

Halina Pieńkowska¹, Zbigniew Górski², Ryszard Zadernowski³, Andrzej Klonowski⁴

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

¹ Wydział Nauk Technicznych, ³ Wydział Nauki o Żywności, ⁴ Wydział Matematyki i Informatyki

² Politechnika Poznańska, Wydział Technologii Chemicznej

Wpływ przechowywania wybranych olejów roślinnych na kinetykę zaniku fotochemiluminescencji*

The influence of the storage of selected vegetable oils on kinetics of decreasing photochemiluminescence

Słowa kluczowe: olej wiesiołkowy, rzepakowy, ogórecznikowy, olej z nasion żmijowca, fotoutlenianie, chemiluminescencja, obrazowanie

Badano kinetykę zanikającej chemiluminescencji (CL) w oleju wiesiołkowym, ogórecznikowym, rzepakowym i z nasion żmijowca indukowanej naświetlaniem z zakresu UV-A (315–400 nm), tuż po wytłoczeniu i po półrocznym przechowywaniu w lodówce w temperaturze około 4°C.

Określono charakter zaniku chemiluminescencji oraz wykonano obrazowanie tego zaniku za pomocą ultraczułej kamery CCD. Wyznaczono stałą szybkości zaniku chemiluminescencji. W badanych olejach oznaczono skład kwasów tłuszczowych, ilość substancji nie ulegającej zmydłaniu, liczbę nadtlenkową, barwę, zawartość barwników z grupy karotenoidów i chlorofili, których obecność w olejach ma wpływ na przebieg reakcji fotoutleniania i kinetykę zaniku CL.

Proponowana metoda badania kinetyki zaniku luminescencji stanowi alternatywę wobec popularnie stosowanych metod analitycznych i nie jest stosowana tradycyjnie do oceny stopnia deterioracji olejów.

Key words: evening primrose oil, rapeseed oil, borage oil, echium oil, photooxidation, chemiluminescence, imaging

The kinetics of decreasing photochemiluminescence (CL) in oils from seeds of evening primrose (*Oenothera paradoxa* H.), borage (*Borago officinalis* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) and blueweed (*Echium plantagineum* L.) was examined. Oils were exposed to radiation of UV-A (315–400 nm) immediately after pressing and after half-yearly storage in refrigerator (4°C). The character of decay of chemiluminescence was determined and displayed on CCD camera.

The constant velocity of chemiluminescence (CL) decay, half-life period and the amount of radiated energy were calculated.

In investigated oils the composition of aliphatic acids, the content of unsaponifiable matter, peroxide value, colour, the content of pigments from carotenoid group and chlorophylls were determined. These parameters have influence on photooxidation and decay of CL.

Our method of examination of decreasing chemiluminescence kinetics is an alternative to well known analytic methods and so far has not been used to determine the deterioration level of oils.

* Praca zrealizowana w ramach tematu badawczego nr 522-0604-0203 na UWM w Olsztynie.

Wstęp

Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-6 i n-3 uczestniczą w procesach biochemicznych i fizjologicznych zachodzących w organizmie człowieka. Są stosowane w leczeniu chorób układu krążenia, leczeniu mózgu i siatkówki oka, schorzeń skórnych, w kosmetyce itp. Odpowiednie spożycie zapobiega zaburzeniom gospodarki lipidowej w organizmie (Stołyhwo 1998, Gustone 2003, Ziemiński 1998, Socha 1994, Cichoń 1998).

Końcowe produkty utleniania lipidów zawierają węglowodory, aldehydy, ketony, estry, laktony, alkohole, etery i są odpowiedzialne za charakterystyczne cechy sensoryczne zjełczałych tłuszczów. Tworzą trwałe połączenia z białkiem i wykazują działanie toksyczne (Grys 1995).

Utlenianie niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) w olejach jest spowodowane przyłączeniem cząsteczki tlenu atmosferycznego do wiązań podwójnych.

Procesy te przebiegają wg rodnikowego mechanizmu autooksydacji (Kinter 1995, Bartosz 1995, Neeman i in. 1985). Zachodzą one wolno z powodu różnej multipletowości reagentów (Allen 2002). Powstające w procesie utleniania wodoroadtlenki są bardzo nietrwałe i mogą ulegać różnym przemianom. Procesy fotoutleniania są dużo szybsze, a różnice w reaktywności między kwasami są w przybliżeniu proporcjonalne do liczby wiązań podwójnych (Bartosz 2003, Sikorski 1996, Pieńkowska 2003). Istnieją przypuszczenia, że autooksydacja może być zainicjowana fotoutlenianiem (Bartosz 2003, Sikorski 1996).

NNKT nie absorbują promieniowania widzialnego, dlatego procesy fotoutleniania zachodzą w obecności fotosensybilizatorów. W olejach tłoczonych typowymi sensybilizatorami są chlorofile, feofityny, flawiny absorbujące promieniowanie widzialne i ulegające wzbudzeniu elektronowo-oscyłacyjnemu do stanu singletowego.

Cząsteczka wzbudzonego sensybilizatora może reagować z cząsteczką NNKT według dwóch mechanizmów, tj. bez wytwarzania rodników z powstawaniem tlenu singletowego i wg mechanizmu rodnikowego, który zapoczątkowuje reakcję autooksydacji (Sarna 1989, Bartosz 2003, Allen 2002, Krasnovsky 1979).

