

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

Kinetyka zaniku chemiluminescencji w oleju wiesiołkowym i rzepakowym wywołanej promieniowaniem elektromagnetycznym (UV-A) i ozonowaniem*

**Kinetics of the decreasing chemiluminescence in oils from seeds
of evening primrose and rape induced with electromagnetic radiation
(UV-A) and ozonization**

Słowa kluczowe: olej wiesiołkowy, olej rzepakowy, liczba nadtlenkowa, chemiluminescencja, obrazowanie

Badano wpływ napromieniowania w zakresie UV-A (315–400 nm) oraz ozonowania na dynamikę zanikającej chemiluminescencji w oleju wiesiołkowym i rzepakowym. Określono charakter zaniku chemiluminescencji. W celu umożliwienia interpretacji zachodzących zjawisk, oznaczono w badanych olejach skład kwasów tłuszczowych, zawartość substancji niezmydlącej, liczbę nadtlenkową, barwę, zawartość barwników z grupy karotenoidów i chlorofili oraz zawartość przeciwutleniaczy: tokoferoli, polifenoli i steroli.

Key words: evening primrose oil, rapeseed oil, peroxide value, chemiluminescence, imaging

Influence of electromagnetic irradiation of UV-A (315–400 nm) and ozonization on the kinetics of decreasing luminescence in oils from seeds of evening primrose and rapeseed was examined. The character of the decay of chemiluminescence (CL) was determined. The physicochemical parameters of oils i.e. acid value, content of unsaponifiable matter, peroxide value, color, content of pigments from carotenoid and chlorophyll groups and content of antioxidants i.e. tocopherols, polyphenols and sterols were also determined.

The following regularities were observed:

- Decay rate constants of CL remain of the same order of value, i.e. they are independent of the irradiation time.
- The CL process is being continued for a longer time after irradiation (slow process).
- The fast component is related to the presence of chlorophyll pigments. The ozonation process increases the number of radicals in samples and it has a substantial influence on the CL intensity value and on the parameters of CL decay kinetics.

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

Wstęp

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe w olejach roślinnych ulegają przemianom biochemicznym i chemicznym w obecności tlenu atmosferycznego (Kinter 1995). Zgodnie z poglądami większości badaczy (Loeliger i Saucy 1984, Koneda i in. 1987, Usuki i in. 1979, Sławińska i in. 1998, Szterk i Lewicki 2009) ultrasłaba luminescencja jest związana z reakcjami utleniania lipidów, które przebiegają według procesu wolnorodnikowego. Intensywność ultrasłabej luminescencji jest największa w przypadku terminacji rodników nadtlenkowych, ze względu na wysoką wydajność kwantową reakcji (Sławiński i in. 1987). Energia, która wzbudza produkty utleniania wydziela się podczas szybkiego rozpadu nietrwałego nadtlenu i wynosi około 420 kJ/mol. Energia ta wystarczy do obsadzenia najniższego wzbudzonego stanu elektronowego powstałych związków: aldehydów i tlenu molekularnego, co można zapisać równaniem:



Podczas utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych powstają różne typy produktów utleniania (Kinter 1995), które ulegają rozkładowi, a więc wydziela się wystarczająca ilość energii do wzbudzenia elektronowego produktów ich rozpadu. Rozkład nietrwałej cząsteczki nadtlenu zachodzi z szybkością około 10^{-11} s, w jednym akcie. Podstawowymi emiterami są produkty rozpadu nadtlenu i molekularny tlen singletowy (Sławiński i in. 1987).

Sumaryczne natężenie chemiluminescencji zależy od czynników chemicznych: szybkości powstawania wolnych rodników i szybkości rozpadu nadtlenu oraz od czynników fizycznych: efektywności wzbudzenia (10^{-3} – 10^{-2}) i wydajności emitera (10^{-5} – 10^{-3}). Liczba kwantów powstająca w każdym akcie reakcji jest bardzo mała i wynosi około 10^{-8} – 10^{-5} fotonów/mm²·s (Sławiński 1987). W badanych olejach znajduje się wydajnie fluoryzujący związek — barwnik chlorofilowy, który działa jako akceptor energii wzbudzenia elektronowego. Istnieje duże prawdopodobieństwo przeniesienia energii z pierwotnych produktów wzbudzenia na akceptor według mechanizmu rezonansowego Forstera lub mechanizmu wymiany Dexter'a, co można przedstawić równaniem:



gdzie:

P^* — wzbudzony związek rozkładu produktu utleniania,

A — akceptor energii wzbudzenia elektronowego rozpadu produktów utleniania,

k_{ET} — stała szybkości przekazywania energii wzbudzenia,

k_{FA} — stała szybkości fluorescencji akceptora,

$h\nu_{\text{A}}$ — wypromieniowana energia fluorescencji akceptora.

