PEMISAHAN SQUALENE DAN FATTY ACID STEROL ESTERS DARI SOYBEAN OIL DEODORIZER DISTILLATE

Setiyo Gunawan

Jurusan teknik kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Kampus ITS Sukolilo, Surabaya 60111.
Email: gunawan@chem-eng.its.ac.id

Yi-Hsu Ju

Department of Chemical Engineering, National Taiwan University of Science and Technology 43
Sec.4, Keelung Road, Taipei 106-07. Tel: 886-2-27376612, Fax: 886-2-27376644
E-mail: yhju@mail.ntust.edu.tw

Abstrak

Dalam proses pemurnian minyak kedelai, produk samping dari proses penghilangan bau (soybean oil deodorizer distillate, SODD) mengandung 42-52% free fatty acids (FFA) dan 18-28% triacylglycerols (TAG). Komponen bioaktif seperti tocopherols, free phytosterols, fatty acid steryl esters (FASE) dan squalene juga mempunyai kontribusi yang besar dalam komposisi SODD. Efisiensi penghilangan FFA dan TAG adalah langkah yang sangat penting dalam pemisahan dan pemurnian komponen bioaktif dari SODD. Dalam penelitian ini, modifikasi soxhlet ekstraksi telah ditemukan dan optimisasi kondisi operasi ditentukan berdasarkan efisiensi penghilangan FFA dan TAG dari SODD. Fraksi lemak non polar (nonpolar lipid fraction, NPLF) dengan kandungan FASE (22.0%, recovery 91.3%) dan squalene (8.63%, recovery 100%) telah diperoleh dengan menggunakan modifikasi soxhlet ekstraksi dengan kondisi operasi: SODD/(silica gel) = 1/3 (w/w), dan suhu ekstraksi = -6 °C. FFA dan TAG yang tersisa di NPLF secara berurutan adalah 38.7% dan 0%. Persentase penghilangan FFA and TAG di NPLF secara berurutan adalah 84.29% and 100%. Keuntungan menggunakan modifikasi soxhlet ekstraksi dibandingkan dengan silica gel column chromatography adalah sedikitnya pelarut yang digunakan, besarnya sampel per unit batch yang digunakan, dan pendeknya waktu operasi.

Kata kunci: Free fatty acid, fatty acid steryl ester, modifikasi soxhlet ekstraksi, soybean oil deodorizer distillate, squalene, triacylglycerols

Abstract

Depending on conditions in the refining process, soybean oil deodorizer distillate (SODD) contains 42-51% free fatty acids (FFA) and 16-25% triacylglycerol (TAG). Bioactive compounds such as tocopherols, free phytosterols, fatty acid steryl esters (FASE) and squalene also make up a significant portion of SODD. The efficient removal of FFA and TAG is a crucial step in the isolation and purification of bioactive compounds from SODD. In this work, a modified soxhlet extraction technique was developed and its optimal operation conditions were determined for the efficient removal of FFA and TAG from SODD. Starting with SODD that contains 3.53% FASE and 1.99% squalene, it was possible to obtain a fraction enriched with FASE (22.0%, recovery 91.3%) and squalene (8.63%, recovery 100%) by this modified soxhlet extraction under the following operation conditions: SODD/(silica gel) = 1/3 (w/w), extraction temperature = -6 °C, number of extraction/h = 8.7. FFA remained in this FASE and squalene enriched fraction is 38.7% and there was no detectable TAG. The percentage removal of FFA and TAG for this FASE and squalene enriched fraction are 84.29% and 100%, respectively. The advantages of modified soxhlet extraction over open-column chromatography are that less solvent usage, larger sample size per batch and shorter operation time.

Keywords: Fatty acid steryl ester; free fatty acid; modified soxhlet extraction; soybean oil deodorizer distillate; squalene; triacylglycerol

1. Pendahuluan

Di dalam proses pemurnian minyak nabati, komponen bioaktif seperti *squalene*, *FASE*, *tocopherols* and *phytosterols* sebagian besar ditemukan di produk samping dan aliran limbah yang meliputi sabun (*soapstock*), distilat dari proses penghilangan bau (*deodorization*) dan sebagainya (Helme, 1984; Erickson and Wiedermann, 1989; Erickson, 1995). *Soybean oil deodorizer distillate* (SODD) merupakan produk samping dari proses penghilangan bau (*deodorization*) dalam proses pemurnian minyak kedelai.