W olejach tłoczonych znajdują się również przeciwutleniacze jak karotenoidy, tokoferole, sterole, fenole itp., które opóźniają procesy auto- i fotoutleniania. To opóźnienie jest spowodowane oddziaływaniem wzbudzonego sensybilizatora z przeciwutleniaczem i ze wzbudzonym tlenem singletowym. Możliwe jest także w pewnych warunkach generowanie wzbudzonego tlenu singletowego w wyniku przenoszenia energii pomiędzy kompleksem przeciwutleniacza z sensybilizatorem i tlenem trypletowym. Przebieg tych procesów zależy od czasu życia i stężenia reagentów oraz środowiska (Moore i in. 1994, Truscott 1990, Sarna 1989, Krasnovsky 1979).

Chemiluminescencja (CL) towarzysząca procesom auto- i fotoutleniania występuje wówczas, gdy znaczna część energii reakcji chemicznej (entalpia) ulega

przekształceniu w energię wzbudzenia reagenta (produktu w stanie wzbudzonym), który z kolei emituje foton $h\nu$. Efektywna transformacja energii reakcji chemicznej w fotony czyli chemiluminescencja wymaga spełnienia odpowiednich kryteriów energetycznych i spektroskopowych. W jednym stadium reakcji powinna wydzielić się dostateczna porcja energii nie mniejsza od energii wypromieniowanego fotonu oraz wzbudzona cząsteczka produktu musi być w takim stanie, dla którego prawdopodobieństwo generowania elektronowego stanu wzbudzonego jest większe niż generowania produktów w stanie podstawowym. Taka duża energia wydziela się najczęściej w łańcuchowych reakcjach rodnikowych, a także w reakcjach utleniania – redukcji, które przebiegają według mechanizmu rodnikowego (Sławiński 1989).

W reakcjach występują silnie egzoergiczne akty rekombinacji wolnych rodników. Energia tych aktów jest równoważna energii fotonów w widzialnej i ultrafioletowej części widma. Emiterami są najczęściej związki organiczne bogate w łatwo ulegające wzbudzeniu chmury π -elektronowe, ketony (aldehydy) oraz tlen cząsteczkowy.

Natężenie CL, tj. liczba kwantów emitowana z jednostki objętości w jednostce czasu, zależy od szybkości reakcji tworzenia cząsteczek wzbudzonych oraz wydajności kwantowej cząsteczek wykazujących emisję (Sławiński 1989). Spontaniczna emisja może zachodzić jako fluorescencja, gdy multipletowość stanów o wyższej energii wynosi 1 (sparowane spiny elektronów) i jako fosforescencja (dwa elektrony o niesparowanych spinach). Jest to końcowe stadium CL bezpośredniej, w której produkt wzbudzony jest jednocześnie emitorem. Wydajne emitery CL powinny mieć nisko leżące poziomy energetyczne. Wartości wydajności kwantowej są zwykle większe od 0,1, a czas życia przejścia singlet – singlet jest rzędu 10^{-8} s (Sławiński 1989). Poziomy trypletowe są energetycznie bardziej dostępne, ponieważ leżą niżej niż singletowe. Dotychczasowe wyniki badań wykazały, że najczęściej spotykanymi emiternami są związki karbonylowe we wzbudzonych stanach singletowych i trypletowych oraz tlen molekularny i jego dimole (Sławiński i in. 1987).

Ogólna wydajność kwantowa CL z udziałem wymienionych wyżej cząsteczek zawiera się w granicach od 10^{-11} do 10^{-8} . Natężenie świecenia wynosi blisko 10^3 $h\nu/\text{mm}^2\cdot\text{s}$ i ma maksimum w obszarze czerwieni i bliskiej podczerwieni. Różnica energii rozerwanych i nowo powstałych wiązań równa się około 420 kJ/mol i jest wystarczająca do obsadzenia najniższych wzbudzonych stanów elektronowych powstałych związków, tj. ketonów (aldehydów) i tlenu molekularnego (Sławiński i in. 1987).

Indukowane światłem widzialnym reakcje fotoutleniania w olejach powodują pojawienie się ultrasłabej, sumarycznej, wolno zanikającej chemiluminescencji w szerokim zakresie widmowym, odpowiadającym czułości spektralnej detektora. Sumaryczną CL można uważać za test określający zaawansowanie procesu fotoutleniania w wybranych olejach roślinnych (Usuku i in. 1979, Pięnkowska 2003).

Zwiększenie natężenia CL, czas zaniku są: szybkość zaniku wprost proporcjonalne do stopnia zaawansowania procesu utleniania i zależą od składu kwasów tłuszczowych, zawartości sensybilizatorów oraz przeciwutleniaczy w olejach. Wydajność kwantowa wzbudzenia związków karbonylowych i tlenu singletowego jest bardzo mała. W procesach CL o dużej wydajności kwantowej uczestniczą duże organiczne molekuly mające łatwo polaryzowalne elektrony π , jak np. chlorofile, feofityny występujące w olejach tłoczonych. Obecność chlorofilu w olejach powoduje dużą wydajność przenoszenia energii z pierwotnie wzbudzonych związków karbonylowych do cząsteczek chlorofilu, jak też dużą wydajność luminescencji ze specyficznym widmem emisji z maksimum około 685 nm (Sławiński 1989). Natężenie chemiluminescencji zależy od czynników chemicznych, czyli szybkości powstawania wolnych rodników i szybkości dysproporcjonowania oraz od czynników fizycznych, czyli efektywności wzbudzenia określonej liczby trypletowych lub singletowych stanów wzbudzenia na jeden akt reakcji oraz wydajności promieniowania emitera,

Wstępne badania indukowanej UVA CL olejów naturalnych i bielonych (Murkowski i in. 2003, Pieńkowska 2003) wskazują, że fotoindukowana, ultrasłaba chemiluminescencja może posłużyć jako szybki nieinwazyjny test do określenia zawartości chlorofilu, co wiąże się ze stopniem dojrzałości nasion, a zatem i jakością olejów.