Następuje wówczas efekt wzmocnienia chemiluminescencji w wyniku emisji promieniowania elektromagnetycznego akceptora A. To wzmocnienie można wyrazić zależnością:

$$I_A \sim (10 - 10^3) I_P$$

gdzie:

I_A — natężenie fluorescencji akceptora,

I_P — natężenie chemiluminescencji utleniania lipidów.

Taki proces nazywamy chemiluminescencją aktywowaną lub sensybilizowaną. Inhibitory, które zmiatają rodniki, wpływają na wypadkowe natężenie, które można przedstawić równaniem:

$$I_{PA} = \eta_P [P^*] + \eta_A [A^*] = (\eta_P + \eta_A) \eta_P^{wzb} W$$

gdzie:

I_{PA} — natężenie wypadkowe chemiluminescencji,

W — szybkość reakcji generowania wzbudzonych produktów P^* rozkładu,

η_A — wydajność kwantowa luminescencji akceptora,

η_P — wydajność kwantowa luminescencji produktów rozkładu,

η_P^{wzb} — wydajność kwantowa wzbudzania produktów rozkładu.

Indukowana chemiluminescencja jest efektem działania jakiegoś czynnika zewnętrznego, jak np. napromieniowanie falami elektromagnetycznymi czy też ozonowanie.

Z badań indukowanej chemiluminescencji można wyciągnąć wnioski o procesach wolnorodnikowych i obecności barwników chlorofilowych czy też przeciwutleniaczy. Zmiana natężenia oraz szybkość zaniku chemiluminescencji jest doskonałym nośnikiem informacji o procesach zachodzących w badanych olejach. Intensywność świecenia produktów utleniania kwasów tłuszczowych ma swoje maksimum w obszarze czerwieni i bliskiej podczerwieni oraz zależy od zawartości barwników chlorofilowych, które wykazują dużą wydajność luminescencji z maksimum emisji około 685 nm (Cadenas i Siest 1984).

Materiały i metody

Materiałem do badań były oleje tłoczone z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* H.) i rzepaku podwójnie uszlachetnionego (*Brassica napus* L. odm. Jantar) na prasie ślimakowej typu „Komet”, model CA/59, produkcji 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. Estry metylowe kwasów tłuszczowych przygotowywano według metody Peiskera w modyfikacji Zadernowskiego i Sosulskiego (1978). Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej odchyłeń standardowych wielkości bezwzględnych. Opracowując

wyniki korzystano z publikacji Stanisza (1998). Istotność statystyczną różnic na poziomie ufności 0,05 w stosunku do wartości otrzymanych szacowano za pomocą testu t-Studenta. Wykonano obliczenia statystyczne dla pięciu pomiarów.

Oznaczanie tokoferoli wykonano zgodnie z zaleceniami zawartymi w katalogu Supelco Chromatography Products. W celu ilościowego oznaczenia tokoferoli odważano 0,8 g oleju do kolby miarowej o pojemności 10 cm³ i uzupełniano do kreski heksanem. Tak przygotowany roztwór oleju w ilości 20 µl наносono na kolumnę chromatograficzną o średnicy wewnętrznej 4 mm, długość 0,25 m, wypełnienie Lichrospher Si 100 o średnicy ziaren 10 µm firmy Merck.

