

KAROL MIŃKOWSKI, MONIKA BARTOSIAK, DARIUSZ CIEMIŃSKI

WPLYW BARWNIKÓW CHLOROFILOWYCH NA PRZEBIEG UTLENIANIA FOTOSENSYBILIZOWANEGO OLEJU RZEPAKOWEGO

Streszczenie

Obecność barwników chlorofilowych w olejach ma negatywny wpływ na ich smak, zapach, barwę, przejrzystość, stabilność termiczną i okres trwałości. Związki te są silnymi fotosensybilizatorami procesów utleniania nienasyconych wiązań lipidów, co niekorzystnie wpływa na stabilność oksydacyjną oleju w trakcie przechowywania.

Celem pracy była ocena aktywności fotooksydacyjnej barwników chlorofilowych w oleju rzepakowym pod wpływem promieniowania UV-A. Materiałem do badań był rafinowany olej rzepakowy oraz jego triacyloglicerole (TAG). Jako fotosensybilizatory stosowano chlorofil a oraz feofitynę a. Kontrolę procesu fotooksydacji prowadzono poprzez oznaczanie zawartości tlenu singletowego, związków lotnych oraz barwników chlorofilowych. Wykazano, że barwniki chlorofilowe są fotosensybilizatorami fotoutleniania oleju rzepakowego oraz TAG podczas ich ekspozycji na promieniowanie UV-A. Chlorofil a i feofityna a biorą udział w procesie generowania tlenu singletowego. Efektywność fotosensybilizująca chlorofilu a jest wyższa niż feofityny a. Barwniki chlorofilowe mają zróżnicowany wpływ na zawartość i profil substancji lotnych powstających podczas fotoutleniania oleju oraz TAG. Rodzaj fotosensybilizatora ma istotny wpływ na zawartość substancji lotnych ogółem oraz heksanal w TAG. Maksymalna zawartość substancji lotnych występuje przy dawce fotosensybilizatora na poziomie 0,5 mg/kg. Barwniki chlorofilowe ulegają degradacji w wyniku utleniania tlenem singletowym podczas fotooksydacji oleju rzepakowego i TAG. Feofityna a trudniej ulega degradacji niż chlorofil a. Substancje towarzyszące odgrywają ważną rolę ochronną przed fotoutlenianiem oleju rzepakowego. Ich usunięcie przyczynia się do większego pobrania tlenu singletowego, przyrostu zawartości substancji lotnych ogółem, zmian ich profilu oraz zwiększonej degradacji barwników chlorofilowych. Barwniki chlorofilowe wywierają niekorzystny wpływ na stabilność oksydacyjną oleju rzepakowego podczas jego ekspozycji na promieniowanie UV-A i powinny być z niego usunięte.

Słowa kluczowe: olej rzepakowy, utlenianie fotosensybilizowane, barwniki chlorofilowe, tlen singletowy, związki lotne

Dr hab. inż. K. Mińkowski, prof. IBPRS, mgr M. Bartosiak, mgr inż. D. Ciemiński, Zakład Technologii Mięsa i Tłuszczu, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Jubilerska 4, 04-190 Warszawa. Kontakt; karol.minkowski@ibprs.pl

Wprowadzenie

Konsumenci oczekują, że spożywcze oleje roślinne będą się charakteryzowały takimi cechami, jak: łagodny smak, pożądany zapach, przejrzystość, wysoka stabilność termiczna i długi okres trwałości [15]. Obecność barwników chlorofilowych w olejach ma negatywny wpływ na wszystkie te cechy, zwłaszcza na ich stabilność oksydacyjną. Przemiany nienasyconych lipidów spowodowane utlenianiem tlenem atmosferycznym są główną przyczyną niepożądanych zmian wielu artykułów spożywczych, zwłaszcza produktów tłuszczowych. Podczas utleniania lipidów wyróżnia się dwa procesy: utlenianie fotosensybilizowane oraz autooksydację, przebiegające według dwóch różnych mechanizmów [4]. Istnieje przypuszczenie, że autooksydacja naturalnych tłuszczów może być zainicjowana przez fotoutlenianie wskutek obecności w nich naturalnych barwników.

Fotosensybilizowane utlenianie jest procesem prowadzącym do powstania wodoronadtlenków z nienasyconych kwasów tłuszczowych lub ich estrów w obecności tlenu, energii świetlnej i fotosensybilizatora. W wyniku absorpcji kwantu światła fotosensybilizator przechodzi w stan wzbudzony, a następnie przekazuje energię do tlenu trypletowego ($^3\text{O}_2$). W rezultacie powstaje bardzo reaktywny tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) [20]. Tlen singletowy przyłącza się do jednego z węgli przy wiązaniu podwójnym, prowadząc do powstania wodoronadtlenków o konfiguracji trans. Powstałe wskutek fotosensybilizowanego utleniania wodoronadtlenki rozpadają się tworząc rodniki, które mogą zapoczątkować rodnikową reakcję autooksydacji. W wyniku rozpadu wodoronadtlenków z długołańcuchowych kwasów tłuszczowych powstaje szereg krótkołańcuchowych produktów wtórnych, takich jak: węglowodory, aldehydy, ketony, estry, laktony, alkohole i etery. Wszystkie mogą występować jako związki nasycone i nienasycone [7]. Aldehydy krótkołańcuchowe oraz powstające z nich wskutek utlenienia kwasy w dużym stopniu wpływają na charakterystyczny zapach zjełczałego tłuszczu.

W tłuszczach i produktach spożywczych zawierających tłuszcze występuje wiele substancji mogących pełnić rolę fotosensybilizatorów. Są to między innymi barwniki chlorofilowe [19]. Cząsteczki chlorofili mają szkieletową strukturę porfirynową z centralnie ulokowanym jodem magnezu oraz długi boczny łańcuch fitolowy. Oprócz chlorofilu a i b występują ich pochodne, różniące się pomiędzy sobą tym, że mają centralnie ulokowany jon magnezu lub kationy wodorowe i różne grupy podstawników. W strukturze cząsteczek chlorofili występuje sekwencyjny układ wiązań pojedynczych i podwójnych, czyli wiązań sprzężonych, dzięki czemu mają one zdolność do absorpcji promieniowania świetlnego [32]. Chlorofile i ich pochodne są silnymi prooksydantami, kiedy występuje ekspozycja oleju na światło [4]. Są one niepożądane w oleju rzepakowym. Barwniki chlorofilowe katalizujące przejście tlenu trypletowego w stan singletowy same ulegają utlenieniu z uwagi na obecność wiązań nienasyconych [17]. Foto-

degradacja chlorofilu w pierścieniu porfirynowym zachodzi 3 - 4 razy szybciej niż w łańcuchu fitolowym. Produkty utlenienia chlorofili są bezbarwne [5]. W oleju rzepakowym występują chlorofil a i chlorofil b, jak również ich pochodne, tj. feofityna a, feofityna b, pirofeofityna a, pirofeofityna b, feoforbid a, feoforbid b, rzadko także metylofeoforbid a [31]. Podczas wydobywania tłuszczu z nasion chlorofile przechodzą do oleju w ilości i składzie zależnym od stopnia dojrzałości, technologii wydobywania i jego rafinacji. [22].

