

Aleksandra Szczucińska¹, Andrzej W. Lipkowski^{1,2}, Bożenna Baranowska¹
Wiesława Walisiewicz-Niedbalska¹, Krzysztof Różycki¹
Hanna Maciuszczak-Kotlarek³

¹ Instytut Chemii Przemysłowej im. prof. I. Mościckiego w Warszawie

² Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

³ Poznańskie Zakłady Zielarskie „Herbapol” S.A. w Poznaniu

Utylizacja odpadu nasion ostropestu plamistego I. Olej z ostropestu plamistego jako antyutleniacz

Utilisation of milk thistle seed waste I. Milk thistle oil as antioxidant

Słowa kluczowe: ostropest plamisty, olej, antyutleniacz, sylimaryna, *Silybum marianum*

Key words: milk thistle, oil, antioxidant, silymarin, *Silybum marianum*

Nasiona ostropestu plamistego zawierają obok oleju około 20% zespół bioflawonoidów zwanych sylimaryną (1,5–3%) o silnych właściwościach antyutleniających. Dlatego wykorzystywane są do produkcji sylimarolu, leku stosowanego w schorzeniach wątroby. W czasie produkcji sylimarolu z nasion ostropestu jako produkt uboczny pozostaje bielmo bogate w olej. Celem pracy było przeprowadzenie badań nad wykorzystaniem bielma jako surowca do otrzymywania aktywnego kompleksu o właściwościach antyutleniających. Z bielma nasion ostropestu ekstrahowano olej dwoma rozpuszczalnikami: etanolem lub heksanem w aparacie Soxhleta. Metodą chromatografii cienkowarstwowej rozdzielono wyekstrahowany olej na frakcje triacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych. Skład kwasów tłuszczowych w obu frakcjach oznaczano metodą chromatografii gazowej. Technika chromatografii gazowej oznaczano również ilość i skład steroli. Zawartość sylimaryny oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a stabilność oksydacyjną, mierzoną czasem indukcji, oznaczano na Rancimacie. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że z bielma można uzyskać 20–33% ekstraktu zawierającego około 1% sylimaryny, a składy kwasów tłuszczowych

Seeds of milk thistle contain 20% of oil. In addition, milk thistle seeds contain a bioflavonoid complex known as silymarin (from 1,5 to 3%). It has, among others, strong antioxidant properties. Therefore the seeds are used for production of silimarol, a drug applied in liver diseases. In a process of silimarol production the endosperm of milk thistle remains as a by-product. The object of the work was to investigate potential applications of the endosperm as a substrate for obtaining an active complex with antioxidant properties. The oil was extracted from endosperm in the soxhlet extractor apparatus. For extraction, ethanol and hexane were used. Fractions of acylglycerols and fatty acids were separated with the use of TLC method. Determination of fatty acid composition in both fractions was done with a GLC method. Composition and quantity of sterols were also determined with a GLC technique. Quantities of silymarin in milk thistle oil were determined with a HPLC method. Oxidizing stability was determined with the Rancimat 679. Several plant oils oxidizing stability was compared with milk thistle oil oxidizing stability. Then the milk thistle oil ability for protection of fats and emulsions from oxidizing when it was introduced into them was defined.

części olejowej i wolnych kwasów tłuszczowych są podobne do siebie i do znanych olejów jadalnych, w granicach błędu oznaczenia. Stabilność oksydacyjna oleju z bielma ostropestu w porównaniu do niektórych olejów roślinnych była wyższa. Wprowadzenie oleju z bielma z ostropestu do tłuszczów i emulsji kosmetycznych, w celu ochrony przed oksydacją, wykazało jego silne działanie antyutleniające i dlatego może on być stosowany jako środek zapobiegający utlenianiu w tłuszczach spożywczych i jako olej kosmetyczny.

As a result of conducted investigation it was stated, that from the endosperm a 20–30% extract could be obtained, which contains 1% of silymarine. It was also found that a composition of fatty acids in oil fraction and a composition of free fatty acids are similar. Moreover, the compositions resemble edible oils within measurement error. Oxidizing stability of oil from milk thistle endosperm was higher in comparison to a few plant oils. Introduction of the milk thistle endosperm oil into fats and cosmetic emulsions, in order to protect them against oxidizing, showed its strong antioxidant properties. Because of this, it can be used as an antioxidant agent in edible fats and also as a cosmetic oil.