Squalene adalah senyawa hidrokarbon yang mempunyai aplikasi di dalam pembuatan kosmetik dan biosintesa kolesterol (Moreda dkk., 2001). Sedangkan *FASE* merupakan bahan baku yang penting di dalam produksi hormon dan pembuatan vitamin. *FASE* lebih efektif dalam menurunkan kadar kolesterol dibandingkan dengan *free phytosterols*.

Kandungan *FFA* and *TAG* di dalam SODD secara berurutan adalah 42-52% and 18-28%, tergantung dari kondisi proses pemurnian. Oleh karena hal tersebut, efektifitas penghilangan *FFA* and *TAG* memegang peranan yang sangat penting dalam pemurnian komponen bioaktif dari SODD.

Shimada dkk. (2000), Hirota dkk. (2003), and Watanabe dkk. (2004) menggunakan distilasi molekular (*molecular distillation*) pada suhu 250 °C dan tekanan 0,02 mmHg untuk mengisolasi *tocopherol* di dalam fraksi yang kaya akan *FFA*, *phytosterols* and *MAG*; dan *FASE* di dalam fraksi yang kaya akan *diacylglycerol* (*DAG*) and *TAG*. Dan distilasi molekular (*molecular distillation*) pada suhu 160 °C dan tekanan 7.5×10^{-4} mmHg digunakan oleh Martins dkk. (2005) untuk menghilangkan *FFA* dari SODD. Namun distilasi molekular (*molecular distillation*) mempunyai kerugian, yaitu: temperatur yang tinggi, tekanan vakum yang besar dan harga yang mahal.

Fraksi yang kaya akan *free phytosterols* dan *FASE* telah berhasil diisolasi dengan menggunakan *silica gel column chromatography* atau *thin-layer chromatography* (Worthington and Hitchcock, 1984; Christie, 1987). Namun pemisahan dengan menggunakan *silica gel column chromatography* membutuhkan waktu yang sangat lama dan sangat membosankan (Snyder and Kirkland, 1979).

Modifikasi *soxhlet* ekstraksi telah diterapkan dalam penelitian ini untuk memisahkan SODD menjadi dua fraksi berdasarkan perbedaan polaritas dari komponen

di dalamnya. Fraksi pertama adalah fraksi yang kaya akan *FASE* dan *squalene*, sedangkan fraksi lainnya kaya akan *tocopherols* dan *free phytosterols*, *FFA* dan *acylglycerols*. Berbagai faktor seperti perbandingan massa SODD/*(silica gel)*, waktu, temperatur, jumlah pelarut dan polaritas pelarut telah dipelajari secara sistematis.

2. Fundamental

Proses adsorpsi adalah proses dengan penggunaan energi yang sangat efisien, dan sesuai untuk isolasi komponen-komponen dengan titik didih yang hampir sama (Ruthven, 1984). Aplikasi penggunaan proses adsorpsi adalah penghilangan *FFA* dan produk proses oksidasi dari berbagai macam minyak nabati (Proctor and Palaniappan, 1990; Toro-Vazquez and Rocha-Urbe, 1993; Toro-Vazquez and Mendes-Montealvo, 1995).

Liquid-solid (adsorption) chromatography (LSC) adalah metode pemisahan yang sangat sederhana atau tradisional. Urutan polaritas berdasarkan gugus fungsi dalam LSC adalah hidrokarbon jenuh < hidrokarbon aromatis ≈ organik halida < sulfida < ether < nitro-komponen < ester ≈ aldehida ≈ keton < alkohol ≈ amina < sulfone < sulfoxida < amida < asam karboksilat.

Ada empat macam interaksi antara molekul pelarut dan molekul terlarut yang sangat penting dalam LSC, yaitu: dispersi, dipol, ikatan hidrogen and dielektrik (Snyder and Kirkland 1979). Kemampuan molekul terlarut atau pelarut untuk berinteraksi dalam empat macam interaksi diatas disebut "polaritas". Pelarut yang polar lebih mudah berinteraksi dan melarutkan zat terlarut yang polar dan sebaliknya.

