382 A kinetic evaluation of the loss of β -sitosterol and its esters throughout the storage was
383 performed (Table 1). All changes fitted a first order kinetic model which showed high values
384 of correlation coefficient ($R^2 = 0.7612-0.9819$). The result was on the page with the report of
385 Ansorena et al. [31] who found the first order kinetic during thermo-oxidation of cholesterol.

386 In both matrices, the lowest decrease rate was found in β -sitosterol followed by saturated β -
387 sitosteryl esters and unsaturated sitosteryl ester (Table 1). When compared between two
388 matrices, the rate of decrease in β -sitosterol was not much different in bulk oil and emulsion
389 in which their rate constants (k values) were not much different (0.0099 vs 0.0085). In the
390 case of β -sitosteryl esters, those in emulsion system tended to have greater rate of decrease
391 than bulk oil. The linearity in decrease of β -sitosteryl esters in bulk oil was better than in
392 emulsion as shown by higher R^2 value. The results suggested that during storage the

oxidation and other reactions of β -sitosteryl esters continuously occurred in bulk oil whereas the fluctuation of change was found in emulsion system due to the progressive oxidation. The rate of oxidation products formation and decomposition may vary to a greater extent in emulsion system leading to the different pattern of changes when compared to bulk oil system. In addition, not only oxidized phytosterols were found during thermo-oxidative degradation but other products e.g. fragmented phytosterol molecules, volatile compounds and oligomers were also found [32]. This was the reason why the remaining percentage of β -sitosterol and its fatty acid esters decreased throughout the storage.

401

402 CONCLUSION

Oxidations of synthesized β -sitosteryl esters in bulk oil and emulsion during accelerated storage at 55°C were faster than native β -sitosterol. Oxidative indices including HPV, TBARS, AnV and 7-keto derivatives changed differently during storage depending on sterol structure and lipid matrix. However, all indices tended to increase throughout storage. Overall, losses of β -sitosterol and its esters in both matrices fitted a first order kinetic model. Unsaturated β -sitosteryl ester (Sito-C18:1) seemed to oxidize faster than saturated counterpart and native β -sitosterol. Additionally, the oxidation was more likely enhanced in emulsion system than in bulk oil. Therefore, the oxidative stability of phytosteryl ester during storage was mainly governed by phytosterol structure and lipid matrix.

412

413 Acknowledgement

This research was supported by Thailand Research Fund (TRF) and Walailak University under the grant number TRG5780078.

416

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Miettinen, T.A.; Vanhanen, H. Dietary Sitostanol Related to Absorption, Synthesis and Serum Level of Cholesterol in Different Apolipoprotein E Phenotypes. *Atherosclerosis*. **1994**, *105*, 217-226.

2. Clifton, P.M.; Noakes, M.; Sullivan, D.; Erichsen, N.; Ross, D.; Annison, G.; Nestel, P. Cholesterol-lowering Effects of Plant Sterol Esters Differ in Milk, Yoghurt, Bread and Cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*. **2004**, *58*, 503-509.

3. Noakes, M.; Clifton, P.M.; Doornbos, A.M.; Trautwein, E.A. Plant Sterol Ester-enriched Milk and Yoghurt Effectively Reduce Serum Cholesterol in Modestly Hypercholesterolemic Subjects. *European Journal of Nutrition*. **2005**, *44*, 214-222.

4. Madsen, M.B.; Jensen, A.M.; Schmidt, E.B. The Effect of a Combination of Plant Sterol-enriched Foods in Mildly Hypercholesterolemic Subjects. *Clinical Nutrition*. **2007**, *26*, 792-798.

5. Abumweis, S.S.; Vanstone, C.A.; Ebine, N.; Kassis, A.; Ausman, L.M.; Jones, P.J.; Lichtenstein, A.H. Intake of a Single Morning Dose of Standard and Novel Plant Sterol Preparations for 4 Weeks Does Not Dramatically Affect Plasma Lipid Concentrations in Humans. *The Journal of Nutrition*. **2006**, *136*, 1012-1016.