Utlenianie fotosensybilizowane oleju rzepakowego może następować już w momencie jego wydobywania, a następnie rafinacji, przejściowego magazynowania, rozlewu do opakowań jednostkowych i składowania. Rodzaj opakowania jednostkowego (tworzywa, szkło jasne lub ciemne) ma znaczący wpływ na dostęp światła do oleju i jego oksydację [9]. Dotyczy to także olejów tłoczonych na zimno, w których występuje szereg barwników chlorofilowych. Proces utleniania fotosensybilizowanego jest hamowany przez neutralizatory tlenu singletowego (barwniki karotenoidowe, tokoferole, związki fenolowe) obecne w oleju jako substancje towarzyszące [2, 7].

Przebieg procesu można śledzić poprzez pomiar ubytku tlenu trypletowego ze środowiska reakcji, detekcję tlenu singletowego powstającego z tlenu trypletowego, pomiar ubytku barwników chlorofilowych oraz analizę związków lotnych powstających w wyniku utleniania substratu.

Celem pracy była ocena aktywności fotooksydacyjnej barwników chlorofilowych w oleju rzepakowym pod wpływem promieniowania UV-A.

Materiał i metody badań

Materiałem doświadczalnym był rafinowany olej rzepakowy pochodzący z jednego z zakładów tłuszczowych. Olej pobierano z działu rafinerii bezpośrednio po jego odwonieniu i schłodzeniu. Badania prowadzono w Zakładzie Technologii Mięsa i Tłuszczu IBPRS w Warszawie. Stanowisko do naświetlań przygotowano we własnym zakresie.

Proces fotooksydacji materiału doświadczalnego obserwowano na podstawie oznaczania zawartości tlenu singletowego, związków lotnych oraz barwników chlorofilowych. Analizy z zastosowaniem techniki EPR wykonywano na Wydziale Farmaceutycznym WUM w Warszawie.

Badaniom poddano także triacyloglicerole (TAG) wydzielane bezpośrednio przed badaniami z oleju rafinowanego. TAG izolowano z oleju metodą chromatografii kolumnowej [8]. Olej oraz TAG w trakcie badań przechowywano w temp. 20 ± 2 °C, bez dostępu światła. W materiale doświadczalnym oznaczano liczbę nadtlenkową według PN-EN ISO 3960:2017-03 [24], liczbę anizydynową według PN-EN ISO 6885:2016-04 [25], liczbę kwasową według PN-EN ISO 660:2021-03 [26], zawartość tokoferoli

według PN-EN 12822:2014-08 [27], zawartość żelaza według PN-A-86939-2:1998 [28] oraz zawartość miedzi według PN-A-86939-3:1998 [29].

Próbki poddawano ekspozycji na promieniowanie UV-A o długości fali $\lambda = 320 - 380$ nm. Zestaw do naświetlań składał się z 4 lamp Philips typ TL-4 ACTINIC BL-40W/10R G13 o mocy 8,7 W zamontowanych na jednym stelażu. Lamy ustawiono parami w dwóch płaszczyznach, a linię do naświetlań ulokowano centralnie. Przy długości linii do naświetlań wynoszącej 60 cm jednorazowo możliwe było naświetlenie 9 próbek. Natężenie promieniowania UV-A wynosiło średnio $1,88 \text{ mW/cm}^2$. Próbki oleju lub TAG rozlewano po 9 ml do szalek Petriego o średnicy 5,5 cm, przykrywano wieczkiem, po czym prowadzono naświetlanie. Chlorofil do próbek wprowadzano w postaci roztworu di-eterowego (1 mg barwnika rozpuszczano w 10 ml eteru dietylowego). Stosowano podwójną próbę zerową, olej lub TAG, bez naświetlania oraz po naświetlaniu w zróżnicowanym czasie.

Zawartość tlenu singletowego oznaczano techniką EPR przy użyciu spektrometru EPR typu benchtop MiniScope MS200 (Magnettech GmbH, Berlin, Niemcy). Próbki do pomiaru pobierano bezpośrednio z fiolek z ciemnego szkła o pojemności 2 cm^3 , zamykanych nakrętką z przekładką teflonową, do szklanych kapilar hematokrytowych o pojemności $50 \mu\text{l}$. Stosowano następujące parametry pomiaru: indukcja magnetyczna w centrum zakresu przemiatania 334 mT, szerokość zakresu przemiatania 8 mT, moc mikrofalowa 8 mW, czas przemiatania 20 s, amplituda modulacji 0,08 mT. Każdą próbkę poddawano trzykrotnemu pomiarowi. Między powtórzeniami próbki przechowywano w temp. $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bez dostępu światła. W tych warunkach intensywność sygnału nie ulegała zmianie w ciągu 3 h. Stężenie tlenu singletowego określano na podstawie stężenia rodnika TEMPO (2,2,6,6 tetrametylopiperydyn-1-oksyl) powstającego w reakcji sondy TEMP (2,2,6,6 tetrametylopiperydyna) z tlenem singletowym w stosunku 1 : 1. Stężenie rodnika TEMPO określano na podstawie porównania intensywności widma EPR próbki z krzywą wzorcową, przygotowaną na podstawie widm EPR wodnych roztworów rodnika TEMPO w zakresie stężeń $1 \div 100 \mu\text{mol/dcm}^3$. Intensywność sygnału obliczano z krzywych wzorcowych.

Zawartość związków lotnych oznaczano metodą HS-SPME_{GC/FID}. Sorpcję związków lotnych wykonywano techniką HS-SPME. W tym celu 20 ml oleju umieszczano w 40-mililitrowej viali zamykanej nakrętką z przekładką teflonową. Próbkę termostatowano w temp. $50 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 15 min, po czym wprowadzano do fazy nadpowierzchniowej włókno z fazą typu CAR/PDMS (carboxen/polidimetylosiloksan) StableFlex (Supelco, Bellefonte, USA) i termostatowano przez dalsze 15 min w temp. $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Związki z włókna natychmiast desorbowano w komorze nastrzykowej chromatografu gazowego przez 2 min w temp. $260 \text{ }^\circ\text{C}$. Analizę i identyfikację lotnych produktów oksydacji desorbowanych z włókna SPME prowadzono metodą GC/FID z wykorzystaniem chromatografu HP 6890 II z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym [16].