Rozdział chromatograficzny badanych próbek przeprowadzono metodą HPLC na aparacie firmy Hewlett-Packard stosując następujące warunki rozdziału: faza ruchoma — 0,35% alkohol n-amyłowy I-rzędowy w heksanie, przepływ fazy ruchomej 1,8 cm³/min, detektor spektrofotometryczny UV firmy Hewlett-Packard z kuetwą przepływową o objętości 7 µl, pomiar przy długości fali 295 nm. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w warunkach izokratycznych. Identyfikację przeprowadzono przez porównanie czasów retencji pików badanych próbek z wzorcami. Wzorcami ilościowymi były tokoferole o czystości cz.d.a., pochodzące z firmy Sigma i Merck.

Oznaczanie polifenoli w oleju surowym wykonano według metody opisanej przez Chimi i Cillard (1994). 50 g oleju rozpuszczano w 100 cm³ i wytrząsano 4-krotnie po 3 minuty z 50 cm³ 60% alkoholu metylowego. Połączone ekstrakty alkoholowe zagęszczano do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika. Pozostałość rozpuszczano w 10 cm³ 80% metanolu. Związki fenolowe oznaczano metodą kolorymetryczną stosując do wywołania reakcji barwnej odczynnik Folina-Ciocalteus (rozcieńczony wodą w stosunku 1 : 2 (v/v) (AOAC, Official Methods of Analysis the Association of Official Analytical Chemists, 1984).

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

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

Liczbę nadtlenkową oznaczono wg Polskiej Normy PN-ISO 3960/1996 i podano w jednostkach Lea. Oleje tłoczone bielono dodając 4% ziemi bielącej do oleju podgrzanego do temperatury 40°C. Po 10 minutach ziemię bielącą usunięto przez odwirowanie na wirówce typ MPW-340.

W oznaczeniach analitycznych wg PN uwzględniono średnią arytmetyczną wyników co najmniej trzech pomiarów równoległych oznaczeń, gdy różnica między nimi nie przekraczała wartości podanych w metodykach.

Oleje napromieniowywano w ciągu 1 i 3 godzin wykalibrowanym źródłem promieniowania elektromagnetycznego, lampą typu TL-140W/05 Philips, dającą

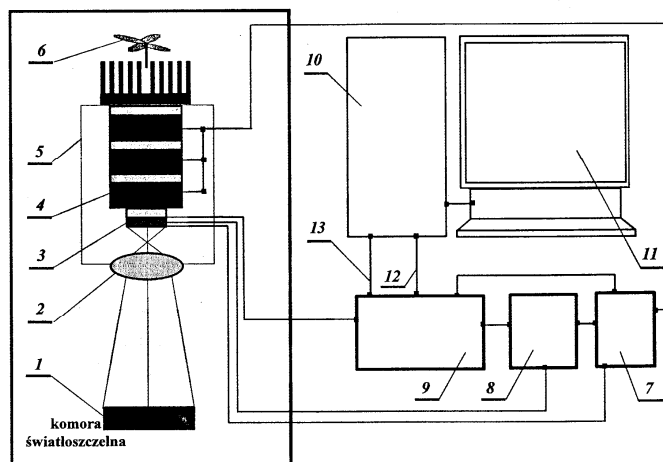
promieniowanie UV-A w zakresie od 315 do 400 nm, o natężeniu 72 W/m^2 . Pomiar natężenia napromieniowania wykonano radiometrem PRC Krochman GMBH z głowicą Kopp & Zonen.

Oleje ozonowano w przepływowej komorze w ciągu 15 min. Źródłem ozonu był ozonizator typu IMPO-24, produkcji INCO, Warszawa, o wydajności około 30 mg ozonu/m^3 .

Barwę ogólną naturalnych i bielonych olejów oznaczono mierząc wartości absorbancji rozcieńczonych próbek olejów w czterochlorku węgla, przy długości fali $\lambda = 442 \text{ nm}$, charakterystycznej dla grupy barwników karotenoidowych, i przy długości $\lambda = 668 \text{ nm}$, charakterystycznej dla grupy barwników chlorofilowych. Otrzymane wartości zsumowano i pomnożono przez 1000, zgodnie z PN-A86934/1995.

Ultrafioletową luminescencję olejów rejestrowano kamerą CCD Night Owl produkcji EG & G Berthold. Kamera posiada interfejs oraz program Win Light LB 981, którego zadaniem jest sterowanie pracą kamery, archiwizacja i przetwarzanie danych. Schemat układu do pomiaru luminescencji przedstawia rys. 1.