Wstęp

Ostropest plamisty *Silybum marianum* (L.) jest ważną rośliną przemysłową, uprawianą w wielu krajach. W Polsce obszar upraw ostropestu obejmuje powierzchnię około 2000 ha. Uprawia się go ze względu na owoce. Ekstrakt z nich już od czasów starożytnych stosowany był jako lek na wątrobę (Hope 2000). Składnikami o działaniu farmakologicznym są flawonoidy zwane flawonolignanami, a wśród nich grupa zwana sylimaryną, występująca w owocach w ilości 1,5 do 3%. Po raz pierwszy została ona wyizolowana i zbadana w 1968 roku (Wagner i in. 1968, Hahn i in. 1968). Sylimaryna stanowi mieszaninę flawonolignanów, wśród których głównymi są: sylibina, sylidianina i sylikrystyna. Pozostałe flawonolignany występują w ilościach śladowych. Inne składniki czynne to: taksyfolina, kwercetyna, dihydrokamferol i apigenina. Poza tym nasiona zawierają około 20% oleju o wysokiej zawartości kwasu linolowego (około 60%), sterole z tokoferolem, fosfolipidy i około 25–30% białka (Norman i in. 1994, DAB 1997, Expanded Commission a Monographs 2000).

Sylimaryna chroni przed wirusowym zapaleniem wątroby, przed czynnikami uszkadzającymi jej komórki, jak np. alkohol, rozpuszczalniki organiczne czy metale ciężkie, pomaga również w ich regeneracji poprzez stymulację biosyntezy białek i wzmożenie procesów mitozy nawet w uszkodzonych komórkach. Podana po zatruciu muchomorem sromotnikowym działa jak antidotum (Ożarowski 1989, Niedworok 1996). Z nowszych badań wiadomo, że sylimaryna jest jednym z najsilniejszych antyutleniaczy wśród flawonoidów (Okaw i in. 2001), który może zahamować destrukcyjne działanie wolnych rodników i doprowadzić do wzrostu poziomu glutationu i dysmutazy nadtlenkowej, dwóch antyutleniaczy znajdujących się w organizmie (Mindell 1999). Z tego też względu podjęto próby stosowania jej w leczeniu hiperinsulinemii (Velusi i in. 1997).

Sylimaryna zawarta jest przede wszystkim w łusce nasion i z niej jest izolowana metodą ekstrakcji metanolem lub etanolem (patenty PL 121811 i PL 147215). Zwykle po kolejnych operacjach otrzymuje się sypki produkt, ostatecznie tabletkowany. W Polsce w ten sposób produkuje się lek zwany sylimarolem w Zakładach Zielarskich „Herbapol” w Poznaniu. Po odłuszczeniu nasion jako odpad pozostaje bielmo zawierające około 30% oleju o składzie kwasów tłuszczowych zbliżonym do olejów jadalnych, a także pewną ilość sylimaryny (Lipkowski i in. 2001).

Celem naszej pracy było zbadanie bielma, będącego produktem ubocznym powstającym przy przerobie nasion ostropestu, pod kątem wykorzystania go w przemyśle. Szczególną uwagę zwrócono na olej zawierający domieszkę sylimaryny, ze względu na jej własności antyutleniające.

Materiały i metody

Badania prowadzono na jednej 50-kilogramowej partii odłuszczonego bielma ostropestu plamistego otrzymanego z Zakładów Zielarskich „Herbapol” w Poznaniu. Przed ekstrakcją zostało ono dodatkowo rozdrobnione przy pomocy młynka udarowego. Następnie poddane zostało ekstrakcji heksanen lub 96% etanolem w aparacie Soxhleta. Z ekstraktów po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano oleje kierowane do analizy i dalszych badań.

Z nasion rzepaku odmiany niskoerukowej (otrzymane z Zakładów Tłuszczowych w Kruszwicy) pozyskano olej rzepakowy metodą ekstrakcji heksanem w aparacie Soxhleta (jak wyżej).

Olej sojowy jadalny zakupiono w Warszawskich Zakładach Tłuszczowych.

Stosowane w badaniach masło produkcji Spółdzielni Mleczarskiej „Mlekpól” w Grajewie (zawierające 82% tłuszczu) i „Ostrołęckie” produkcji OSML w Ostrołęce (zawierające 68% tłuszczu w postaci tłuszczu mlecznego i oleju słonecznikowego) oraz smalec wieprzowy wyprodukowany w Zakładach Mięsnych w Bydgoszczy zakupiono w sklepie.

Emulsje kosmetyczne wykonano jako emulsje typu woda w oleju. Faza olejowa zawierała: 30% oleju roślinnego, 8% oksyetylenowanych kwasów tłuszczowych (emulgator), 1,5% alkoholu cetylowego (stabilizator), a faza wodna 4% gliceryny i 56,5% wody.