Jako substancje wzorcowe stosowano krótkołańcuchowe alkohole i aldehydy, nasycone i nienasycone: 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol, hexanal, heptanal, nonanal, trans-2-pentenal, trans-2-heptenal, trans-2-octenal, trans-2-nonenal, trans-2-decenal, trans-trans-2,4-decadienal (Sigma Aldrich, Poznań, Polska). Podstawą oznaczeń ilościowych były krzywe wzorcowe wyznaczane dla poszczególnych związków.

Zawartość barwników chlorofilowych oznaczano zmodyfikowaną metodą według PN-EN ISO 29841:2014-06 [6]. Próbkę o masie 2 g odważano do probówek szklanych z podziałką do 10 ml, dopełniano acetonem do objętości 10 ml, wytrząsano przy użyciu urządzenia typu vortex przez 1 min i poddawano analizie. Analizy prowadzono z wykorzystaniem zestawu do HPLC wyposażonego w detektor fluorescencyjny (Agilent Technologies Series 1100, Santa Clara, USA) [11]. Krzywe kalibracyjne przygotowywano z roztworów standardowych, a zawartość chlorofilu a i feofityny a obliczano z krzywych wzorcowych wyznaczonych eksperymentalnie dla badanego zakresu stężeń. Chlorofil a zakupiono w Sigma Aldrich (Poznań, Polska), natomiast feofitynę a preparowano z chlorofilu a przez wykwaszanie roztworów eterowych 13-procentowym HCl. Stosowano rozpuszczalniki o czystości HPLC. Metanol i aceton zakupiono w Avantor (Gliwice, Polska), a eter dietylowy w Sigma Aldrich (Poznań, Polska). Wodę dejonizowaną przygotowywano, stosując Milli-Q purification system Millipore (Bedford, USA). Inne odczynniki o czystości analitycznej, kwas chlorowodorowy (purity $\geq 37\%$) i siarczan sodowy bezwodny (purity $\geq 99,0\%$) pochodziły z Avantor (Gliwice, Polska).

Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji, a istotność różnic między średnimi zawartościami związków lotnych weryfikowano testem Tukeya ($p \leq 0,05$). Obliczenia wykonano w programie TIBCO Software Inc. (2017) Statistica v. 13.

Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono wyniki badań materiału doświadczalnego – rafinowanego oleju rzepakowego oraz triacylogliceroli (TAG). Olej charakteryzował się bardzo dobrymi parametrami jakościowymi pod względem obecności pierwotnych i wtórnych produktów oksydacji. Zawartość chlorofilu oraz żelaza i miedzi, substancji o prooksydacyjnej aktywności, była poniżej progu wykrywalności zastosowanych metod analitycznych. Zawartość tokoferoli, substancji o działaniu przeciwutleniającym, była zbliżona do danych opublikowanych przez Gliszczyńską-Świątło i wsp. [10]. TAG otrzymane po usunięciu substancji towarzyszących z oleju wykazywały zerowe wartości liczb charakterystycznych oraz zawierały minimalne ilości tokoferoli.

Tabela 1. Charakterystyka oleju rzepakowego oraz triacylogliceroli

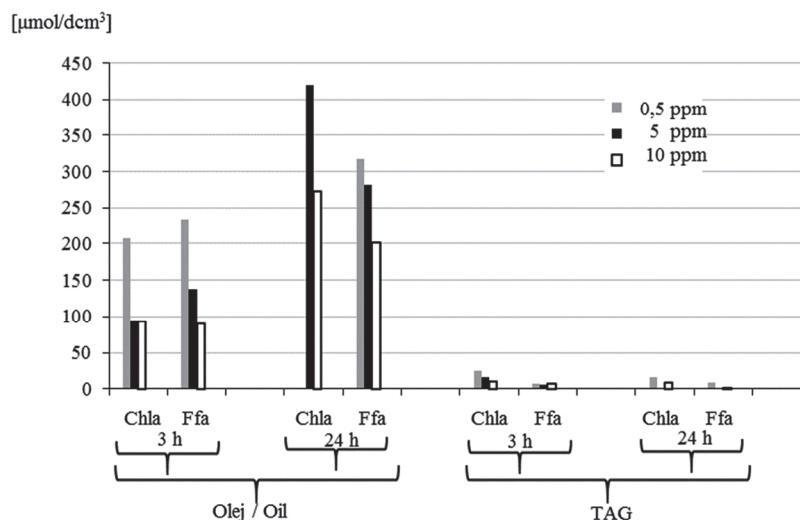
Table 1. Characteristics of rapeseed oil and TAG

Cecha / Feature	Olej / Oil	Triacyloglicerole / TAG
Liczba kwasowa / Acid value [mg KOH/1g]	0,16 ± 0,01	0,00
Liczba nadtlenkowa / Peroxide value [meqv. O ₂ /kg]	0,15 ± 0,01	0,00
Liczba anizydynowa / Anisidine value	0,0	0,0
Całkowita zawartość chlorofili Total content of chlorophylls [mg/kg]	< 0,005	< 0,005
Zawartość metali / Content of metals [mg/kg]		
– Fe	< 0,10	< 0,04
– Cu	< 0,02	< 0,02
Zawartość tokoferoli Content of tocopherols [mg/kg]		
– α	191,4 ± 6,7	0,8 ± 0,0
– γ	358,6 ± 13,5	3,1 ± 0,1
– δ	19,9 ± 0,7	0,0

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; n = 6 (3 × 2).

Na rys. 1. przedstawiono wpływ rodzaju matrycy (olej, TAG), rodzaju fotosensybilizatora (chlorofil a – zwany dalej chlorofilem, feofityna a – zwana dalej feofityną), wielkości jego dawki oraz czasu naświetlania na stężenie tlenu singletowego w środowisku reakcyjnym. Spośród wymienionych czynników największy wpływ na stężenie tego tlenu miał rodzaj matrycy. Po 3 h naświetlania stężenie tlenu singletowego w oleju było kilka, a nawet kilkanaście razy wyższe niż w TAG. Po 24 h naświetlania w oleju stwierdzono od kilkudziesięciu do kilkuset razy więcej tlenu singletowego niż w TAG. Tlen singletowy powstający w układzie reakcyjnym z tlenu trypletowego, jako wysoce reaktywny, był natychmiast zużywany do utleniania wiązań nienasyconych lipidów oraz fotosensybilizatorów. Jego pobranie było zdecydowanie większe w TAG niż w oleju. Można to wiązać z odmiennym składem chemicznym obu matryc. Równocześnie stwierdzono kilka razy wyższe stężenia substancji lotnych w TAG niż w oleju (tab. 2 i 3). Jak podają Khan i wsp. [16], brak substancji towarzyszących zwłaszcza o charakterze antyoksydantów, takich jak: tokoferole, karotenoidy, sterole, związki fenolowe i fosfolipidy sprzyja zwiększonej podatności TAG na utlenianie. Oprócz tego następowało zdecydowanie zmniejszenie zawartości fotosensybilizatorów, większe w TAG niż w oleju (tab. 4). Jest to zgodne z wynikami, jakie podają Lee i wsp. [17], według których tlen singletowy bierze udział także w degradacji chlorofili w trakcie utleniania fotosensybilizowanego lipidów.