Kamera CCD jest detektorem obrazującym, wyposażonym w wolno skanującą matrycę światłoczułą „back illumination”, uczuloną na promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie od 200 do 1100 nm, o rozdzielczości 512×512 punktów. Detektor jest chłodzony wielowarstwowym powietrznie chłodzonym elementem Peltier'a do temperatury około 223 K. Rozwiązanie to pozwala uzyskać mały prąd ciemny. Obserwowany obiekt jest rzutowany na matrycę CCD przez 25 mm obiektyw o jasności 0,95. Czas tworzenia obrazu można dobierać od milisekund do 24 godzin. Kamera zamontowana jest wewnątrz ciemnej komory pomiarowej na programowo sterowanej podstawie pozwalającej na zmianę odległości kamery od obiektu i automatyczną regulację ostrości obrazu. Kamera współpracuje z komputerem PC Pentium 120, wyposażonym w 32 MB RAM poprzez specjalny szybki, szeregowy interfejs transmisji obrazu i standardowy interfejs RS 232 do sterowania elektroniką kamery, podstawą, oświetleniem i portem automatyki. Praca omówionego układu odbywa się pod kontrolą programu WinLight, pracującego w systemie Windows 3.11. Kamera CCD jest urządzeniem o potencjalnie szerokim zastosowaniu ze względu na wysoką czułość, rozdzielczość powierzchniową i gromadzenie sygnału. W pracy zarejestrowaliśmy fotochemiluminescencję oraz efekt działania ozonu.



Rys. 1. Schemat budowy kamery CCD — *Schema of camera CCD*

1 – obserwowany obiekt — *sample*; 2 – optyka kamery — *lens*; 3 – matryca CCD — *CCD sensor*; 4 – elementy Peltiera — *thermoelectric Peltier*; 5 – kamera — *camera*; 6 – wentylator — *ventilator*; 7 – zasilacz — *power supply*; 8 – termostat — *thermostat*; 9 – elektronika kamery — *camera control and interfaces*; 10 – komputer — *computer*; 11 – monitor — *color screen*; 12 – łącze sterowania — *data of camera transmission*; 13 – łącze transmisji obrazu — *image signals transmission*

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań analitycznych

Do badań wybrano oleje różniące się zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz ilością substancji niezmydlających. Skład kwasów tłuszczowych w oleju wiesiołkowym i rzepakowym przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Skład kwasów tłuszczowych w olejach — *Fatty acids composition in oils*

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Olej wiesiołkowy <i>Evening primrose oil</i>	Olej rzepakowy <i>Rapeseed oil</i>
C _{16:0}	5,81 ± 0,9	4,44 ± 0,2
C _{16:1}	0,08 ± 0,03	0,22 ± 0,09
C _{18:0}	1,71 ± 0,2	1,11 ± 0,2
C _{18:1}	5,43 ± 0,8	62,63 ± 2,0
C _{18:2}	76,08 ± 1,5	20,62 ± 0,9
C _{18:3}	0,15 ± 0,05	9,01 ± 0,2
γ-C _{18:3}	9,51 ± 0,3	–

Badany olej wiesiołkowy zawierał 3,5 razy więcej kwasu linolowego ($C_{18:2}$) niż olej rzepakowy. 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.

W skład (tłoczonych) surowych olejów roślinnych, poza triacyloglicerydami, acyloglicerydami częściowymi i fosfolipidami, wchodzi niewielkie ilości innych substancji, nazywanych substancjami niezmydlającymi (Sikorski 1994, Stołyhwo 1992a). Podstawowymi składnikami substancji niezmydlających są: karotenoidy, polifenole, tokoferole, sterole i estry steroli. Większość z wymienionych substancji charakteryzuje się właściwościami przeciwutleniającymi (Yanishlieva-Maslarowa 1984, Mimuro i Katoh 1991, Cillard i in. 1980, Bartosz 1995, Stołyhwo 1992b). W badanych olejach surowych poziom substancji niezmydlających wynosił w oleju rzepakowym 1,2%, wiesiołkowym 0,9% (tab. 2).