6. Lercker, G.; Rodrigues-Estrada, M.T. Cholesterol Oxidation Mechanism. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products*; Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P., Eds.; AOAC Press: Champaign, 2002; 1-25.

7. Rudzinska, M.; Przybylski, R.; Zhao, Y.Y.; Curtis, J.M. Sitosterol Thermo-oxidative Degradation Leads to The Formation of Dimers, Trimers and Oligomers: A Study Using Combined Size Exclusion Chromatography/Mass Spectrometry. *Lipids*. **2010**, *45*, 549-558.

- 441 8. Korahani, V.; Bascoul, J.; Crastes de Paulet, A. Autoxidation of Cholesterol Fatty Acid
442 Esters in Solid State and Aqueous Dispersion. *Lipids*. **1982**, *17*, 703-708.
- 443 9. Smet, E.D.; Mensink, R.P.; Plat, J. Effects of Plant Sterols and Stanols on Intestinal
444 Cholesterol Metabolism: Suggested Mechanisms from Past to Present. *Molecular*
445 *Nutrition & Food Research*. **2012**, *56*, 1058-1072.
- 446 10. Maki, K.C.; Davidson, M.H.; Umporowicz, D.M.; Schaefer, E.J.; Dicklin, M.R.; Ingram,
447 K.A.; Perrone, G. Lipid Responses to Plant-sterol-enriched Reduced-fat Spreads
448 Incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I Diet. *The American*
449 *journal of clinical nutrition*. **2001**, *74*, 33-43.
- 450 11. Smith, L.L. Review of Progress in Sterol Oxidations: 1987-1995. *Lipids*. **1996**, *31*, 453-
451 487.
- 452 12. Lingnert, H. Influence of Food Processing on Lipid Oxidation and Flavor Stability. In
453 *Lipid Oxidation in Food*; St. Angelo, A.J., Ed.; American Chemical Society: Washington,
454 1992; 292-301.
- 455 13. Roozen, J.P.; Linssen, J.P.H. Factors Affecting Lipid Autoxidation of A Spray-dried
456 Milk Base for Baby Food. In *Lipid Oxidation in Food*; St. Angelo, A.J., Ed.; American
457 Chemical Society: Washington, 1992; 302-309.
- 458 14. Rudzińska, M.; Przybylski, R.; Wąsowicz, E. Degradation of Phytosterols during Storage
459 of Enriched Margarines. *Food Chemistry*. **2014**, *142*, 294-298.
- 460 15. Dutta, P.C. Studies on Phytosterol Oxides. II: Content in Some Vegetable Oils and in
461 French Fries Prepared in These Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1997**,
462 *74*, 659-666.
- 463 16. Grandgirard, A.; Martine, L.; Joffre, C.; Juaneda, P.; Berdeaux, O. Gas Chromatographic
464 Separation and Mass Spectrometric Identification of Mixtures of Oxyphytosterol and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

465 Oxycholesterol Derivatives: Application to a Phytosterol-enriched Food. Journal of
466 Chromatography A. **2004**, *1040*, 239-250.

467 17. Soupas, L.; Juntunen, L.; Lampi, A.M.; Piironen, V. Effects of Sterol Structure,
468 Temperature, and Lipid Medium on Phytosterol Oxidation. Journal of Agricultural and
469 Food Chemistry. **2004**, *52*, 6485-6491.

470 18. Yanishlieva, N.; Marinova, E.; Schiller, H.; Seher, A. Comparison of Sitosterol
471 Autoxidation in Free Form, as Fatty Acid Ester and in Triacylglycerol Solution. Kinetics
472 of the Process and Structure of the Products Formed. Developments in Food Science.
473 **1985**, *11*, 619-626.

474 19. Soupas, L.; Huikko, L.; Lampi, A.M.; Piironen, V. Esterification Affects Phytosterol
475 Oxidation. European Journal of Lipid Science and Technology. **2005**, *107*, 107-118.

476 20. Panpipat, W.; Dong, M.; Xu, X.; Guo, Z. Thermal Properties and Nanodispersion
477 Behavior of Synthesized β -Sitosteryl Acyl Esters: A Structure-Activity Relationship
478 Study. Journal of Colloid and Interface Science. **2013**, *407*, 177-186.