Oprócz indukowania chemiluminescencji promieniowaniem widzialnym i UVA, można stosować ozonowanie, sonikację (za pomocą ultradźwięków) oraz podgrzewanie (Murkowski i in. 1993).

Material i metody

Materiałem do badań były oleje tłoczone z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok), rzepaku podwójnie uszlachetnionego (*Brassica napus* L. odm. Jantar), nasion ogórecznika (*Borago officinalis* L.) i nasion żmijowca (*Echium plantagineum* L.) na prasie ślimakowej typu „Komet”, model CA/59, prod. Kruppa.

Skład kwasów tłuszczowych w badanych olejach oznaczono metodą chromatografii gazowej w aparacie Pay Unicam 4600 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) i komputerowym integratorem PU 4815.

Ogólną ilość substancji nie ulegającej zmydłaniu oznaczono wg Polskiej Normy PN-ISO 3596-2/1994. Karotenoidy i β -karoten oznaczono metodą opisaną przez Rutkowską (1981).

Barwniki chlorofilowe oznaczano metodą Niewiadomskiego i in. (1965), opisaną w JAOCS (CC 13 D 55). Zawartość feofityn wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez Niewiadomskiego i Bratkowską (1970).

Barwę olejów oznaczono spektrofotometrycznie zgodnie z Polską Normą PN-A86934/1995. Liczbę nadtlenkową oznaczono wg Polskiej Normy PN-ISO 3960/1996 i podano w jednostkach Lea.

Pomiar chemiluminescencji olejów wykonano bezpośrednio po wytłoczeniu i po sześciu miesiącach przechowywania w lodówce w temperaturze około 4°C.

Oleje naświetlano wykalibrowanym źródłem promieniowania elektromagnetycznego, lampą typu TL-140 W/0,5 Philips, dającą promieniowanie UV-A w zakresie od 315 do 400 nm, o natężeniu 72 W/m² (Pieńkowska 2003).

Chemiluminescencję olejów rejestrowano kamerą CCD „Night Owl” produkcji EG & G Berthold-Germany. Kamera posiada interfejs oraz program. Win Light LB 981, którego zadaniem jest sterowanie pracą kamery, archiwizacja i przetwarzanie danych. Informacja o schemacie układu do pomiaru luminescencji oraz sposób statystycznego opracowania wyników znajdują się w artykule tych samych autorów „Kinetyka zaniku chemiluminescencji w oleju wiesiołkowym i rzepakowym wywołanej promieniowaniem elektromagnetycznym (UV-A) i ozonowaniem”.

Próbki po naświetleniu przenoszono pod kamerę, która zliczała kwanty przez 16000 s, co dało dla każdej próbki oleju 25 punktów pomiarowych wartości natężenia CL w funkcji czasu. Wszystkie pomiary doświadczalne wykonano w tych samych warunkach.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań analitycznych

Do badań wybrano oleje, różniące się zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz ilością substancji nie ulegających zmydleniu. Skład kwasów tłuszczowych w wybranych olejach przedstawiono w tabeli 1.

Badany olej wiesiołkowy zawierał około 3,5 razy więcej kwasu linolowego (C_{18:2}) niż olej rzepakowy i około 5 razy więcej niż olej z nasion żmijowca. Zawartość kwasu α -linolenowego (C_{18:3}) w oleju rzepakowym była tego samego rzędu co kwasu γ -linolenowego (γ -C_{18:3}) w oleju wiesiołkowym. Większe ilości tych kwasów zawiera olej ogórecznikowy i z nasion żmijowca (tab. 1).

W skład (tłoczonych) surowych olejów roślinnych, poza triacyloglicerydami, acyloglicerydami częściowymi i fosfolipidami, wchodzi niewielkie ilości innych substancji, nazywanych substancjami nie ulegającymi zmydleniu (Sikorski 1994, Stołychowo 1992). Podstawowymi składnikami substancji niezmydlających są: karotenoidy, polifenole, tokoferole, sterole i estry steroli. Większość z wymienionych substancji charakteryzuje się właściwościami przeciwutleniającymi (tab. 2).

Na podstawie wartości liczby nadtlenkowej badane oleje spełniały wymogi stawiane świeżym olejom roślinnym. Zgodnie z Komisją Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO maksymalna dopuszczalna wartość liczby nadtlenkowej olejów spożywczych i farmaceutycznych nie powinna przekraczać 5 jednostek Lea.