Jako porównawcze antyutleniacze użyto α - tokoferol i BHT firmy Merck.

Skład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą GLC wg AOCS Official Method Ce 2-66w na aparacie firmy Hewlett-Packard 5890 Series II, na kolumnie CP Sil 88 firmy Chrompack. Stosowano gaz nośny hel, detektor FID — 250°C, dozownik — 220°C, program temperatury pieca — 160°C/5 min., 5°C/min. do 200°C. Identyfikację składników wykonano porównując ich czasy retencji z czasami retencji wzorców. Jako wzorce wykorzystano materiały z badań międzylaboratoryjnych organizowanych przez AOCS.

Wolne kwasy tłuszczowe zawarte w oleju oznaczano metodą GLC jak opisano powyżej, uprzednio izolując je z oleju metodą chromatografii cienko-warstwowej na płytce Kiesegel 60, 0,5 mm. Jako roztwór rozwijający stosowano: heksan : eter etylowy : kwas octowy w stosunku 80 : 20 : 1, odnośnikiem był kwas oleinowy.

Oznaczanie steroli wykonano metodą GLC wg normy niemieckiej DGF III 1 (98) na aparacie firmy Hewlett-Packard 5890 Series II. Analizowano sterole w postaci pochodnych silanowych stosując kolumnę SPB 1 firmy Supelco, gaz nośny hel, detektor FID — 300°C, dozownik — 250°C, program temperatury pieca — 220°C 2°C/min. do 290°C. Jako standard wewnętrzny stosowano betulinę.

Zawartość sylimaryny określano metodą HPLC na aparacie Perkin-Elmer z detektorem DAD 235C stosując: kolumnę Hypersil BDS C 18 150 × 4,6 mm, grubość ziarna 5 μm; faza ruchoma — 0,5 n kwas trójfluorooctowy : metanol, 60 : 40; przepływ 1 ml/min, długość fali 290 nm. Wzorzec stanowił lek: Silimarol 70 mg produkcji Zakładów Zielarskich „Herbapol” w Poznaniu.

Stabilność oksydacyjną określaną przez czas indukcji oznaczano na aparacie Rancimat 679 firmy Methron. Stosowano następujące parametry: temperatura 120°C; przepływ powietrza 10 l/h; masa próbki: 2,5 g; woda redestylowana — 50 ml.

Wyniki

Ze względu na skład bielma, tj. dużą zawartość oleju, a także pewną ilość sylimaryny założono, że najkorzystniejsze byłoby uzyskanie takiego produktu, który nie byłby czystym olejem, ale zawierał domieszkę sylimaryny. Sylimaryna powinna, jako naturalny antyutleniacz, chronić w jakimś stopniu uzyskany olej przed utlenianiem.

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że z bielma ostropestu plamistego można metodą ekstrakcji rozpuszczalnikami takimi jak heksan i etanol, stosując je w ich temperaturze wrzenia, uzyskać olej w ilości 32–33% w przypadku heksanu i 20–21% w przypadku etanolu. Oleje wykorzystane w badaniach miały charakterystykę podaną w tabeli 1 — wyniki dla 5 prób po ekstrakcji, dla każdej 3 oznaczenia.

Jak wynika z tabeli tylko olej uzyskany w wyniku ekstrakcji etanolem zawierał 0,8% sylimaryny, dlatego ten rozpuszczalnik został uznany za odpowiedni dla naszych celów.

Tabela 1
Charakterystyka olejów z ostropestu uzyskanych w wyniku ekstrakcji heksanem lub etanolem
Characteristics of milk thistle oils obtained as a result of hexane or ethanol extraction

Rodzaj oznaczenia <i>Determination of</i>	Olej po ekstrakcji — <i>Extraction</i>	
	heksanem <i>hexane</i>	etanolem <i>ethanol</i>
1 Liczba jodowa, g J ₂ /100 g — <i>Iodine value</i>	117 ± 4,5	115 ± 4,3
2 Liczba zmydlania, mg KOH/g — <i>Saponification value</i>	188 ± 8,2	195 ± 8,8
3 Liczba kwasowa, mg KOH/g — <i>Acid Value</i>	4 ± 0,3	57 ± 3,1
4 Liczba nadtlenkowa, milirówn. O ₂ /mol <i>Peroxide value</i>	0	0
5 Zawartość steroli, % wag. — <i>Sterols Content</i>	0,42 ± 0,03	0,65 ± 0,04
6 Zawartość silymaryny, % wag. — <i>Silymarin Content</i>	śląd — <i>trace</i>	0,8 ± 0,07