Rys. 1. Zawartość tlenu singletowego w oleju oraz triacyloglicerolach (TAG) po ich naświetlaniu promieniowaniem UV-A z udziałem chlorofilu a (Chla) oraz feofityny a (Ffa)

Fig. 1. Content of singlet oxygen in oil and triacylglycerols (TAG) after their UV-A irradiation with the participation of chlorophyll a (Chla) and pheophytin a (Ffa)

W obecności chlorofilu stężenie tlenu singletowego w obu matrycach było wyższe niż w obecności feofityny. Było to prawdopodobnie związane z odmienną budową strukturalną obu barwników. Chlorofil z większą łatwością niż feofityna może przekazywać energię wzbudzenia do tlenu trypletowego. Dawka fotosensybilizatora, zarówno chlorofilu, jak i feofityny, w sposób bardzo zróżnicowany i nieregularny wpływała na stężenie tlenu singletowego w oleju oraz TAG. Wynika to prawdopodobnie z tego, że równocześnie następowało wytwarzanie oraz zużycie tlenu singletowego w konkurencyjnych reakcjach utleniania podwójnych wiązań lipidów oraz fotosensybilizatorów [17].

Czas naświetlania miał zróżnicowany wpływ na stężenie tlenu singletowego. W przypadku oleju wydłużenie okresu naświetlania z 3 do 24 h spowodowało wyraźny wzrost stężenia tlenu singletowego. Działo się tak pomimo nieobecności po tym czasie chlorofilu oraz niewielkiej pozostałości feofityny (tab. 4). Tlen singletowy, dobrze rozpuszczalny w lipidach, był jeszcze obecny w układzie reakcyjnym, ale utleniał przede wszystkim olej. Można tak sądzić na podstawie wysokich stężeń substancji lotnych (tab. 2), nieobecności chlorofilu oraz tylko 1-procentowej pozostałości feofityny (tab. 4). Znikome stężenie tlenu singletowego w TAG po 24 h naświetlania było prawdopodobnie wynikiem jego niemal całkowitego zużycia w reakcjach utleniania TAG, jak i fotosensybilizatorów. Efektem końcowym było wysokie stężenie substancji lotnych (tab. 3) oraz całkowita degradacja fotosensybilizatorów (tab. 4).

Tabela 2. Zawartość związków lotnych w oleju [mg/kg] po naswietlaniu promieniowaniem UV-A
 Table 2. Content of volatile compounds in oil [mg/kg] after UV-A irradiation

Związki lotne Volatile compounds	Rodzaj fotosensybilizatora / dawka [mg/kg] / czas naswietlania [h] Type of photosensibiliser / dose [mg/kg] / irradiation time [h]																			
	Chlorofil a / Chlorophyll a									Feofityna a / Pheophytin a										
	0,5			3			24			10			0,5			3			24	
Heksanal	0,85 ±0,11	1,86 ±0,13	0,84 ±0,10	0,84 ±0,10	1,90 ±0,15	0,80 ±0,11	0,80 ±0,11	1,91 ±0,18	0,70 ±0,08	0,70 ±0,08	0,70 ±0,08	2,00 ±0,26	2,00 ±0,26	0,69 ±0,07	0,69 ±0,07	1,50 ±0,17	1,50 ±0,17	0,70 ±0,05	1,48 ±0,18	
Heptanal	0,10 ±0,01	0,20 ±0,02	0,10 ±0,01	0,10 ±0,01	0,22 ±0,03	0,10 ±0,02	0,10 ±0,02	0,22 ±0,03	0,10 ±0,01	0,10 ±0,01	0,10 ±0,01	0,21 ±0,03	0,21 ±0,03	0,10 ±0,01	0,10 ±0,01	0,19 ±0,02	0,19 ±0,02	0,10 ±0,02	0,15 ±0,02	
Trans-2-pentenal	< LOD	0,07 ±0,01	< LOD	< LOD	0,07 ±0,01	< LOD	< LOD	0,07 ±0,00	< LOD	< LOD	< LOD	0,12 ±0,02	0,12 ±0,02	< LOD	< LOD	0,24 ±0,03	0,24 ±0,03	< LOD	0,22 ±0,03	
Okten-3-ol	< LOD	0,06 ±0,00	< LOD	< LOD	0,08 ±0,01	< LOD	< LOD	0,07 ±0,01	< LOD	< LOD	< LOD	0,12 ±0,01	0,12 ±0,01	< LOD	< LOD	0,24 ±0,02	0,24 ±0,02	< LOD	0,25 ±0,03	
Nonanal	< LOD	0,34 ±0,04	< LOD	< LOD	0,21 ±0,03	< LOD	< LOD	0,14 ±0,02	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Suma Total	0,95 ±0,11	2,53 ±0,13	0,94 ±0,09	0,94 ±0,09	2,48 ±0,14	0,90 ±0,12	0,90 ±0,12	2,41 ±0,17	0,80 ±0,08	0,80 ±0,08	0,80 ±0,08	2,45 ±0,28	2,45 ±0,28	0,79 ±0,08	0,79 ±0,08	2,17 ±0,15	2,17 ±0,15	0,80 ±0,05	2,10 ±0,19	

Objaśnienia / Explanatory notes:

< LOD – poniżej granicy wykrywalności / below limit of detection. Pozostałe objaśnienia jak pod tab. 1. / Other explanatory notes as in Tab. 1.

Tabela 3. Zawartość związków lotnych w TAG [mg/kg] po naswietlaniu promieniowaniem UV-A
 Table 3. Content of volatile compounds in TAG [mg/kg] after UV-A irradiation

Związki lotne Volatile compounds	Rodzaj fotosensybilizatora / dawka [mg/kg] / czas naswietlania [h] Type of photosensibiliser / dose [mg/kg] / irradiation time [h]														
	Chlorofil a / Chlorophyll a					Feofityna a / Pheophytin a									
	0,5	3	5	24	10	0,5	3	5	24	10	0,5	3	5	24	10
Heksanal	2,12 ± 0,39	5,17 ± 0,87	2,40 ± 0,41	5,31 ± 0,92	2,21 ± 0,35	5,01 ± 0,67	1,83 ± 0,14	3,99 ± 0,65	1,99 ± 0,15	3,67 ± 0,53	1,79 ± 0,13	3,79 ± 0,57			
Heptanal	0,43 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,39 ± 0,05	0,68 ± 0,07	0,35 ± 0,06	0,60 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,58 ± 0,08	0,49 ± 0,07	0,22 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,61 ± 0,08			
Trans-2-pentenal	0,15 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,38 ± 0,06	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,25 ± 0,04			
Okten-3-ol	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,21 ± 0,02			
Nonanal	0,39 ± 0,05	0,86 ± 0,10	0,41 ± 0,05	0,79 ± 0,08	0,43 ± 0,06	0,81 ± 0,09	0,41 ± 0,04	0,74 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,69 ± 0,08	0,37 ± 0,04	0,83 ± 0,09			
Trans-2-oktenal	0,09 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,05 ± 0,00	0,16 ± 0,03			
Trans-2-nonenal	0,12 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,03			
Suma Total	3,34 ± 0,39	7,62 ± 0,91	3,64 ± 0,40	7,64 ± 0,59	3,59 ± 0,44	7,39 ± 0,71	3,01 ± 0,10	6,30 ± 0,49	3,31 ± 0,18	5,30 ± 0,35	3,06 ± 0,17	6,04 ± 0,69			

Objasnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Po przeprowadzeniu oceny istotności różnic między średnimi zawartościami związków lotnych ogółem w oleju, wyliczonymi na podstawie wyników uzyskanych w odpowiednich wariantach doświadczeń, wykazano:

- rodzaj fotosensybilizatora (chlorofil – $1,69^A \pm 0,79$, feofityna – $1,51^A \pm 0,75$) nie miał statystycznie istotnego wpływu na zawartość związków lotnych ogółem,
- dawka chlorofilu (0,5 mg/kg – $1,73^A \pm 0,83$, 5 mg/kg – $1,70^A \pm 0,80$, 10 mg/kg – $1,65^A \pm 0,79$) oraz feofityny (0,5 mg/kg – $1,62^A \pm 0,89$, 5 mg/kg – $1,47^A \pm 0,72$, 10 mg/kg – $1,43^A \pm 0,68$) nie miały statystycznie istotnego wpływu na zawartość związków lotnych ogółem,
- czas naświetlania miał statystycznie istotny wpływ na zawartość związków lotnych ogółem zarówno w przypadku chlorofilu (3 h – $0,93^A \pm 0,10$, 24 h – $2,46^B \pm 0,15$), jak i feofityny (3 h – $0,79^A \pm 0,07$, 24 h – $2,22^B \pm 0,26$). Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami literowymi były istotnie różne.

Rodzaj fotosensybilizatora w niewielkim stopniu wpływał na stężenie związków lotnych. Można jednak zauważyć, że ich zawartość w oleju z chlorofilem była każdorazowo większa średnio o 11 % niż wówczas, kiedy stosowano feofitynę. Odmienną tendencję obserwowali wcześniej Usuki i wsp. [33]. W ich badaniach nieznacznie wyższą aktywność prooksydacyjną wykazywała feofityna. Może to wynikać z przyjętej metodyki, gdyż postępy fotooksydacji śledzono tylko poprzez oznaczanie liczby nadtlenkowej. Przy dużej złożoności procesu pomiar tylko tego parametru może dawać nieprecyzyjny obraz zachodzących przemian.

Zawartość związków lotnych w oleju była niewrażliwa na dawkę fotosensybilizatora, zarówno chlorofilu jak i feofityny. Można przypuszczać, że przy dawkach powyżej 0,5 mg/kg powstający tlen singletowy jest zużywany przede wszystkim do utleniania wiązań nienasyconych w cząsteczce fotosensybilizatora, a nie lipidów. Lee i wsp. [17] uważają, że istnieje silna konkurencja w dostępie do tlenu singletowego pomiędzy lipidami i chlorofilem, co może zmieniać przebieg procesów oksydacyjnych.

Ogólnie można stwierdzić, że zawartość związków lotnych wzrastała w czasie fotoutleniania oleju. Po 3 h naświetlania oleju z chlorofilem wynosiła ona poniżej 1 mg/kg. Po 24 h ich zawartość wzrosła 2,5-krotnie. Po 3 h naświetlania oleju z feofityną zawartość związków lotnych była o 14 % mniejsza niż w oleju z chlorofilem. Po 24 h nastąpił 3-krotny wzrost ich zawartości. Podobne tendencje obserwowano wcześniej w badaniach Gromadzkiej i wsp. [11], w których olej naświetlano bez udziału fotosensybilizatora, a także w badaniach Jelenia i wsp. [13] nad wpływem temperatury na zawartość związków lotnych.

W profilu substancji lotnych po 3 h naświetlania oleju dominował heksanal, stanowiący blisko 90 % ich ogółu. Ponadto obecny był tylko heptanal. Głębsze zmiany obserwowano po naświetlaniu oleju przez 24 h. Po tym okresie udział heksanalu zmniejszył się do $70 \div 80$ %, a ponadto występowały heptanal, trans-2-pental, okten-

3-ol, a także nonanal. Jak podają Choe i wsp. [4], wśród wtórnych produktów autoksydacji mogą występować aldehydy, kwasy karboksylowe, alkohole i węglowodory. W badaniach Gromadzkiej i wsp. [12] głównymi lotnymi produktami fotooksydacji oleju rzepakowego były heksanal i 2-trans-nonenal.

W ocenie istotności różnic między średnimi zawartościami heksanal w oleju, wyliczonymi na podstawie wyników uzyskanych w odpowiednich wariantach doświadczeń, wykazano:

- rodzaj fotosensybilizatora (chlorofil – $1,36^A \pm 0,55$, feofityna – $1,17^A \pm 0,53$) nie miał istotnego wpływu na zawartość heksanal,
- dawka chlorofilu ($0,5 \text{ mg/kg} - 1,35^A \pm 0,54$, $5 \text{ mg/kg} - 1,37^A \pm 0,56$, $10 \text{ mg/kg} - 1,35^A \pm 0,59$) oraz feofityny ($0,5 \text{ mg/kg} - 1,35^A \pm 0,53$, $5 \text{ mg/kg} - 1,09^A \pm 0,43$, $10 \text{ mg/kg} - 1,07^A \pm 0,41$) nie miała istotnego wpływu na zawartość heksanal,
- czas naświetlania miał statystycznie istotny wpływ na zawartość heksanal zarówno w przypadku chlorofilu (3 h – $0,83^A \pm 0,10$, 24 h – $1,88^B \pm 0,14$), jak i feofityny (3 h – $0,70^A \pm 0,06$, 24 h – $1,64^B \pm 0,32$). Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami literowymi były istotnie różne.