Tabela 1

Zawartość kwasów tłuszczowych w olejach — *Composition of fatty acids in oils*

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i> $C_{m:n}$	Procentowa zawartość kwasów tłuszczowych w olejach <i>Percentage content of fatty acids in oils</i>			
	olej rzepakowy <i>rapeseed oil</i>	olej wiesiołkowy <i>evening primrose oil</i>	olej ogórecznikowy <i>borage oil</i>	olej z nasion zmiłowca <i>echium oil</i>
$C_{16:0}$	4,44 ± 0,02	5,81 ± 0,09	11,04 ± 0,09	7,75 ± 0,09
$C_{16:1}$	0,22 ± 0,09	0,08 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,15 ± 0,03
$C_{18:0}$	1,11 ± 0,02	1,71 ± 0,02	4,83 ± 0,03	4,23 ± 0,03
$C_{18:1}$	62,63 ± 0,02	5,43 ± 0,08	18,97 ± 0,05	16,04 ± 0,05
$C_{18:2}$	20,62 ± 0,09	76,08 ± 0,05	35,80 ± 0,08	15,52 ± 0,05
α - $C_{18:3}$	9,01 ± 0,02	0,15 ± 0,05	trace	31,75 ± 0,08
γ - $C_{18:3}$	–	9,51 ± 0,03	21,18 ± 0,04	10,70 ± 0,02
$C_{18:4}$	–	–	–	12,61 ± 0,02
$C_{20:0}$	0,38 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,31 ± 0,03	–
$C_{20:1}$	1,77 ± 0,01	0,09 ± 0,01	4,17 ± 0,29	–
$C_{20:2}$	trace	0,06 ± 0,01	trace	–
$C_{22:0}$	trace	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,02	–
$C_{22:1}$	0,16 ± 0,01	–	2,31 ± 0,16	0,71 ± 0,05

m — liczba atomów węgla — *number of carbon atom*n — liczba wiązań podwójnych — *number of double bonds*1 — $x \pm SD$ (SD — odchylenie standardowe przy 95% przedziale ufności dla $n = 5$) $x \pm SD$ (SD — standard deviation at 95% confidence level for $n = 5$)

Tabela 2

Wybrane substancje nie ulegające zmydleniu w badanych olejach

Selected unsaponifiable matter in investigated oils

Składniki <i>Components</i>	Olej rzepakowy <i>Rapeseed oil</i>	Olej wiesiołkowy <i>Evening primrose oil</i>	Olej ogórecznikowy <i>Borage oil</i>	Olej z nasion zmiłowca <i>Echium oil</i>
Substancje niezmydlające [%] <i>Unsaponifiable matter</i>	1,20 ± 0,3	0,90 ± 0,2	0,81 ± 0,2	1,09 ± 0,3
Karotenoidy [mg/100 g oleju] <i>Carotenoids [mg/100 g of oil]</i>	0,428 ± 0,02	0,418 ± 0,05	0,235 ± 0,02	0,210 ± 0,02
β -karoten [mg/100 g oleju]	0,295 ± 0,02	śląd — <i>trace</i>	śląd — <i>trace</i>	śląd — <i>trace</i>

Badane oleje różniły się zawartością barwników zielonych, np. olej rzepakowy w porównaniu z olejem wiesiołkowym zawierał około czterokrotnie więcej barwników chlorofilowych.

W pracach Niewiadomskiego i Bratkowskiej (1970) oraz Usuki i in. (1984) wykazano, że pod wpływem światła chlorofil znajdujący się w badanych olejach ulega rozpadowi do feofityny (tab. 3). Powszechnie uważa się, że obecność chlorofilu w olejach decyduje w znacznym stopniu o ich nietrwałości, ponieważ uczestniczą one w procesie fotoutlenienia kwasów tłuszczowych.

Tablica 3

Barwa, ilość feofityny i wartość liczby nadtlenkowej w badanych olejach
Colour, pheophytin and peroxide value in investigated oils

Olej <i>Oil</i>	Barwa <i>Colour</i> ($A_{442}+A_{668}$) \times 1000	Feofityna [mg/100 g] <i>Pheophytin</i>		Liczba nadtlenkowa <i>Peroxide value</i>
		a	b	
Rzepakowy — <i>Rapeseed</i>	1200 \pm 10	0,662 \pm 0,005	0,190 \pm 0,005	1,33 \pm 0,005
Zmijowiec — <i>Echium oil</i>	153 $0\pm$ 8	0,940 \pm 0,005	0,120 \pm 0,005	1,55 \pm 0,005
Wiesiołkowy — <i>Evening primrose</i>	340 \pm 6	0,120 \pm 0,005	0,021 \pm 0,005	2,00 \pm 0,006
Ogórecznikowy — <i>Borage oil</i>	414 \pm 6	0,312 \pm 0,005	–	2,15 \pm 0,006

Chemiluminescencja

Wszystkie testowane oleje napromieniowywano UV-A. Dla porównania do komory pomiarowej wstawiono próbki nie poddane procesom napromieniowania i potraktowano je jako próbki kontrolne.

Intensywność CL indukowanej UV-A (315–400 nm) zależy od zawartości barwników chlorofilowych i jest dużo niższa w oleju wiesiołkowym i ogórecznikowym. Kiedy brak koherentnego sprzężenia pomiędzy cząsteczkami wzbudzonymi a emitowanym polem promieniowania elektromagnetycznego, to wówczas zanik fotoindukowanej CL jest eksponencjalny (Sławiński 1989).

Kinetykę gaśnięcia CL opisano jako funkcję złożoną z dwóch funkcji wykładniczych. Takie dopasowanie do wyników doświadczalnych świadczy o reakcjach w stanie wzbudzonym, które towarzyszą gaśnięciu luminescencji oraz są dowodem na złożoność reakcji (Sławiński 1989). W tej metodzie zakłada się następującą postać funkcji:

$$I = c_2 \cdot \exp(b_2 t) + c_1 \cdot \exp(b_1 t) + a$$

gdzie:

I — natężenie CL, t — czas, a, b_1 , b_2 , c_1 , c_2 — wyznaczane parametry.