Na podstawie wartości liczby nadtlenkowej, oba 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. Proces bielenia nieznacznie zwiększał ilość wolnych kwasów tłuszczowych, przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości nadtlenków.

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

Tabela 2

Wybrane substancje niezmydlające w oleju rzepakowym i oleju wiesiołkowym
Selected unsaponifiable matter in the rapeseed and evening primrose oil

Składniki <i>Components</i>	Olej rzepakowy <i>Rapeseed oil</i>	Olej wiesiołkowy <i>Evening primrose oil</i>
Substancje niezmydlające <i>Unsaponifiable matter [%]</i>	1,20 ± 0,3	0,90 ± 0,2
Karotenoidy [mg/100g oleju] <i>Carotenoids [mg/100 g of oil]</i>	0,428 ± 0,02	0,418 ± 0,5
β -karoten [mg/100g oleju] <i>β-carotene [mg/100g of oil]</i>	0,295 ± 0,02	śląd <i>trace</i>
Polifenole [mg/100g oleju] <i>Poliphenols [mg/100g of oil]</i>	0,26 ± 0,05	0,53 ± 0,05
Tokoferole [mg/100g oleju] <i>Tocopherols [mg/100g of oil]</i>	57,40 ± 1,5	70,83 ± 2,0
Sterole i estry steroli [%] * <i>Sterols and sterols esters [%]</i>	0,56 ± 0,1	1,50 ± 0,1

* Rasched 2000

W pracach Niewiadomskiego i Bratkowskiej (1970) oraz Usuki i in. (1984) wykazano, że pod wpływem światła chlorofil znajdujący się w badanych olejach ulega rozkładowi do feofityny (tab. 3). Powszechnie uważa się, że obecność chlorofilu w olejach decyduje w znacznym stopniu o ich trwałości, ponieważ uczestniczą one w procesie fotoutleniania kwasów tłuszczowych. W olejach bielonych ewentualne stężenie barwników jest na tyle niskie, że nie można stwierdzić ich obecności tą metodą pomiarową.

Tabela 3
Barwa, ilość feofityny i wartość liczby nadlenkowej w oleju rzepakowym i wiesiołkowym
Color, pheophytin and peroxide value in rapeseed and evening primrose oil

Typ oleju <i>Oil</i>	Barwa <i>Colour</i> ($A_{442}+A_{668}$) $\times 1000$	Feofityna [mg/100g]		Liczba nadlenkowa <i>Peroxide value</i>
		a	b	
Rzepakowy — <i>Rapeseed oil</i>				
– surowy — <i>natural</i>	1200 \pm 10	0,662 \pm 0,005	0,190 \pm 0,005	1,33
– bielony — <i>blanched</i>	80 \pm 5	śląd — <i>trace</i>	śląd — <i>trace</i>	0,94
Wiesiołkowy — <i>Evening primrose</i>				
– surowy — <i>natural</i>	340 \pm 6	0,120 \pm 0,005	0,021 \pm 0,005	2,00
– bielony — <i>blanched</i>	95 \pm 5	śląd — <i>trace</i>	śląd — <i>trace</i>	1,56

Chemiluminescencja

Wszystkie testowane oleje indukowano mieszaniną powietrza i ozonu (30 mg ozonu/m³) oraz promieniowaniem elektromagnetycznym UV-A, od 1 do 3 godzin. Dla porównania, do komory pomiarowej wstawiono próbki nie poddane procesom indukcji i potraktowano je jako próbki kontrolne. Wykazywały one chemiluminescencję rzędu 200–500 fotonów/mm²·s. Początkowa intensywność chemiluminescencji indukowana mieszaniną tlenu i ozonu ma największą wartość dla tłoczonego oleju rzepakowego $I_0 = 24000$ fotonów/mm²·s, w porównaniu z tłoczonym olejem wiesiołkowym, gdzie $I_0 = 4000$ fotonów/mm²·s. Oba oleje po wybieleniu mają początkową intensywność chemiluminescencji około 400 fotonów/mm²·s dla bielonego oleju rzepakowego i 200 fotonów/mm²·s dla bielonego oleju wiesiołkowego. Takie wyniki świadczą o istotnym wpływie barwników na intensywność chemiluminescencji. Intensywność chemiluminescencji indukowanej promieniowaniem elektromagnetycznym UV-A jest dużo niższa i została zarejestrowana tylko dla tłoczonego oleju rzepakowego. Kinetykę gaśnięcia chemiluminescencji 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 niejednorodność układu. Ponieważ nie jest łatwo rozstrzygnąć czy gaśnięcie jest opisane jedną funkcją wy-