3. Metodologi

SODD disumbang oleh *TTET Union Corporation* (Tainan, Taiwan). *Thin-layer chromatography* (TLC) *aluminum plate* (20 x 20 cm x 250 µm) dibeli dari *Machery-Nagel* (Schweiz, Germany). *Silica gel* 70-230 mesh diperoleh dari *Silicycle* (Taiwan). Karakteristik dari *silica gel* adalah sebagai berikut: ukuran partikel 60-200 µm, pori-pori 60 Å, pH 7, kandungan air 6%, dan luas permukaan spesifik 500 m²/g. *Advantec filter paper* (7 µm) dibeli dari *Toyo Roshi Kaisha, Ltd.* (Jepang). Komponen standar, meliputi *squalene*, *fatty acids*, *α-tocopherol*, *triolein*, dan *tripalmitic* diperoleh dari *Sigma Chemicals Company* (St. Louis, MO). *β-sitosterol* standar (*practical*

grade) diperoleh dari MP Biomedicals, LLC (Aurora, OH). Semua pelarut dan reagen dibeli dari agen komersial.

Partikel-partikel asing telah disaring dari SODD dengan menggunakan *Advantec filter paper* (7 μ m). *Silica gel* dikeringkan di dalam oven pada suhu 150 °C selama 1 jam untuk menghilangkan kandungan airnya. Modifikasi *soxhlet* ekstraksi telah diterapkan dalam penelitian ini. SODD (10-20 g) dilarutkan dengan 150 mL heksana di dalam sebuah 500 mL *round-bottom flask* pada suhu kamar. *Silica gel* (60 g) ditambahkan dalam larutan tersebut. Campuran *silica gel* dan larutan diaduk pada kecepatan 300 rpm selama 1 jam.

SODD telah teradsorpsi sempurna dalam *silica gel* dengan cara menguapkan heksana pada suhu 60 °C dan kemudian dimasukkan ke dalam sebuah *thimble* ekstraksi (9.4 cm x 3.3 cm, panjang x diameter), bagian atas *thimble* ditutup dengan kapas dan selanjutnya dimasukkan ke dalam sebuah *soxhlet* ekstraktor (245 mL). Fraksi non-polar diekstrak dengan menggunakan heksana (350 mL) pada suhu -6 sampai 65 °C, kemudian dikumpulkan dan dihilangkan pelarutnya. *Squalene* dan FASE sangat mudah terekstrak dalam fase heksana, dan dinamakan fraksi lemak non-polar (non-polar lipid fraction, NPLF). Fraksi yang masih tersisa di *silica gel*, selanjutnya diekstrak dengan pelarut *ethyl acetate* selama 3 jam pada suhu 71 °C, dan dinamakan fraksi lemak polar (polar lipid fraction, PLF). Kemurnian dari masing-masing fraksi dianalisa dengan menggunakan *high temperature-gas chromatography* (HT-GC) dan TLC plate (6 x 2 cm, 250 μ m). Heksana digunakan sebagai fase bergerak (*mobile phase*). Setelah kering, bintik-bintik komponen di tiap *plate* direaksikan dengan uap iodin agar bisa terlihat dengan mata biasa.

Kandungan *squalene*, FFA, *phytosterols*, *tocopherols* dan *acylglycerols* dianalisa dengan menggunakan HT-GC. Analisa kromatografi dilakukan dengan menggunakan TLC plate dan Shimadzu GC-17A (Kyoto, Japan) *gas chromatography* yang dilengkapi dengan *flame ionization detector* (FID). Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom nonpolar DB-5HT (5%-phenyl)-methylpolysiloxane (15 m x 0.32 mm, panjang x diameter; Agilent Tech. Palo Alto, California). Suhu pada injektor dan detektor adalah 370 °C. Suhu kolom di program dari 80 °C meningkat sampai 365 °C dengan kecepatan 15 oC/min dan dijaga konstan pada suhu 365 °C selama 8 min, dengan gas nitrogen sebagai gas pembawa. Empat puluh mg sampel dilarutkan dalam 1 mL *ethyl acetate* dan 1 μ L sampel diinjeksikan ke HT-GC.

4. Hasil dan Analisis

SODD yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai warna kecoklatan dan setengah-padat pada suhu kamar. Sedangkan komposisi dari SODD dapat dilihat di Tabel 1.