Pomimo że pierwsze kwanty rejestrowano po około 3 minutach (czasie potrzebnym do ustawienia badanych próbek pod kamerą) od naświetlania, metoda dopasowania krzywych teoretycznych do wyników pomiarowych umożliwia określenie stałej szybkości zaniku chemiluminescencji badanych olejów (k) oraz poda-

nie czasu połowicznego jej zaniku ($T_{1/2}$). W oleju rzepakowym i z nasion żmijowca można wyodrębnić dwa procesy: szybką luminescencję (F) po naświetlaniu i wolną (S). Stałe szybkości zaniku luminescencji procesów wolnych zależą od gatunku nasion, z którego wyłoczono oleje. Składowa szybka (F) zanika dwukrotnie szybciej w oleju z nasion rzepaku niż w oleju z nasion żmijowca (tab. 4 i 5).

Tabela 4

Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji (składowa szybka (F) i wolna (S)) w oleju tłoczonym z nasion rzepaku, po naświetlaniu (bezpośrednio po wyłoczeniu i przechowywany 6 miesięcy w temp. 4°C, druk pogrubiony) — *Kinetics parameters of the decay of photoinduced luminescence (fast decay component (F) and slow (S)) in rapeseed oil after irradiation (immediately after pressing and after 6 month storage at 4°C temperature, bold type)*

Czas naświetlania <i>Exposure time</i>	Natężenie początkowe <i>Initial intensity</i> I_0 [hv/mm ² s]	Czas połowicznego zaniku <i>Half-life time</i> $T_{1/2}$ [s]·10 ³	Stała szybkości zaniku <i>Constancy of decay rate</i> k [1/s]·10 ⁻⁵	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> [hv/mm ²]·10 ⁶
	Olej bezpośrednio po wyłoczeniu, przechowywany (druk pogrubiony) składowa szybka (F) i wolna (S) <i>Oil after pressing, stored (bold type) fast component (F) and slow (S)</i>			
600 s	98-F	1,33	51,81	0,19
	135-F	1,44	48,04	0,28
	74-S	49,94;	1,38	5,36
900 s	83-S	26,99	2,56	3,22
	110-F	1,47	47,03	0,23
	87-S	43,90	1,57	5,51
1800 s	156-F	1,43	48,20	0,32
	177-F	1,35	51,31	0,34
	162-S	59,11	1,17	13,80
3600 s	152-S	37,46	1,85	8,20
	187-F	1,32	52,35	0,36
	210-F	1,22	56,50	0,37
	191-S	45,30	1,53	12,40
	180-S	28,43	2,44	7,37

Wiele danych doświadczalnych potwierdza fakt powstawania wzbudzonego tlenu singletowego (¹O₂*) w reakcjach utleniania lipidów (Sarna 1989, Sławiński 1989). Wykazano generowanie dimoli w reakcjach ciemnych, jak i fotoindukowanych (Sławiński 1989). Wykrycie i oszacowanie stężenia grup karbonylowych jest trudniejsze ze względu na małą wartość stałej szybkości relaksacji radiacyjnej i dominujące procesy wygaszania przez tlen trypletowy i inne związki o charakterze

wygaszacza, które występują w olejach. Chlorofil w olejach jest wydajnym i selektywnym akceptorem energii stanów trypletowych, wzbudzonych związków karbonylowych, który ponadto charakteryzuje się dużą wydajnością fluorescencji oraz małą energią wzbudzonego stanu singletowego (Sarna 1989, Sławiński 1989). Prawdopodobieństwo generowania związków karbonylowych we wzbudzonym pierwszym stanie trypletowym jako produktów samoutleniania lipidów jest większe niż w stanach singletowych. Cząsteczki aldehydów traktujemy jako donory energii o wystarczająco długim czasie życia i dlatego przenoszenie energii na chlorofil skutecznie konkuruje z procesami gaszenia. Chlorofilowe barwniki uważa się za związki chemiluminogenne, ponieważ reakcje dysmutacji rodników nadtlenkowych

Tabela 5
Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji (składowa szybka (F) i wolna (S)) w oleju tłoczonym z nasion żmijowca, po naświetlaniu (bezpośrednio po wyłoczeniu i przechowywany 6 miesięcy w temp. 4°C, druk pogrubiony) — *Kinetic parameters of the decay of photoinduced luminescence (fast decay component (F) and slow (S) in echium oil after irradiation (immediately after pressing and after 6 month storing at 4°C temperature (bold type)*

Czas naświetlania <i>Exposure time</i>	Natężenie początkowe <i>Initial intensity</i> I ₀ [hv/mm ² s]	Czas połowicznego zaniku <i>Half-life time</i> T _{1/2} [s]·10 ³	Stała szybkości zaniku <i>Constancy of decay rate</i> k[1/s]·10 ⁻⁵	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> [hv/mm ²]·10 ⁶
Olej bezpośrednio po wyłoczeniu, przechowywany(druk pogrubiony) składowa szybka (F) i wolna (S) <i>Oil after pressing, stored (bold type) fast component (F) and slow (S)</i>				
600 s	726-F	2,36	29,35	2,47
	499-F	2,50	27,70	1,80
	433-S	14,22	4,87	8,87
	292-S	14,46	4,79	6,09
900 s	706-F	2,93	23,65	2,98
	538-F	3,21	21,55	2,49
	346-S	18,30	3,64	9,49
	253-S	19,04	3,79	6,68
1800 s	796-F	2,91	23,75	3,35
	717-F	3,83	18,06	3,97
	367-S	20,31	3,41	10,70
	202-S	35,00	1,98	10,21
3600 s	597-F	3,74	18,53	3,22
	778-F	4,39	15,75	4,93
	203-S	27,70	2,50	8,11
	183-S	30,81	2,24	8,14

wytwarzają związki w stanie wzbudzenia, których energia jest przenoszona na silnie fluoryzujący chlorofil. Wzmocniona obecnością chlorofilu chemiluminescencja występuje wyraźnie w oleju rzepakowym i z nasion żmijowca. Ilość tego związku w olejach z nasion ogórecznika i wiesiołka jest zbyt mała, aby to wzmocnienie można było wyodrębnić dopasowując funkcje wykładnicze do punktów pomiarowych. Powierzchnie pod krzywymi wygaszania są proporcjonalne do wydajności wszystkich procesów, czyli ilości energii wypromieniowanej.