kładniczą czy dwoma, dlatego prawidłowa analiza danych oraz właściwe kryteria oceny dopasowania krzywych teoretycznych do danych doświadczalnych są równie ważne, jak przeprowadzenie eksperymentu. 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 — wyznaczone parametry.

Poszukuje się takich parametrów, by zminimalizować sumę kwadratów różnic między krzywą otrzymaną z doświadczenia a obliczoną na podstawie wzoru teoretycznego. Obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica. Wybrane wyniki obliczeń statystycznych, np. dla tłoczonego oleju rzepakowego, przedstawiono w tabeli 4.

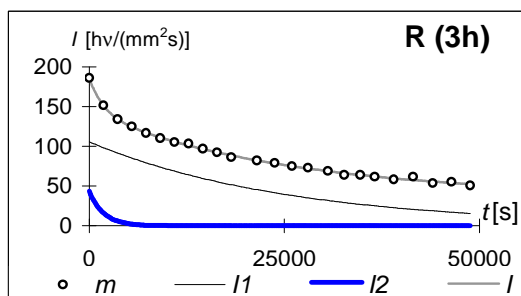
Tabela 4

Wybrane wyniki z obliczeń statystycznych stałych krzywej opisującej zanik chemiluminescencji z rysunku 2. — *Results of statistical calculations concerning the parameters of chemiluminescence decay from Fig. 2.*

Parametr <i>Parameter</i>	Wartości liczbowe <i>Numerical values</i>	Odchylenie standardowe <i>Standard deviation</i>	Przedział ufności 95% obliczony w programie Excel <i>95% confidence level calculated in Excel</i>	
			dolny – <i>bottom</i>	górnny – <i>upper</i>
a	41,02	0,34	33,95	48,09
c_1	130,18	0,21	125,78	134,57
b_1	$-4,22 \cdot 10^{-4}$	$0,033 \cdot 10^{-4}$	$-4,91 \cdot 10^{-4}$	$-3,52 \cdot 10^{-4}$
c_2	47,00	0,39	38,83	55,18
b_2	$-4,46 \cdot 10^{-5}$	$0,060 \cdot 10^{-5}$	$-5,72 \cdot 10^{-5}$	$-3,20 \cdot 10^{-5}$
Współczynnik determinacji — <i>Determination coefficient</i> $R^2 = 0,9982$				

Jedynym problemem podczas pomiarów był brak możliwości naświetlania próbek pod kamerą. Próbkę po naświetleniu i ozonowaniu przenoszono możliwie szybko pod kamerę, która zliczała fotony przez 14 godzin. Wszystkie pomiary doświadczalne wykonano w tych samych warunkach. Na rysunku 2 przedstawiono dopasowanie dwóch krzywych wykładniczych do uzyskanych punktów pomiarowych dla naturalnego oleju rzepakowego, po napromieniowaniu UV-A przez 3 godziny.

Pomimo, że rejestrowano kwanty po pewnym czasie od naświetlania, metoda dopasowania krzywych teoretycznych do wyników pomiarowych pozwala na określenie stałej szybkości zaniku chemiluminescencji badanych olejów oraz podanie czasu połowicznego jej zaniku. W oleju rzepakowym można wyodrębnić dwa procesy, szybką ultrasłabą luminescencję po naświetlaniu i wolną. Stałe szybkości zaniku chemiluminescencji tych dwóch procesów zależą od czasu naświetlania (tab. 5).



m – punkty pomiarowe — *measurement points*
 I – dopasowanie funkcji teoretycznej
theoretical function
 I₁ – składowa funkcji teoretycznej powolnego zaniku
component of theoretical function of slow decay
 I₂ – składowa funkcji teoretycznej szybkiego zaniku
component of theoretical function of fast decay
 R – olej rzepakowy — *rapeseed oil*
 $R^2 = 0,9982$; gdzie
 R^2 – współczynnik determinacji
 — *coefficient of determination*