Tabel 1 Komposisi *Soybean oil deodorizer distillate* (SODD)

Komponen	Komposisi (%w) ^a	
FFA	46.46	± 4.33
TAG	20.30	± 4.54
DAG	4.85	± 1.21
<i>Squalene</i>	1.87	± 0.08
FASE	4.25	± 0.74
<i>Tocopherols</i>	6.33	± 0.96
<i>Free phytosterols</i>	5.56	± 0.22
Lain-lain ^b	15.23	± 0.16

^a Masing-masing nilai adalah rata-rata dari tiga eksperimen yang berbeda.

^b Hidrokarbon, aldehida, keton, pestisida, herbisida, produk proses oksidasi dari *tocopherols* dan *free phytosterols*.

Gambar 1. Skema metodologi pemisahan NPLF dan PLF dari SODD

Gambar 1 menunjukkan skema metodologi pemisahan NPLF dan PLF dari SODD. Penyimpanan SODD yang telah teradsorpsi di *silica gel* pada suhu rendah sebelum proses ekstraksi dan pengulangan modifikasi *soxhlet* ekstraksi menghasilkan *recovery* FASE yang sangat rendah (data tidak ditampilkan). Sedangkan skema peralatan *soxhlet* ekstraktor dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil analisa TLC plate dan HT-GC menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat (PLF) tidak terdapat komponen *squalene*.

Gambar 2. Skema peralatan
soxhlet ekstraktor

Semakin rendah suhu ekstraksi, maka semakin menguntungkan karena selama proses akan membutuhkan sedikit energi dan meminimalkan proses degradasi komponen bioaktif di dalam SODD. Pengaruh suhu ekstraksi terhadap waktu ekstraksi untuk mendapatkan *squalene* dengan *recovery* 100% di dalam NPLF dapat dilihat pada Tabel 2. Suhu terendah dalam penelitian ini adalah -6°C , dibatasi dengan kapasitas maksimal dari pendingin di laboratorium. Suhu tertinggi adalah 65°C dibatasi dengan titik didih dari heksana (68°C). Waktu ekstraksi yang diperlukan untuk mendapatkan *squalene* dengan *recovery* 100% di NPLF meningkat dari 2 jam hingga 9 jam dengan menurunnya suhu ekstraksi dari 65°C ke -6°C .

Tabel 2 menunjukkan bahwa perbandingan massa NPLF/SODD yang diperoleh meningkat dengan meningkatnya suhu ekstraksi. Pengoperasian *soxhlet* ekstraksi pada suhu tinggi menghasilkan pendeknya waktu ekstraksi, tingginya perbandingan massa NPLF/SODD namun menghasilkan rendahnya penghilangan FFA, TAG, *tocopherols* dan *phytosterols* dari NPLF.

Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kapasitas adsorpsi tertinggi dari *silica gel* biasanya tercapai pada suhu rendah (Rutven, 1984). Suhu rendah mengakibatkan semakin besarnya vitamin E terserap oleh *silica gel* pada saat kesetimbangan, dan prosesnya adalah eksotermis (Chu *et al.*, 2004). Penyerapan FFA dalam *silica gel* telah dilaporkan dan urutan kekuatan penyerapan adalah: asam karboksilat > ester > alkohol (Hau and Nawar, 1985).

Secara praktek, semakin besar perbandingan massa SODD/(*silica gel*) maka semakin menguntungkan karena selama proses ekstraksi akan membutuhkan sedikit energi, sedikit pelarut dan waktu ekstraksi yang pendek. Perbandingan massa SODD/(*silica gel*) lebih besar dari 1/3 tidak memberikan hasil yang baik dalam proses adsorpsi ke *silica gel*, sehingga perbandingan massa SODD/(*silica gel*) tidak lebih dari 1/3 digunakan dalam penelitian ini.

Squalene merupakan hidrokarbon dan dipilih sebagai indikator dalam efektifitas pemisahan fraksi lemak polar dan fraksi lemak non polar. Hubungan antara waktu ekstraksi untuk memperoleh *squalene* dengan *recovery* 100% di dalam NPLF dan perbandingan massa SODD/(*silica gel*) dapat dilihat pada Tabel 3. Waktu ekstraksi menurun dengan semakin besarnya rasio berat SODD/(*silica gel*).

Hal ini terjadi karena dengan semakin besarnya perbandingan massa SODD/(*silica gel*), menyebabkan semakin besarnya *squalene* yang berdifusi ke pori-pori *silica gel* dan akhirnya semakin besar *squalene* yang teradsorb pada permukaan pori-pori *silica gel*, sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk mengekstrak *squalene* dari *silica gel*.