W olejach: rzepakowym i z nasion żmijowca można wyodrębnić dwie składowe (szybką F i wolną S). Składowa szybka F jest związana z obecnością chlorofilu, a składowa wolna S to już czysta chemiluminescencja. W procesie wolnym, w przypadku oleju rzepakowego wyemitowano więcej energii niż w procesie szybkim (tab. 4). Większe powierzchnie w procesie wolnym wskazują, że utlenianie według mechanizmu rodnikowego jest bardziej intensywne niż emisja związana z obecnością chlorofilu i raz zainicjowane przez naświetlanie zachodzi nawet w ciemności. W przypadku oleju z nasion żmijowca prawie ośmio- i dziesięciokrotnie większa powierzchnia w procesie szybkim, niż w oleju rzepakowym, świadczy o dużej zawartości barwników zielonych.

Natężenie początkowe CL po sześciomiesięcznym przechowywaniu w lodówce oleju wiesiołkowego (tab. 6) wzrosło dwukrotnie, co świadczy o procesie autooksydacji podczas przechowywania. Ten proces powoduje prawie dwukrotnie większą

Tabela 6

Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji w oleju tłoczonym z nasion wiesiołka po naświetlaniu (bezpośrednio po wytłoczeniu i przechowywany 6 miesięcy w temp. 4°C, druk pogrubiony) — *Kinetic parameters of the decay of the photoinduced luminescence in evening primrose oil after irradiation (immediately after pressing and after 6 month storing at 4°C temperature (bold type))*

Czas naświetlania <i>Exposure time</i>	Natężenie początkowe <i>Initial intensity</i> I_0 [hv/mm ² s]	Czas połowicznego zaniku <i>Half-life time</i> $T_{1/2}$ [s]·10 ³	Stała szybkości zaniku <i>Constancy of decay rate</i> k [1/s]·10 ⁻⁵	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> [hv/mm ²]·10 ⁶
Olej bezpośrednio po wytłoczeniu, przechowywany (druk pogrubiony) <i>Oil after pressing, stored (bold type)</i>				
300 s	18	9,42	7,35	0,24
600 s	22	8,30	8,27	0,27
900 s	23	7,44	9,30	0,25
	42	7,47	9,27	0,45
1800 s	29	15,83	4,37	0,65
	35	25,37	2,73	1,28
3600 s	41	12,46	5,56	0,73
	72	10,90	6,35	1,13

Wpływ przechowywania wybranych olejów roślinnych na kinetykę ... 319

zawartość kwasów tłuszczowych z podwójnymi wiązaniami niż w oleju z nasion ogórecznika, jak i dwukrotnie niższą ilość tokoferoli (Rached 2000, Pokorny 1987).

Natężenie początkowe oraz pozostałe parametry po sześciomiesięcznym przechowywaniu oleju ogórecznikowego w lodówce (tab. 7) nie różnią się istotnie. Powyższe wartości świadczą o tym, że proces autooksydacji przebiegał wolno i olej ogórecznikowy jest bardziej stabilny niż wiesiołkowy, ponadto zawiera dwukrotnie więcej tokoferoli niż olej z nasion wiesiołka.

W wybranych olejach roślinnych natężenie CL zależy od gatunku nasion z których olej został wytłoczony. W oleju wiesiołkowym kształtuje się na poziomie $41 \text{ hv/mm}^2 \cdot \text{s}$, a w oleju ogórecznikowym jest około 7 razy wyższe. W olejach zawierających chlorofil w takich ilościach, że obserwujemy wyraźną CL sensybilizowaną jak, np. w oleju z nasion rzepaku i żmijowca, natężenie składowej szybkiej związanej z emisją chlorofilu wynosi odpowiednio: $201 \text{ hv/mm}^2 \cdot \text{s}$ dla oleju rzepakowego i $778 \text{ hv/mm}^2 \cdot \text{s}$ dla oleju z nasion żmijowca.