Rys. 2. Aproksymacja dwuskładnikowej funkcji wykładniczej do punktów pomiarowych CL zarejestrowanych dla oleju rzepakowego podczas naświetlania — *Approximation of a binary exponential function to measurement points CL registered for rapeseed oil during irradiation*

Tabela 5

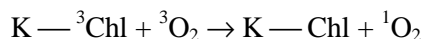
Parametry kinetyki zaniku fotochemiluminescencji w naturalnym oleju rzepakowym po naświetlaniu — *Kinetic parameters of the decay of the photochemiluminescence in natural rapeseed oil after irradiation*

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>Constance of decay rate</i> k [1/s]·10 ⁻⁵	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> [hv/mm ²]·10 ⁶
1 h = 3600 s proces szybki — <i>fast</i>	47	1,55	44,60	0,11
1 h = 3600 s proces wolny — <i>slow</i>	130	16,43	4,21	3,08
3 h = 10800 s proces szybki — <i>fast</i>	43	1,30	54,60	0,10
3 h = 10800 s proces wolny — <i>slow</i>	106	17,64	3,92	2,70

Nie zarejestrowano fotochemiluminescencji dla olejów bielonych i naturalnego oleju wiesiołkowego, ze względu na niskie natężenie.

Efektywny czas życia tlenu singletowego zależy nie tylko od obecności substancji, które oddziałują z tlenem na drodze chemicznej, ale również od obecności wygaszaczy tlenu singletowego. Najważniejszym przedstawicielem wygaszaczy tlenu singletowego jest β -karoten, którego stała szybkości gaszenia wynosi $3 \cdot 10^{10}$ 1/s. Wykazano (Kasha i Monroe 1985), że mechanizmem odpowiedzialnym za to sprawne gaszenie tlenu singletowego jest przeniesienie energii ze stanu singletowego tlenu na najniższy wzbudzony poziom trypletowy β -karotenu.

Energia poziomu trypletowego β -karotenu powinna być niższa niż energia najniższego poziomu singletowego tlenu. Cząsteczki β -karotenu mogą wielokrotnie dezaktywować tlen singletowy zanim ulegną destrukcji. Według Bellusa (1978), dezaktywację tlenu singletowego powodują cząsteczki, które tworzą krótkotrwałe kompleksy z przeniesieniem ładunku. Do tych substancji zaliczamy polifenole, tokoferole oraz anionorodniki ponadtlenkowe. Zestaw barwników karotenoidowych i chlorofilowych może tworzyć układ barwnikowy powiązany siłami van der Waalsa (Moore i in. 1994). Taki układ może wzbudzać tlen trypletowy do stanu singletowego wg schematu



gdzie:

K — Chl — układ barwników (karoten, chlorofil)