479 21. Shantha, N.C.; Decker, E.A. Rapid, Sensitive, Iron-based Spectrophotometric Methods
480 for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. Journal of AOAC International.
481 **1994**. *77*, 421-424.

482 22. IUPAC. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 7th Ed.
483 International Union of Pure and Applied Chemistry Blackwell Scientific Publications:
484 Oxford, UK, 1987; Methods 2.501, 2.505.

485 23. Ke, P.J.; Woyewoda, A.D. Microdetermination of Thiobarbituric Acid Values in Marine
486 Lipids by a Direct Spectrophotometric Method with a Monophasic Reaction System.
487 Analytica Chimica Acta. **1979**, *106*, 279-284.

24. Soupas, L.; Juntunen, L.; Säynäjoki, S.; Lampi, A.M.; Piironen, V. GC-MS Method for Characterization and Quantification of Sitostanol Oxidation Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2004**, *81*, 135-141.
25. Lampi, A.M.; Juntunen, L.; Toivo, J.; Piironen, V. Determination of Thermo-oxidation Products of Plant Sterols. *Journal of Chromatography B*. **2002**, *777*, 83-92.
26. Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. *Principle and Procedure of Statistics*. McGraw-Hill: New York, USA, 1980; 633 pp.
27. Barriuso, B.; Otaegui-Arrazola, A.; Menéndez-Carreño, M.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. Sterols Heating: Degradation and Formation of Their Ring-structure Polar Oxidation Products. *Food Chemistry*. **2012**, *135*, 706-712.
28. Cercaci, L.; Rodriguez-Estrada, M.T.; Lercker, G.; Decker, E.A. Phytosterol Oxidation in Oil-in-Water Emulsions and Bulk Oil. *Food Chemistry*. **2007**, *102*, 161-167.
29. Lehtonen, M.; Lampi, A.M.; Riuttamäki, M.A.; Piironen, V. Oxidation Reactions of Steryl Esters in a Saturated Lipid Matrix. *Food Chemistry*. **2012**, *134*, 2030-2039.
30. Nieminen, V.; Laakso, P.; Kuusisto, P.; Niemelä, J.; Laitinen, K. Plant Stanol Content Remains Stable during Storage of Cholesterol-lowering Functional Foods. *Food Chemistry*. **2016**, *196*, 1325-1330.
31. Ansorena, D.; Barriuso, B.; Cardenia, V.; Astiasarán, I.; Lercker, G.; Rodriguez-Estrada, M.T. Thermo-oxidation of Cholesterol: Effect of the Unsaturation Degree of the Lipid Matrix. *Food Chemistry*. **2013**, *141*, 2757-2764.
32. Rudzińska, M.; Przybylski, R.; Wąsowicz, E. Products Formed during Thermo-Oxidative Degradation of Phytosterols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2009**, *86*, 651-662.

Table 1 Kinetic parameters for remaining β -sitosterol and β -sitosteryl esters enriched oil and emulsion throughout the accelerated oxidation test at 55°C

Sample	Remaining β -sitosterol and β -sitosteryl ester ^a			
	Bulk oil		Emulsion	
	k (day ⁻¹)	R ²	k (day ⁻¹)	R ²
β -sitosterol	0.0099	0.9648	0.0085	0.9819
Sito-C6 ester	0.0118	0.9819	0.0168	0.8613
Sito-C12 ester	0.0147	0.9637	0.0147	0.7633
Sito-C16 ester	0.0181	0.9052	0.0177	0.7612
Sito-C18:1 ester	0.0202	0.9391	0.0244	0.8838

^aFirst order kinetic model corresponding to $\ln \frac{S_{itot}}{S_{ito0}} = -kt$

Figure legends

Fig. 1 Changes in hydroperoxide value (HPV) of β -sitosterol and its esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C for 35 days in bulk oil (A) and emulsion (B) model systems. The bars indicate standard deviation from triplicate determinations.

Fig. 2 Changes in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of β -sitosterol and its esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C for 35 days in bulk oil (A) and emulsion (B) model systems. The bars indicate standard deviation from triplicate determinations.