Jak podają Jeleń i wsp. [13], wśród lotnych produktów autooksydacji oleju rzepakowego, prowadzonej w temp. 60 °C przez 12 dni, dominowały: heksanal, 2,4-heptadienal, 2-heptenal, pentenal i 1-penten-3-ol. Wydaje się, że zarówno zawartość związków lotnych ogółem, jak i zawartość heksanal mogą być dobrymi wskaźnikami postępu fotooksydacji olejów roślinnych. W literaturze zdania na ten temat są podzielone. Jeleń i wsp. [13] a także van Ruth i wsp. [34] uważają, że tym adekwatnym wskaźnikiem jest zawartość związków lotnych ogółem. Z kolei Abuzaytoun i wsp. [1] uważają, że to heksanal, powstający z kwasu linolowego, może być dobrym wskaźnikiem oksydacji olejów bogatych w ten kwas.

Na podstawie oceny istotności różnic między średnimi zawartościami związków lotnych ogółem w TAG, wyliczonymi na podstawie wyników uzyskanych w odpowiednich wariantach doświadczeń, wykazano:

- rodzaj fotosensybilizatora (chlorofil – $5,51^A \pm 2,09$, feofityna – $4,52^B \pm 1,43$) miał statystycznie istotny wpływ na zawartość związków lotnych ogółem,
- dawka chlorofilu ($0,5 \text{ mg/kg} - 5,46^A \pm 2,33$, $5 \text{ mg/kg} - 5,65^A \pm 2,10$, $10 \text{ mg/kg} - 5,43^A \pm 1,99$) oraz dawka feofityny ($0,5 \text{ mg/kg} - 4,66^A \pm 1,63$, $5 \text{ mg/kg} - 4,39^A \pm 1,09$, $10 \text{ mg/kg} - 4,51^A \pm 1,63$) nie miały statystycznie istotnego wpływu na zawartość związków lotnych ogółem,
- czas naświetlania miał statystycznie istotny wpływ na zawartość związków lotnych ogółem zarówno w przypadku chlorofilu (3 h – $3,55^A \pm 0,42$, 24 h – $7,48^B \pm 0,76$), jak i feofityny (3 h – $3,18^A \pm 0,22$, 24 h – $5,86^B \pm 0,62$). Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami literowymi były istotnie różne.

Zawartość związków lotnych ogółem w TAG w obecności chlorofilu była o 10 do 30 % większa niż w obecności feofityny. Nie zależała ona od dawki fotosensybilizatora, ale od czasu naświetlania – 8-krotne wydłużenie czasu naświetlania skutkowało ok. 2-krotnym wzrostem zawartości związków lotnych ogółem.

Rodzaj matrycy miał statystycznie istotny wpływ na zawartość związków lotnych ogółem zarówno w przypadku chlorofilu (olej – $1,69^A \pm 0,79$, TAG – $5,51^B \pm 2,09$), jak i feofityny (olej – $1,51^A \pm 0,75$, TAG – $4,52^B \pm 1,43$). Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami literowymi były istotnie różne.

Zawartość związków lotnych ogółem w TAG była 3 razy większa niż w oleju. Można stwierdzić, że usunięcie substancji towarzyszących z oleju rzepakowego zwiększa wrażliwość TAG na utlenianie fotosensybilizowane. Dotyczy to zwłaszcza usunięcia tokoferoli, znanych z wysokiej aktywności przeciwutleniającej [14], a także fosfolipidów [18]. Jest to zbieżne z wynikami, które uzyskali Abyzaytoun i wsp. [1]. Wymienieni autorzy stwierdzili niższą stabilność oksydacyjną TAG niż olejów – lnianego i konopnego podczas ich naświetlania promieniowaniem UV w temp. 27 °C. Podobne obserwacje odnotowali Khan i wsp. [16] w przypadku oleju wiesiołkowego i ogórecznikowego.

Profil substancji lotnych w TAG był szerszy niż w oleju. Obejmował on takie związki jak heksanal, heptanal, trans-2-pentenal, okten-3-ol, nonanal, trans-2-oktenal i trans-2-nonenal. Podobnie jak w oleju dominował heksanal, ale z udziałem 60 ÷ 70 %.

Na podstawie oceny istotności różnic między średnimi zawartościami heksanalu w TAG, wyliczonymi na podstawie wyników uzyskanych w odpowiednich wariantach doświadczeń, wykazano:

- rodzaj fotosensybilizatora (chlorofil – $3,70^B \pm 1,59$, feofityna – $2,85^A \pm 1,07$) miał istotny wpływ na zawartość heksanalu,
- dawka chlorofilu (0,5 mg/kg – $3,64^A \pm 1,71$, 5 mg/g – $3,61^A \pm 1,55$, 10 mg/kg – $3,86^A \pm 1,64$) oraz dawka feofityny (0,5 mg/kg – $2,91^A \pm 1,18$, 5 mg/kg – $2,88^A \pm 0,99$, 10 mg/kg – $2,78^A \pm 1,12$) nie miały statystycznie istotnego wpływu na zawartość heksanalu,
- czas naświetlania miał statystycznie istotny wpływ na zawartość heksanalu zarówno w przypadku chlorofilu (3 h – $2,24^A \pm 0,38$, 24 h – $5,16^B \pm 0,75$), jak i feofityny (3 h – $1,86^A \pm 0,16$, 24 h – $3,85^B \pm 0,51$),
- rodzaj matrycy miał statystycznie istotny wpływ na zawartość heksanalu zarówno w przypadku chlorofilu (olej – $1,36^A \pm 0,55$, TAG – $3,70^B \pm 1,61$), jak i feofityny (olej – $1,17^A \pm 0,53$, TAG – $2,84^B \pm 1,07$). Wartości średnie oznaczone różnymi indeksami literowymi były istotnie różne.

Proces fotooksydacji materiału doświadczalnego śledzono także poprzez oznaczanie zawartości barwników chlorofilowych. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 4.

Tabela 4. Pozostałość fotosensibilizatora [%] po naświetlaniu oleju oraz triacylogliceroli promieniowaniem UV-A

Table 4. Residue of photosensibiliser [%] after UV-A irradiation of oil and TAG

Dawka chlorofili Chlorophyll dose [mg/kg]	Rodzaj próbki / Type of sample							
	Olej + chlorofil a Oil + chlorophyll a		TAG + chlorofil a TAG + chlorophyll a		Olej + feofityna a Oil + pheophytin a		TAG + feofityna a TAG + pheophytin a	
	pozostałość / residue [%] po czasie / after time [h]							
	3	24	3	24	3	24	3	24
0,5	18,0	0,0	12,0	0,0	22,0	0,0	18,0	0,0
5	4,2	0,0	2,2	0,0	16,0	1,2	9,8	0,0
10	3,8	0,0	2,1	0,0	14,0	0,6	9,7	0,8