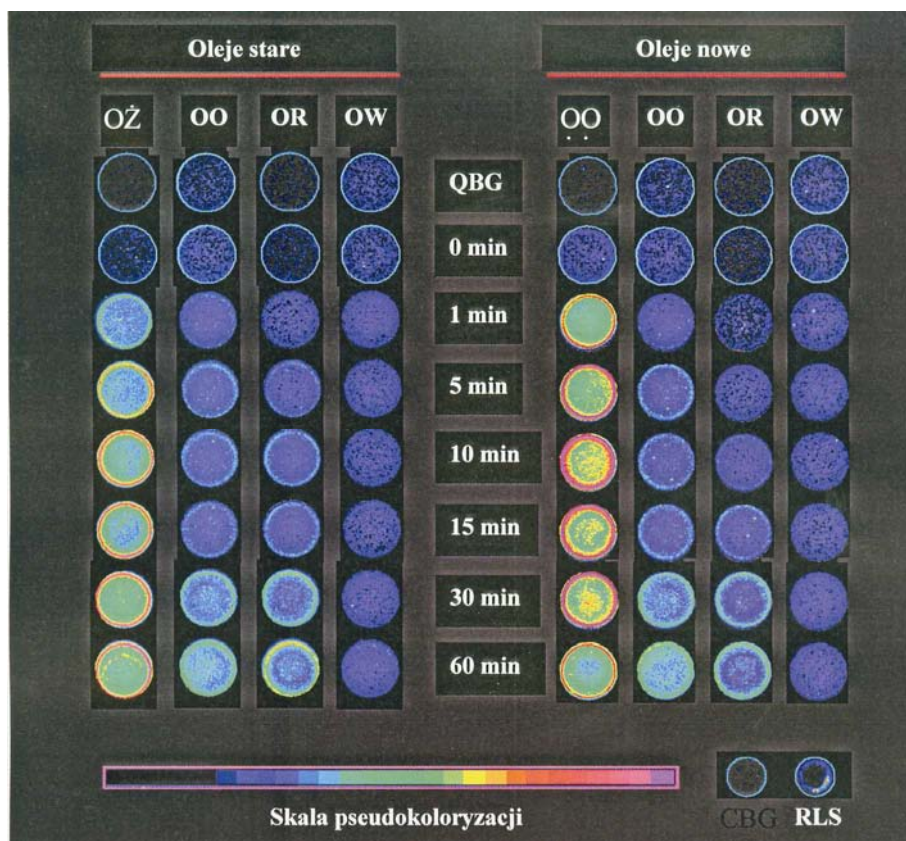
Tabela 7

Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji w oleju tłoczonym z nasion ogórecznika, po naświetlaniu (bezpośrednio po wytłoczeniu i przechowywany 6 miesięcy w temp. 4°C , druk pogrubiony) — *Kinetic parameters of the decay of photoinduced luminescence in borage oil after irradiation (immediately after pressing and after 6 month storing at 4°C temperature (bold type)*

Czas naświetlania <i>Exposure time</i>	Natężenie początkowe <i>Initial intensity</i> $I_0 [\text{hv/mm}^2 \cdot \text{s}]$	Czas połowicznego zaniku <i>Half-life time</i> $T_{1/2} [\text{s}] \cdot 10^3$	Stała szybkości zaniku <i>Constancy of decay rate</i> $k [1/\text{s}] \cdot 10^{-5}$	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> $[\text{hv/mm}^2] \cdot 10^6$
Olej bezpośrednio po wytłoczeniu, przechowywany (druk pogrubiony) <i>Oil after pressing, stored (bold type)</i>				
300 s	101 98	10,16 11,16	6,28 6,20	1,48 1,58
600 s	115 118	10,66 11,87	6,50 5,83	1,77 2,02
900 s	130 119	10,82 9,35	6,40 7,41	2,02 1,60
1800 s	202 202	9,39 9,05	7,38 7,65	2,74 2,63
3600 s	285 270	8,27 8,14	8,37 8,51	3,40 3,17

Obrazowanie

Otrzymany obraz jest czarno-biały, gdyż kamera CCD nie posiada możliwości analizy barw obiektu. Barwy przedstawione są jako stopnie szarości obrazu (skala 16-bitowa). Dla lepszej wizualizacji różnic w natężeniu emisji promieniowania w kolejnych etapach doświadczenia przeprowadza się pseudokoloryzację. Obrazy przed pseudokoloryzacją można poddać powierzchniowej lub liniowej analizie rozkładu natężenia promieniowania. W ten sposób uzyskano wykresy zależności zaniku chemiluminescencji badanych próbek olejowych od czasu.



Rys. 1. Obraz zaniku chemiluminescencji badanych olejów po naświetlaniu UV-A (na tle QBG podano czasy naświetlania). OŻ – olej z nasion żmijowca, OO – olej z nasion ogórecznika, OR – olej z nasion rzepaku, OW – olej z nasion wiesiołka, QBG – tło naczynia pomiarowego, CBG – tło kamery, RLS – standard radioluminescencyjny, skala pseudokoloryzacji – barwa fioletowa odpowiada natężeniu $1500 \text{ hv/mm}^2\cdot\text{s}$ — Images of CL chemiluminescence of oils after UV-A irradiation (QBG – time of irradiation). OŻ – echium oil, OO – borage oil, OR – rapeseed oil, OW – evening primrose oil, QBG – cuvettes background, CBG – camera background, RLS – radioluminescence standard, pseudo colour scale – violet colour corresponds with $1500 \text{ hv/mm}^2\cdot\text{s}$ intensity

Wnioski

1. W układach wieloskładnikowych, jakimi są oleje, utlenianie ma charakter rodnikowy. Pomiar fotochemiluminescencji i proponowane opracowanie wyników ułatwiają jakościową i ilościową analizę kinetyki zaniku tych procesów oraz uwzględniają wpływ barwników chlorofilowo – karotenoidowych na przebieg chemiluminescencji sensybilizowanej.
2. W olejach rzepakowym i z nasion żmijowca wyodrębniono dwa procesy: szybki (F) i wolny (S). W procesie wolnym wyemitowane zostało od 3 do 50 razy więcej energii niż w procesie szybkim. Większa ilość energii wyemitowanej w procesie wolnym świadczy o tym, że raz zainicjowana CL przez UV–A w olejach, przebiega bez obecności czynnika wzbudzającego (światła i promieniowania UV).
3. Obrazowanie emisji umożliwia obserwację fotochemiluminescencji w badanych olejach, gdy podstawowymi emiterami są barwniki chlorofilowe.
4. Proponowana metoda pomiaru kinetyki zaniku chemiluminescencji za pomocą kamery CCD stanowi alternatywę wobec popularnie stosowanych metod analitycznych i nie jest stosowana tradycyjnie do oceny stopnia deterioracji olejów podczas ich przechowywania.