Fig. 3 Changes in *p*-Anisidine value (AnV) of β -sitosterol and its esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C for 35 days in bulk oil (A) and emulsion (B) model systems. The bars indicate standard deviation from triplicate determinations.

Fig. 4 Changes in 7-ketositosterol content of β -sitosterol and its esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C for 35 days in bulk oil (A) and emulsion (B) model systems. The bars indicate standard deviation from triplicate determinations.

Fig. 5 Changes in remaining percentage of β -sitosterol and its esters with different fatty acid chain lengths during incubation at 55°C for 35 days in bulk oil (A) and emulsion (B) model systems. The bars indicate standard deviation from triplicate determinations.

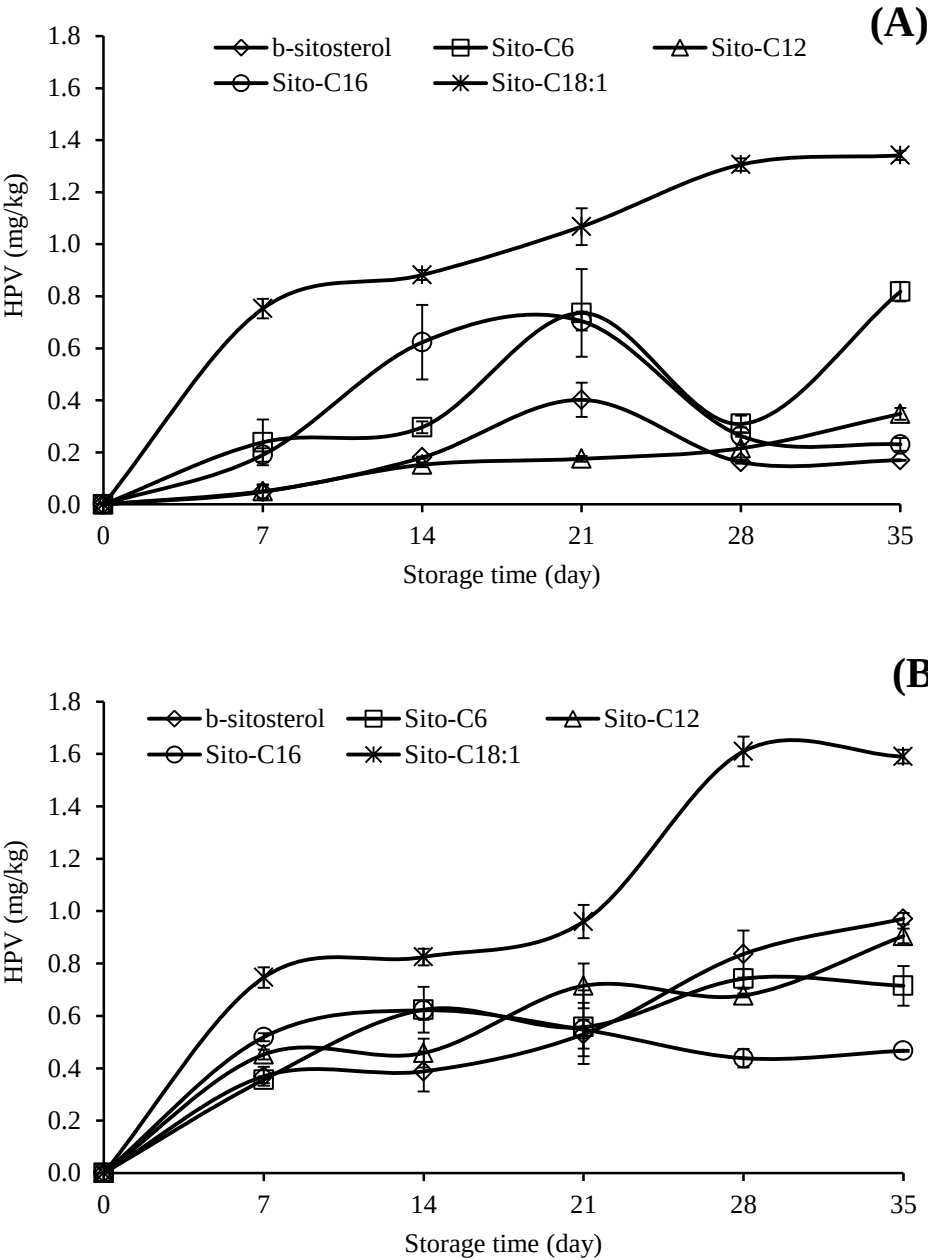
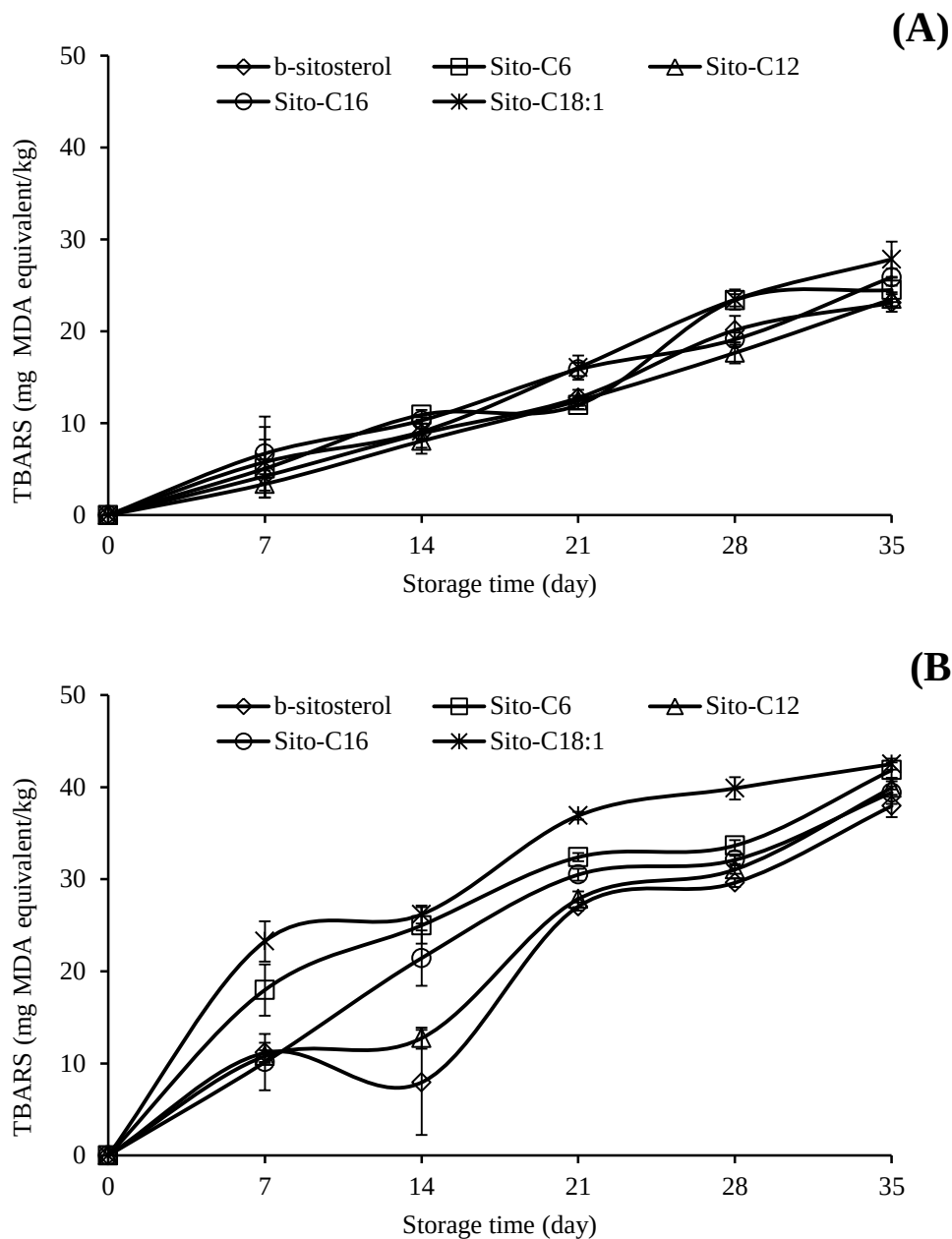