Obserwowano zróżnicowane zużycie barwników chlorofilowych w trakcie procesu fotooksydacji. Pozostałość chlorofilu w oleju po 3 h naświetlania wynosiła $3,8 \div 18,0$ %, a feofityny – $14 \div 22$ %. Po 24 h chlorofil był nieobecny, a pozostałość feofityny przy dawkach 5 i 10 mg/kg wynosiła odpowiednio: 1,2 i 0,6 %. Pozostałość chlorofilu w TAG po 3 h wynosiła $2,1 \div 12$ %, natomiast feofityny – $9,7 \div 18$ %. Po 24 h chlorofil był nieobecny, a pozostałość feofityny przy dawce 10 mg/kg wynosiła 0,8 %. Świadczy to o szybszej degradacji chlorofilu niż feofityny. Można przypuszczać, że wynika to z większej reaktywności chlorofilu w stosunku do tlenu singletowego. Perez-Galvez i wsp. [23] twierdzą, że zdolność chlorofili do neutralizacji tlenu singletowego w środowisku nielipidowym jest o $25 \div 30$ % większa niż feofityn. Jak podają Lee i wsp. [18], w badaniach prowadzonych nad fotooksydacją canoli degradacja chlorofilu była ściśle skorelowana z ilością powstających nadtlenków i ubytkiem tlenu trypletowego. Według Rontaniego i wsp. [30] w wyniku działania tlenu singletowego utlenieniu ulegają wiązania nienasycone w pierścieniu porfirynowym oraz w łańcuchu fitolowym chlorofili. Chen i wsp. [3] uważają, że tlen singletowy prawdopodobnie bezpośrednio atakuje jedno z podwójnych wiązań w chlorofilach, powodując przesunięcie jego pozycji z wytworzeniem wodoronadtlenków. Powstałe wodoronadtlenki podlegają rozszczepieniu z wytworzeniem produktów degradacji. Kluczową rolę odgrywa obecność jonów magnezu w cząsteczce chlorofilu, a ich brak w cząsteczce feofityny.

Zużycie fotosensibilizatorów w próbce zależało także od rodzaju matrycy lipidowej. Ich pozostałość w TAG była wyraźnie mniejsza niż w oleju. Należy to wiązać z odmienną charakterystyką chemiczną TAG w porównaniu z olejem. Można przy-

puszczać, że usunięcie substancji towarzyszących z oleju ułatwiało utlenianie nie tylko lipidów, ale także barwników chlorofilowych. Są to obserwacje zbieżne z wynikami badań Lee i wsp. [17], którzy dowiedli dużych strat chlorofilu podczas fotooksydacji TAG canoli. Jego zawartość zmalała z 4 ppm do 0,2 ppm. Jednocześnie wykazali, że obecność fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy w oleju działa ochronnie na fotodekompozycję chlorofilu. A zatem obie te substancje w sposób pośredni mają działanie proooksydacyjne podczas fotooksydacji oleju z udziałem chlorofilu.

Czas naświetlania w wyraźny sposób wpływał na pozostałość fotosensybilizatorów w matrycy. Po 3 h naświetlania następowało znaczne zużycie fotosensybilizatorów. Pozostałość chlorofilu w oleju wynosiła $3,8 \div 18,0$ %, a w TAG – $2,1 \div 12,0$ %. Pozostałość feofityny w oleju wynosiła $14 \div 18$ %, a w TAG – $9,7 \div 18,0$ %. Ośmiokrotne wydłużenie czasu naświetlania spowodowało całkowitą degradację chlorofilu zarówno w oleju, jak i w TAG. W przypadku feofityny pozostawało jej jeszcze w oleju $0,6 \div 1,2$ %, a w TAG – $0,8$ %. Widoczna jest mniejsza wrażliwość feofityny niż chlorofilu na okres naświetlania. Feofityna jest głównym barwnikiem chlorofilowym występującym w surowym oleju rzepakowym, a produkty jej przekształceń mogą być obecne w niewłaściwie rafinowanym oleju [22]. Mogą one bardzo niekorzystnie wpływać na jego stabilność w trakcie składowania, dystrybucji i przechowywania w warunkach domowych.

Wnioski

1. Barwniki chlorofilowe są fotosensybilizatorami utleniania oleju rzepakowego oraz TAG podczas ich ekspozycji na promieniowanie UV-A. Biorą one udział w procesie generowaniu tlenu singletowego. Fotosensybilizująca efektywność chlorofilu a jest wyższa niż feofityny a.
2. Barwniki chlorofilowe mają zróżnicowany wpływ na zawartość i profil substancji lotnych powstających podczas fotoutleniania oleju oraz TAG. Rodzaj fotosensybilizatora miał istotny wpływ na zawartość substancji lotnych ogółem oraz heksanal w TAG. Maksymalna zawartość substancji lotnych występowała przy dawce fotosensybilizatora na poziomie 0,5 mg/kg.
3. Barwniki chlorofilowe podczas fotoutleniania oleju rzepakowego i TAG ulegają degradacji w wyniku utleniania tlenem singletowym. Feofityna a trudniej ulega degradacji niż chlorofil a. Po 24 h naświetlania była ona jeszcze obecna w oleju i w TAG.
4. Substancje towarzyszące odgrywają ważną rolę ochronną przed fotoutlenianiem oleju rzepakowego. Ich usunięcie spowodowało zwiększenie pobrania tlenu singletowego, wzrost zawartości substancji lotnych ogółem, zmiany ich profilu oraz zwiększenie degradacji chlorofilu.

5. Barwniki chlorofilowe mają niekorzystny wpływ na stabilność oksydacyjną oleju rzepakowego podczas jego ekspozycji na promieniowanie UV-A i powinny być z niego usunięte.