Literatura

- Allen R.C. 2002. Molecular oxygen (O₂): Reactivity and Luminescence. In: Bioluminescence & Chemiluminescence Progress, Singapore: 223-232.
- Bartosz G. 2003. Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.
- Cichoń R. 1998. Kwasy tłuszczowe n-3 i n-6 w fizjologii i patologii człowieka. Symposium „Oleje z nasion wiesiołka i inne oleje zawierające kwasy tłuszczowe n-6 i n-3 w profilaktyce i terapii”, red. A. Stołyhwo, Sulejów 15-16 maja: 116-124.
- Grys S. 1998. Patologiczne efekty rozkojarzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych rodzin n-6 i n-3 w organizmie człowieka. Symposium „Oleje z nasion wiesiołka i inne oleje zawierające kwasy tłuszczowe n-6 i n-3 w profilaktyce i terapii”, red. A. Stołyhwo, Sulejów 15-16 maja: 89-108.
- Gunstone F.D. 2003. Lipids for functional food & nutraceuticals. Vol. 13. The Oily Press Lipids Library.
- Kinter M. 1995. Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. J. of Chromatography, B, 671: 223-226.
- Krasnovsky A.A.Jr. 1979. Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solution. Photochem. Photobiol., 29: 29-36.
- Moore T.A., Gust D., Moore A.L. 1994. Carotenoids: nature's unique pigments for light and energy processing. Pure Appl. Chem., 66: 1033-1040.

- Murkowski A., Skórska E. 1993. A detection set for measurements of ultraweak chemiluminescence of food products. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 399: 155-158.
- Murkowski A., Skórska E. 2003. Zastosowanie metod chemiluminescencyjnych do badania procesów utleniania olejów roślinnych. *Acta Agrophysica. Zastosowanie fizyki w naukach rolniczych część II. Rozprawy i Monografie*, 93: 55-65.
- Neeman, J.D. 1985. Induced Chemiluminescence of oxidized fatty acids and oils. *Lipids*, 20.11: 729-734.
- Niewiadomski H., Bratkowska I. 1970. The influence of the auto oxidation of rapeseed oil on the decomposition of pigments of chlorophylls grup. *Zesz. Probl. Nauk. Rol.*, 91: 207-211.
- Pieńkowska H. 2003. Fizyko-chemiczne badania kinetyki utleniania olejów wiesiołkowego, ogórecznikowego i rzepakowego. Monografia nr 76, Wyd. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: 1-100.
- PN-ISO 3596-2.1994. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie substancji niezmydlających. Szybka metoda ekstrakcji heksanem.
- PN-A 869 34/1995. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Spektrofotometryczne oznaczanie barwy.
- PN-ISO 3960/1996. Oleje oraz tłuszcze zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej.
- Pokorny J. 1987. Major factors affecting the autooxidation of lipids. In: *Autooxidation of unsaturated lipids*. E.W.S. Chan. Academic Press, London, 141-198.
- Rashed A.M. 2000. Studia nad przemianami lipidów podczas dojrzewania i przerobu nasion wiesiołka i ogórecznika. Praca doktorska UWM Olsztyn.
- Rutkowska U. 1981. Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej olejów. PZWL, Warszawa.
- Sikorski E. 1996. Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa.
- Sarna T. 1989. Udział tlenu singletowego i wolnych rodników w reakcjach fotouczulnych i zjawiskach fotodynamicznych. *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, 14 (1): 5-30.
- Sławińska D., Górski Z., Sławiński J. 1998. Chemiluminescence imaging of oxidative changes in plant food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 7/48 (2S): 67-72.
- Sławiński J., Rajfur Z., Wierzuchowska D. 1987. Wykorzystanie ultrasłabej luminescencji w medycynie. *Post. Fiz. Med.*, 22 (1): 5-33.
- Sławiński J. 1989. Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych. W: *Biospektroskopia* pod red. J. Twardowskiego. PWN, Warszawa t. 3: 107-206.
- Socha J. 1994. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe a rozwój ośrodkowego układu nerwowego u niemowląt. I Krajowy Kongres Żywność, Żywnienie i Zdrowie. Warszawa, 30 maja: 45-48.
- Stołyhwo A. 1992. Technologia pozyskiwania i główne składniki oleju z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok). I Sympozjum „Olej z nasion wiesiołka w profilaktyce i terapii”. Łódź 9-10.X: 22-39.
- Truscott T.G. 1990. The photophysics & photochemistry of carotenoids. *J. Photochem. Photobiol.*, B: Biol. 6: 359-371.
- Usaki R., Endo J., Kaneda T. 1984. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the oxidation of edible oils. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 991-994.
- Zadernowski R., Sosulski F. 1978. Composition of total lipids in rapeseed. *JAOCS*, 55, 12: 870-872.
- Ziemiański S. 1998. Fizjologiczna rola kwasów tłuszczowych n-6 i n-3 w ustroju człowieka ze szczególnym uwzględnieniem profilaktyki cywilizacyjnych chorób metabolicznych. Sympozjum „Oleje z nasion wiesiołka i inne oleje zawierające kwasy tłuszczowe n-6 i n-3 w profilaktyce i terapii”, red. A. Stołyhwo, Sulejów 15-16 maja: 11-20.