Fig. 1

**Fig. 2**

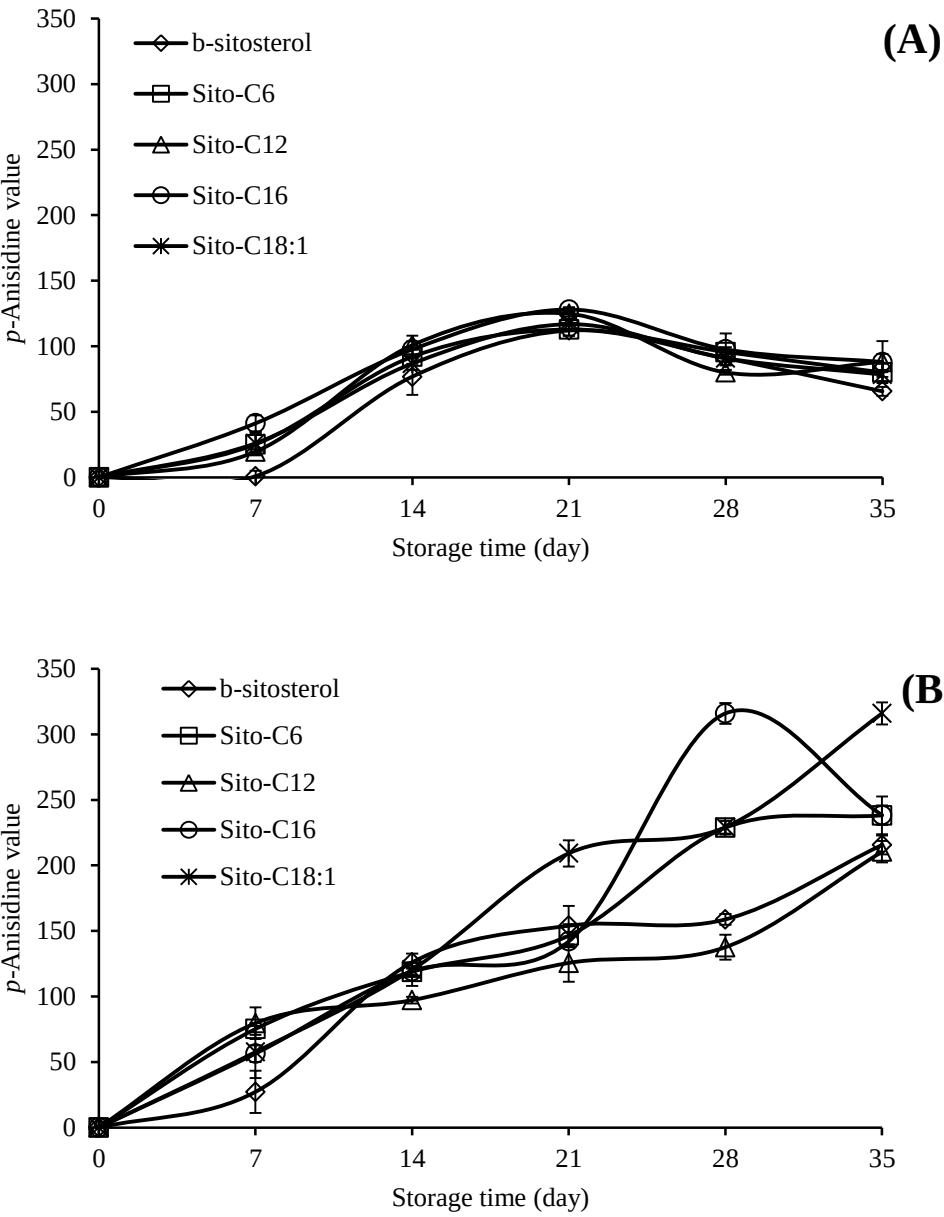