Literatura

- [1] Abyzaytoun R., Shahidi F.: Oxidative stability of flax and hemp oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2006, 83, 855-861.
- [2] Böhm F., Edge R., Truscott T.G.: Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: Potential effects for human health. *Acta Biochim. Pol.*, 2012, 59 (1), 27-30.
- [3] Chen B.H., Huang J.H.: Degradation and isomerization of chlorophyll a and β -carotene as affected by various heating and illumination treatments. *Food Chem.*, 1998, 62, 299-307.
- [4] Choe E., Min D.B.: Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2006, 5, 169-186.
- [5] Cuny P., Romano J.C., Beker B., Rontani J.F.: Comparison of the photodegradation rates of chlorophyll chlorin ring and phytol side chain in phytodetritus: Is the phytildiol versus phytol ratio (CPPI) a new biogeochemical. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1999, 237, 271-290.
- [6] PN-EN ISO 29841:2014-06. Oleje i tłuszcze roślinne. Oznaczanie produktów rozkładu chlorofili a i a' (feofityn a, a' i pirofeofityn).
- [7] Frankel E.N.: Photooxidation of unsaturated lipids. In: *Lipid Oxidation*. 2nd ed. Ed. E.N. Frankel, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2012, pp. 51-66.
- [8] Fuster M.D., Lampi A.M., Hopia A., Kamal-Eldin A.: Effects of α - and γ -tocopherols on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids*, 1998, 33, 715-722.
- [9] Gargouri B., Zribi A., Bouaziz M.: Effect of containers on the quality of Chemlali olive oil during storage. *J. Food Sci. Technol.*, 2015, 52, 1948-1959.
- [10] Gliszczyńska-Świągło A., Sikorska E., Khemelinskii I., Sikorski M.: Tocopherols content in edible plant oils. *Pol. J. Nutr. Sci.*, 2007, 57 (4 A), 157-161.
- [11] Gromadzka J., Wardenecki W., Lores M., Lompart M., Fernandez-Alvarez M., Lipińska K.: Investigation on edible oils oxidation stability using photooxidation and SPME/GC method for determination of volatile compounds – preliminary investigation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2008, 58 (3), 321-324.
- [12] Gromadzka J., Wardenecki W.: Comparison of oxidative stability of different edible oils. *Nauk. Prz. Technol.*, 2009, 3, (4), #138.
- [13] Jeleń H., Mildner-Szkudlarz S., Jasińska J., Wąsowicz E.: A headspace SPME-MS method for monitoring rapeseed oil autooxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2007, 84, 509-517.
- [14] Kaiser S., Mascio P.D., Murphy E., Sies H.: Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, 277 (1), 101-108.
- [15] Kellens M.: Oil processing challenges in the 21st century: Enzymes key to quality and profitability. *World Congress on Oils and Fats and 28th International Society for Fat Research Congress*, Sydney, Australia, 27-30 September 2009.
- [16] Khan M.A., Shahidi F.: Photooxidative stability of stripped and non-stripped borage and evening primrose oils and their emulsion in water. *Food Chem.*, 2002, 79 (1), 47-53.
- [17] Lee E., Ahn H., Choe E.: Effect of light and lipids on chlorophyll degradation. *Food Sci. Biotechnol.*, 2014, 23 (4), 1061-1065.
- [18] Lee J., Choe E.: Effects of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine on the photooxidation of canola oil. *J. Food Sci.*, 2009, 74 (6), C461-C466.

- [19] Mattheus B.: Oxidation of edible oils. In: Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications. Eds. E.A. Decker, R.J. Elias and D.J. McClements. Woodhead Publishing Ltd., Oxford, UK, 2010, pp. 183-238.
- [20] Min D.B., Boff J.M.: Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2002, 1, 58-72.
- [21] Mińkowski K., Grześkiewicz S., Krupska A.: Zastosowanie metody HS-SPME_GC/FID do wykrywania wczesnych zmian oksydacyjnych oleju lnianego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, 6 (85), 93-102.
- [22] Mińkowski K., Bartosiak M., Ciemiński D.: Effect of extraction and refining of rapeseed oil on profile and content of chlorophyll pigments. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2019, 2 (119), 95-109.
- [23] Perez-Galvez A., Viera I., Roca M.: Carotenoids and chlorophyll as antioxidants. *Antioxidants*, 2020, 9 (6), #505.
- [24] PN-EN ISO 3960:2017-03. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej. Jodometryczne (wizualne) oznaczanie punktu końcowego.
- [25] PN-EN ISO 6885:2016-04. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby anizydynowej.
- [26] PN-EN ISO 660:2021-03. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
- [27] PN-EN 12822:2014-08. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie witaminy E metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Pomiar α -, β -, γ - i δ -tokoferolu.
- [28] PN-A-86939-2:1998. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości metali ciężkich metodą atomowej spektrometrii emisyjnej. Oznaczanie zawartości żelaza.
- [29] PN-A-86939-3:1998. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości metali ciężkich metodą atomowej spektrometrii emisyjnej. Oznaczanie zawartości miedzi.
- [30] Rontani J.F., Rabourdin A., Marchand D., Aubert C.: Photochemical oxidation and autooxidation of chlorophyll phytol side chain in senescent phytoplanktonic cells: Potential sources of several acyclic isoprenoid compounds in the marine environment. *Lipids*, 2003, 38, 241-254.
- [31] Rotkiewicz D., Konopka I., Tańska M.: Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe olejów roślinnych i ich funkcje. *Rośliny Oleiste*, 2002, 23, 561-579.
- [32] Schwartz S.J., Cooperstone J.L., Cichon M.J., von Elbe J.H., Giusti M.M.: Colorants. In: Fennema's Food Chemistry. 5th ed. Eds. S. Damodoran, K.L. Park. CRC Press, Boca Raton, USA, 2017, pp. 1110-1182.
- [33] Usuki R., Endo Y., Kaneda T.: Prooxidant activities chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. *Agric., Biol. Chem.*, 1984, 48, 991-994.
- [34] Van Ruth S.M., Roozen J.P., Jansen F.J.H.M.: Aromaprofiles of vegetable oils varying in fatty acid composition vs. concentrations of primary and secondary lipid oxidation products. *Food/Nahrung*, 2000, 44 (5), 318-322.

EFFECT OF CHLOROPHYLL PIGMENTS ON THE COURSE OF PHOTSENSITIZED OXIDATION OF RAPESEED OIL

S u m m a r y

The presence of chlorophyll pigments in oils has a negative effect on their taste, smell, colour, clearness, thermal stability and shelf life. Those compounds are strong photosensitisers in oxidation processes of unsaturated bonds of lipids, what negatively impacts the oxidative stability of oil during storage.

The objective of the research study was to evaluate the photooxidation activity of chlorophyll pigments in rapeseed oil by the UV-A radiation. A refined rapeseed oil and its triacylglycerols (TAG) constituted a research material. As photosensitisers were used chlorophyll a and pheophytin a. The photooxidation process was monitored using the determination of the content of singlet oxygen, volatile compounds and chlorophyll pigments. It was shown that chlorophyll pigments were photosensitisers in photooxidation of rapeseed oil and TAG during their exposure to the UV-A radiation. Chlorophyll a and pheophytin a participate in the generation of singlet oxygen. The photosensitising efficiency of chlorophyll a is higher than that of pheophytin a. Chlorophyll pigments have a diversified effect on the content and profile of volatile substances formed during the photooxidation of oil and TAG. The type of photosensitiser has a significant impact on the total volatile compounds and hexanal content in the TAG. The maximum level of volatile compounds is found at a photosensitiser dose of 0.5 mg/kg. Chlorophyll pigments are degraded as a result of the oxidation with singlet oxygen during photooxidation of the rapeseed oil and TAG. Pheophytin a is more difficult to degrade than chlorophyll a. The accompanying substances play an important protective role against the photooxidation of rapeseed oil. Their removal contributes to a higher singlet oxygen uptake, an increase in the total volatile compounds content, changes in their profile and an increased degradation of chlorophyll pigments. Chlorophyll pigments adversely affect the oxidative stability of rapeseed oil when exposed to the UV-A radiation and they should be removed therefrom.

Key words: rapeseed oil, photosensitized oxidation, chlorophyll pigments, singlet oxygen, volatile compounds ☒