Wysoka liczba kwasowa wskazuje, że w oleju występują, oprócz kwasów tłuszczowych związanych w triacyloglicerolach, wolne kwasy tłuszczowe. Dlatego przeprowadzono badania wydzielenia wolnych kwasów tłuszczowych z oleju. Stosując metodę chromatografii cienkowarstwowej rozdzielono olej po ekstrakcji etanolem na frakcje triacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych. Ilość tych ostatnich wynosiła 21,4%. Następnie oznaczono skład kwasów tłuszczowych obu frakcji, a wyniki przedstawiono w tabeli 2. Jak wynika z przedstawionych danych skład kwasów tłuszczowych triacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych jest zbliżony.

Tabela 2
Skład kwasów tłuszczowych wolnych i związanych w oleju z ostropestu plamistego (%)
Composition of fatty acids free and bonded in milk thistle oil (%)

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Wolne kwasy tłuszczowe <i>Free fatty acids</i>	Triacyloglicerole <i>Triacyloglycerols</i>
C _{14:0}	0,2	0,1
C _{16:0}	11,5	8,7
C _{18:0}	5,1	5,1
C _{18:1}	19,5	21,7
C _{18:2}	58,1	57,8
C _{18:3}	0,5	0,2
C _{20:0}	2,1	3,1
C _{20:1}	0,7	0,9
C _{22:0}	1,5	2,3
Nasycone — <i>Saturated</i>	20,3	19,3
Jednonienasycone — <i>Monoenic</i>	20,2	22,6
Wielonienasycone — <i>Polyenic</i>	58,7	58,0

Badania wykazały, że wysoka liczba kwasowa oleju jest właściwością świeżo otrzymanego oleju i jest stabilna w czasie (tab. 3).

Tabela 3

Stabilność liczby kwasowej — *Stability of acid value*

Temp. Temp. [°C]	Czas, tygodnie — <i>Time, weeks</i>							
	0	1	2	3	5	7	9	11
7	57,2	57,2	57,2	57,0	57,2	57,0	57,0	57,1
25	60,2	60,4	60,5	60,5	61,1	60,7	60,8	60,8

Badania porównawcze przeprowadzone dla oleju z ostropestu ekstrahowanego etanolem, oleju z ostropestu i rzepaku ekstrahowanych heksanem oraz sojowego handlowego wykazały, że odporność na utlenianie oleju z ostropestu uzyskanego w wyniku ekstrakcji etanolem jest większa niż pozostałych, a szczególnie kilkakrotnie większa niż oleju z ostropestu ekstrahowanego heksanem, nie zawierającego sylimaryny.

Tabela 4

Stabilność oksydacyjna wybranych olejów roślinnych
*Oxidizing stability of selected plant oils**

Olej — <i>Oil</i>	Rozpuszczalnik — <i>Solvent</i>	Czas indukcji, godziny <i>Induction time, hours</i>
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	heksan — <i>hexane</i>	5,0
Sojowy — <i>Soyabean</i>	heksan — <i>hexane</i>	3,7
Ostropestowy — <i>Milk thistle</i>	heksan — <i>hexane</i>	0,6
	etanol — <i>ethanol</i>	15,1

* Badania prowadzono w temperaturze 120°C — *Investigation was carried out at 120°C*

Wynik stabilności oksydacyjnej dla oleju z ostropestu z domieszką sylimaryny był na tyle interesujący, że przeprowadzono badania możliwości zastosowania go w roli antyutleniacza w innych tłuszczach. Olej został wprowadzony do masła, masła z dodatkiem oleju roślinnego oraz smalcu wieprzowego, a następnie porównano stabilność oksydacyjną tłuszczów bez oleju i z jego dodatkiem (tab. 5).

Porównując uzyskane wyniki można stwierdzić, że we wszystkich tych przypadkach dodatek oleju z ostropestu pozwalał na wyraźne wydłużenie czasu indukcji, a więc zwiększenie stabilności oksydacyjnej badanych tłuszczów. Zastosowanie takiego naturalnego antyutleniacza w tłuszczach i wyrobach spożywczych dałoby efekt prozdrowotny.

Otrzymany olej ma wszelkie cechy bioolejów stosowanych obecnie chętnie w kosmetyce. Dlatego sprawdzono również jego działanie w emulsji kosmetycznej.