Seperti yang terlihat di Tabel 3, semakin kecil perbandingan massa SODD/(*silica gel*) maka semakin besar penghilangan FFA, TAG, *tocopherols*, dan *free phytosterols* dari NPLF. Perbandingan massa NPLF/SODD yang diperoleh semakin menurun sebagai akibat menurunnya perbandingan massa SODD/(*silica gel*).

Jika ingin mengisolasi *squalene* dan FASE secara bersamaan, maka semakin besar perbandingan massa SODD/(*silica gel*) sangat menjanjikan dengan semakin besarnya *recovery*.

Tabel 2 Pengaruh suhu ekstraksi terhadap karakteristik dari NPLF, dengan isolasi *squalene* 100% recovery. Perbandingan massa SODD/(silica gel) = 1/3 (w/w)a.

Komponen	Suhu ekstraksi (°C)		
	65	55	-6
<i>Squalene</i> , %	4,03 / 100,00 ^b	5,16 / 100,00	8,63 / 100,00
FASE, %	2,46 / 97,60	3,12 / 96,58	22,01 / 91,3
Penghilangan FFA, %	58,50	63,72	84,29
Penghilangan TAG, %	56,60	76,51	100,00
Penghilangan <i>Tocopherols</i> , %	51,20	70,29	78,79
Penghilangan <i>free Phytosterol</i> , %	79,91	92,02	100,00
NPLF/SODD, %	47,28	34,76	21,76
Waktu ekstraksi, jam	2	2	9

^a Masing-masing nilai adalah rata-rata dari tiga eksperimen yang berbeda dengan relatif standar deviasi kurang dari 5%.

^b Kandungan / Recovery

Tabel 3 Pengaruh perbandingan massa SODD/(silica gel) terhadap karakteristik dari NPLF, dengan isolasi *squalene* 100% recovery. Suhu ekstraksi = 65 °C.

Komponen	Perbandingan massa SODD/(silica gel)		
	1/3	1/4	1/6
<i>Squalene</i> , %	4,03 / 100,00 ^b	6,63 / 100,00	9,76 / 100,00
FASE, %	2,46 / 97,56	3,52 / 84,76	4,53 / 74,05
Penghilangan FFA, %	58,53	78,30	88,48
Penghilangan TAG, %	56,58	88,13	97,85
Penghilangan <i>Tocopherols</i> , %	51,20	57,90	71,24
Penghilangan <i>free Phytosterol</i> , %	79,88	82,82	87,28
NPLF/SODD, %	47,28	33,87	21,45
Waktu ekstraksi, jam	2	2	4

^a Masing-masing nilai adalah rata-rata dari tiga eksperimen yang berbeda dengan relatif standar deviasi kurang dari 5%.

^b Kandungan / Recovery

FASE di dalam NPLF terlihat di Tabel 3. Namun penghilangan FFA dan TAG menurun secara berurutan dari 88.5% ke 58.5% and 97.9% ke 56.9%, sementara *recovery* dari FASE meningkat dari 74.1% ke 97.6%.

Komponen nonpolar seperti *squalene* dan FASE sangat lemah teradsorb di *silica gel* sehingga cenderung terlarut dalam heksana saat proses ekstraksi. Sedangkan komponen yang lebih polar seperti FFA, TAG, *tocopherols*, dan *phytosterols* sangat kuat teradsorb dalam *silica gel*. Semakin kecil perbandingan massa SODD/(*silica gel*) menyebabkan semakin besarnya luas permukaan *silica gel* per berat

SODD, dan akhirnya memberikan waktu ekstraksi yang lebih lama, rendahnya *recovery* FASE di dalam NPLF dan sedikitnya berat NPLF yang diperoleh.

Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan semakin besar luas permukaan adsorban maka memberikan transfer massa yang rendah (Snyder and Kirkland, 1979). Jumlah massa FFA yang terserap per unit luas *silica gel* meningkat dengan meningkatnya luas permukaan (Hau and Nawar, 1985), sekali lagi konsisten dengan hasil yang terlihat di Tabel 2.

5. Kesimpulan

Dengan modifikasi *soxhlet* ekstraksi pada suhu -6°C dan perbandingan massa SODD/*(silica gel)* 1/3, SODD telah terpisah menjadi dua fraksi, yaitu: NPLF yang kaya akan *squalene* (8.63%, *recovery* 100%) dan FASE (22.0%, *recovery* 91.3%), dan PLF dimana yang kaya akan kandungan FFA, TAG, *tocopherols*, dan *phytosterols*.