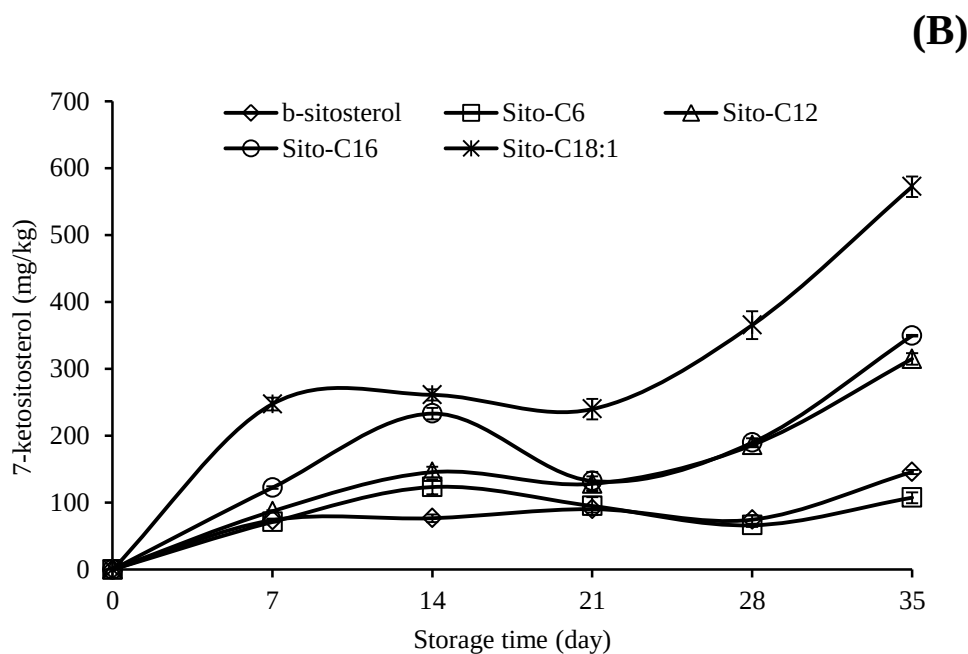
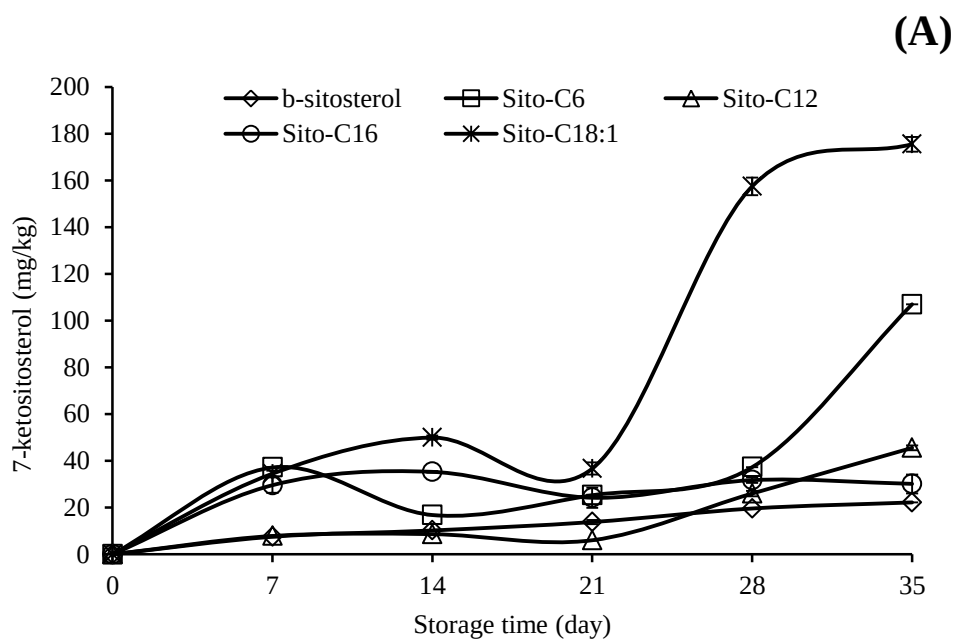