Tabela 5

Efekt zastosowania oleju z ostropestu w tłuszczach spożywczych
*Effect of application of milk thistle oil in food fats**

Twuszcz — <i>Fat</i>	Olej z ostropestu, % <i>Milk thistle oil, %</i>	Czas indukcji, godziny <i>Induction time, hours</i>
Masło — <i>Butter</i>	0	20,4
	3	45,1
„Ostrołęckie” — <i>Mix „Ostrołęckie”</i>	0	18,8
	3	34,3
Smalec — <i>Lard</i>	0	0,6
	1,9	3,6

* Badania prowadzono w temperaturze 120°C — *Investigation was carried out at 120°C*

Tabela 6

Stabilność oksydacyjna emulsji kosmetycznych zawierających różne antyutleniacze
Oxidizing stability of cosmetics emulsion containing different antioxidants

Olej — <i>Oil</i>	Antyutleniacz <i>Antioxidant</i>	Czas indukcji, godziny <i>Induction time, hours</i>
Olej z ostropestu — <i>Milk thistle oil</i>	–	2,2
Olej sojowy — <i>Soyabean oil</i>	–	1,7
	α-tokoferol — <i>α-tocopherol</i> (0,1%)	2,0
	BHT (0,01%)	2,4

* Badania prowadzono w temperaturze 120°C — *Investigation was carried out at 120°C*

Porównując aktywność oleju z ostropestu plamistego zawierającego sylimarynę i oleju sojowego z dodatkiem typowych kosmetycznych antyutleniaczy, można stwierdzić, że olej z ostropestu ma równie korzystne działanie.

Na podstawie powyższych badań zostały zgłoszone dwa wnioski patentowe.

Wnioski

1. Z bielma ostropestu plamistego można otrzymać olej o składzie kwasów tłuszczowych zbliżonym do olejów jadalnych i zawierający około 1% sylimaryny.
2. Ma on wyższą stabilność oksydacyjną niż inne oleje jadalne i wprowadzony do tłuszczów lub emulsji działa jak antyutleniacz.
3. Z tego względu nadaje się do stosowania w wyrobach tłuszczowych i emulsjach kosmetycznych.

Conclusions

1. Oil can be obtained from the endosperm of milk thistle with composition of fatty acids similar to that of cooking oils and containing approximately 1% of silymarine.
2. It has a higher oxidizing stability than other cooking oils and it acts as an antioxidant when added to fats or emulsions.
3. Owing to the above features it can be used as antioxidant in fats and cosmetic emulsions.

Literatura

- Deutsches Arzneibuch (DAB 1997). 1997. Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag.
- Encyclopedia of Common Natural Ingredients. 1996. Toronto, Singapore, John Willey and sons.
- Expanded Commission E Monographs, Herbal Medicine. 2000. Newton, Integrative Medicine Commission.
- Hahn G., Lehman H.D., Kuerten M., Uebel H., Vogel G. 1968. Zur Pharmakologie und Toxikologie von Silymarin, des antihepatotoxischen Wirkprinzipes aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn., Arzneimittel Forschung, 18(6).
- Hoppe J. 2000. Milk thistle (*Silybum marianum*), Natural Foods Merchandiser, 10.
- Lipkowski A.W., Szczucińska A., Gwardiak H., Walisiewicz-Niedbalska W., Baranowska B. 2001. Niektóre aspekty wykorzystania oleju z ostropestu plamistego. Materiały IX Konferencji Naukowej „Postępy w technologii tłuszczów roślinnych”, Kowno.
- Mindell E. 1999. Biblia suplenentów. Warszawa, Wiedza i Życie.
- Niedworok J. 1996. Działanie farmakologiczne ostropestu plamistego w zatruciu alkoholem etylo-
wym i innymi środkami toksycznymi. Wiadomości Zielarskie, 7–8.
- Norman N.G., Bisset H., Wichtl M. 1994. Herbal Drugs and Phytopharmaceutical. Stuttgart, Medfarm Scientific Publishers.
- Okawa M., Kinjo J., Nohara T., Ono M. 2001. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pierylhydrazyl) Radical Scavending Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants.
- Ożarowski A., Jaroniewski W. 1989. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Warszawa, IWZZ.
- Patenty PL 121811 i PL 147215.
- Velussi M., Cernigoi A.M., De Monte A., Dapas F., Caffau K., Zilli M. 1997. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. Journal of Hepatology, 26.
- Wagner H., Hoerhammer L., Muenster R. 1968. Zur Chemie des Silymarins (Silybin), des Wirkprinzips der Frucht von *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus Marianus* L.). Arzneimittel Forschung, 18.