FFA dan TAG yang tersisa di NPLF secara berurutan adalah 38.7% dan 0%. Persentase penghilangan FFA and TAG di NPLF secara berurutan adalah 84.29% and 100%.

Keuntungan menggunakan modifikasi *soxhlet* ekstraksi dibandingkan dengan *silica gel column chromatography* adalah sedikitnya pelarut yang digunakan, besarnya sampel per unit batch yang gunakan, dan pendeknya waktu operasi.

Ucapan Terimakasih

Kami ucapkan terima kasih kepada *TTET Union Corporation*, Taiwan atas sumbangan SODD dan semua pihak sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Daftar Pustaka

- [1] Christie W.W., (1987), "*High-performance Liquid Chromatography and Lipids*," Pergamon Press, Oxford: 82.
- [2] Chu, B.S., Baharin, B.S., Che Man, Y.B., and Quek, S.Y., (2004), "Separation of Vitamin E from Palm Fatty Acid Distillate Using Silica: Equilibrium of Batch Adsorption," *Journal Food Eng.* 62: 97-103.
- [3] Erickson D.R., and Wiedermann, L.H., (1989), "Modern Processing and Utilization, American Soybean Association," www.asa-europe.org/pdf/sboprocess.pdf, (Accessed May 30, 2005).
- [4] Erickson D.R., (1995), "*Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*," -American Oil Chemist Society Press, Champaign, IL., USA.
- [5] Hau, L.B. and Nawar, W.W., (1985), "Thermal Oxidation of Lipids in Monolayers: The nature of Binding on Silica," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62: 1596.
- [6] Helme, J.P., (1984), Consultant-Paris, Soybean Oil Refining, www.asa-europe.org/pdf/oilref.pdf, (Accessed May 30, 2005).
- [7] Hirota, Y., Nagao, T., Watanabe, Y., Suenaga, M., Nakai, S., Kitano, M., Sugihara, A., and Shimada, Y., (2003), "Purification of Steryl Esters from Soybean Oil Deodorizer Distillate," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 341-346.
- [8] Martins P.F., Ito, V.M., Batistella, C.B., and Maciel, M.R.W., (2005), "Free Fatty Acid Separation From Vegetable Oil Deodorizer Distillate Using Molecular Distillation Process," *Separation and Purification Technology*, 48: 78-84.
- [9] Moreda, W., Perez-Camino, M.C., and Cert, A., (2001), "Gas and Liquid Chromatography of Hydrocarbons in Edible Vegetable Oils," *J. Chromatogr. A* 936: 159-171.
- [10] Proctor, A. and Palaniapan, S., (1990), "Adsorption of Soy Oil Free Fatty Acid by Rice Hull Ash," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67: 15-17.
- [11] Ruthven, D.M., (1984), "*Principles of Adsorption and Adsorption Process*," John Wiley and Sons Inc., New York.
- [12] Shimada, Y., Nakai, S., Suenaga, M., Sugihara, A., Kitano, M., and Tominaga, Y., (2000), "Facile Purification of Tocopherols from Soybean Oil Deodorizer Distillate in High Yield Using Lipase," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1009-1013.
- [13] Snyder, L.R. and Kirkland, J.J., (1979), "*Introduction to Modern Liquid Chromatography*," 2nd edition, John Wiley and Sons Inc., New York: 323-342.
- [14] Toro-Vazquez, J.F. and Rocha-Urbe, A., (1993), "Adsorption Isotherms of Sesame Oil in a Concentrated Miscella System," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 589-594.
- [15] Toro-Vazquez, J.F. and Mendes-Montealvo, G., (1995), "Competitive Adsorption Among Sesame Oil Components in a Concentrated Miscella System," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 675-679.
- [16] Watanabe, Y., Hirota, Y., Nagao, T., Kitano, M., and Shimada, Y., (2004), "Purification of Tocopherols and Phytosterols by Two-Step in situ Enzymatic Reaction," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 339-345.
- [17] Worthington, R.E. and Hitchcock, H.L., (1984), "A Method for the Separation of Seed Oil Steryl Esters and Free Sterols: Application to Peanut and Corn Oil," *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1085.