Fig. 3

**Fig. 4**

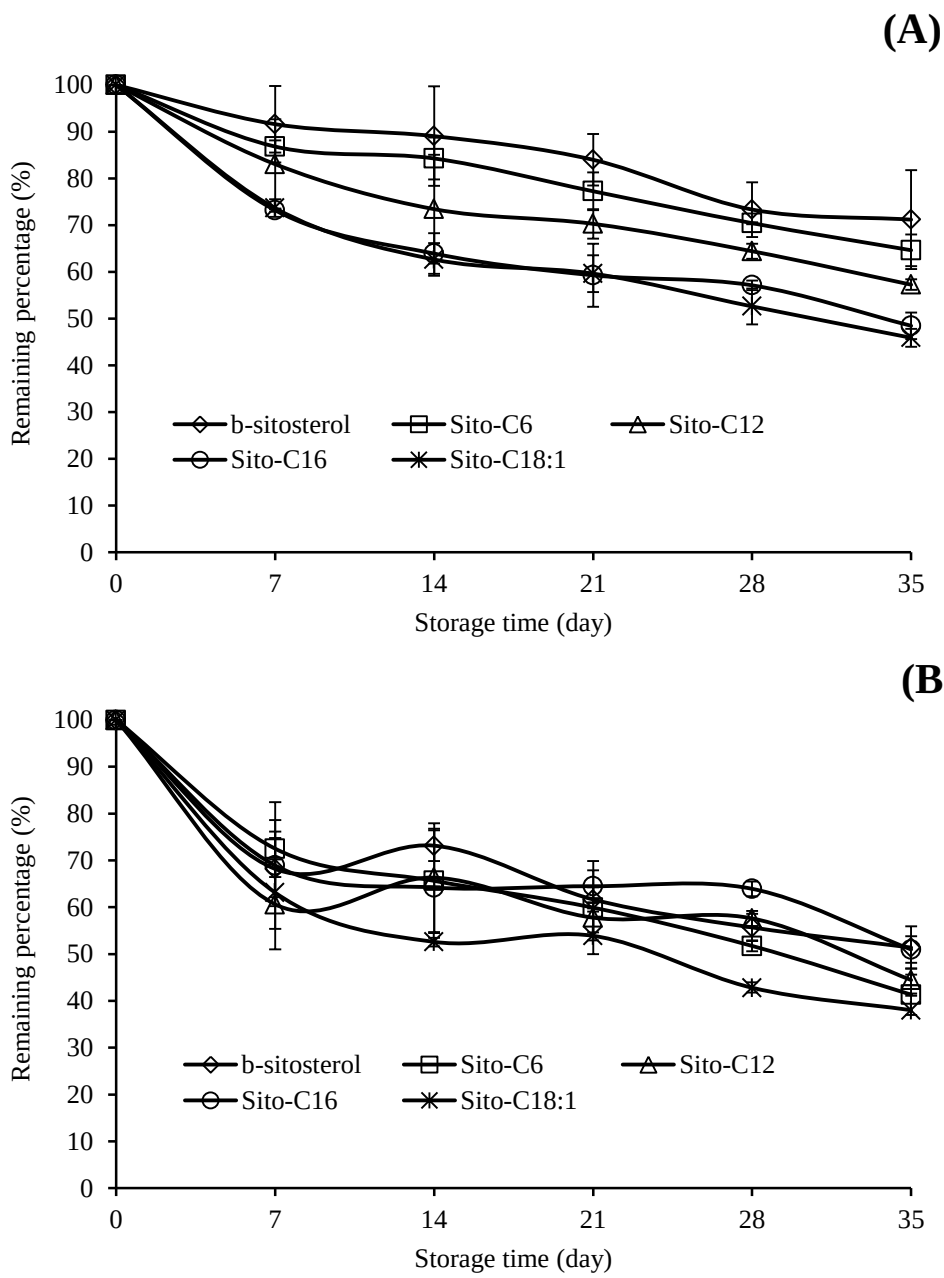


Fig. 5