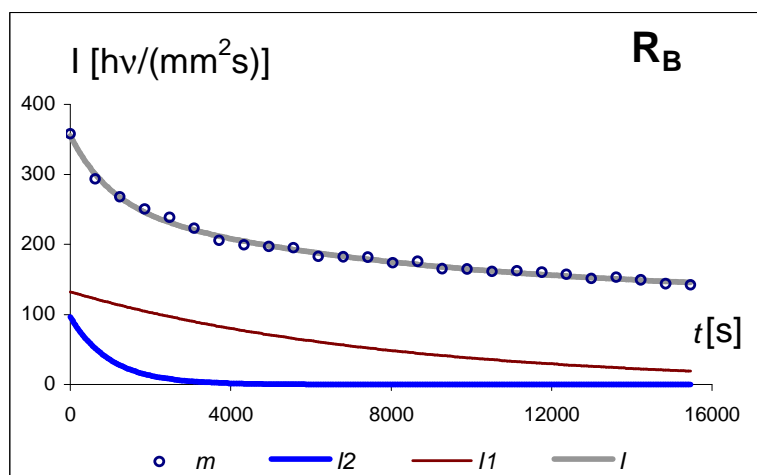
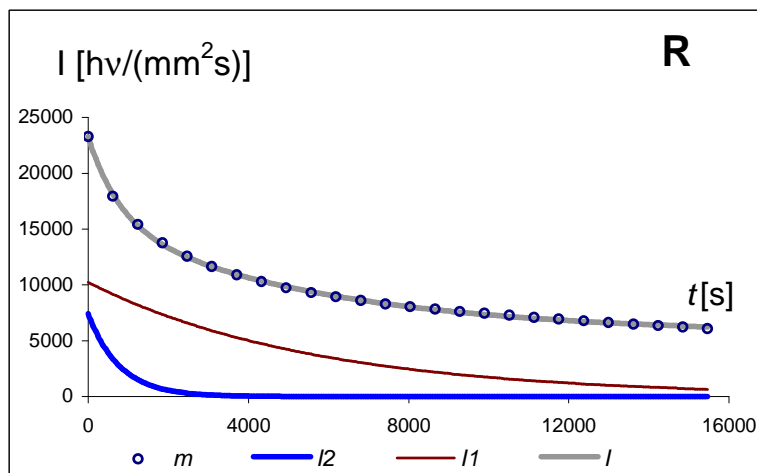
Natężenie CL ma największą wartość w olejach naturalnych po ozonowaniu. Na rysunku 3 i 4 przedstawiono aproksymację dwuskładnikowej funkcji wykładniczej do punktów pomiarowych CL dla oleju rzepakowego i wiesiołkowego (bielony i naturalny) po ozonowaniu.

Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji w oleju rzepakowym po ozonowaniu zebrano w tabeli 6.

Tabela 6

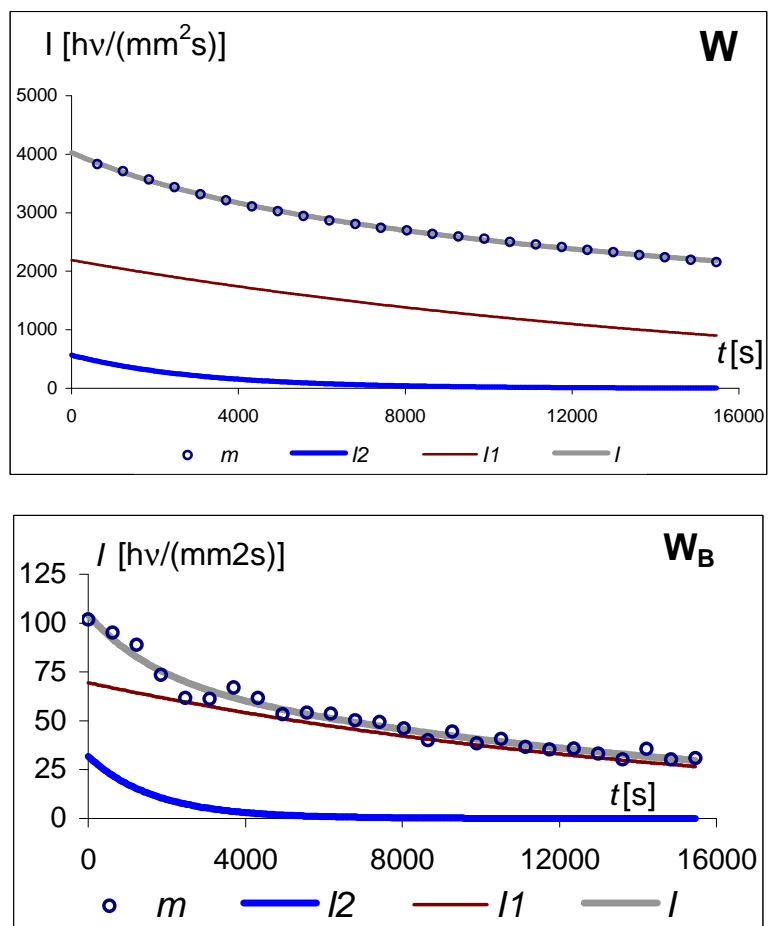
Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji w oleju rzepakowym po 15 min. ozonowaniu — *Kinetic parameters of the decay of photoinduced chemiluminescence in rapeseed oil after 15 min ozonization*

Olej <i>Oil</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]	Stała szybkości zaniku <i>Constance of decay rate</i> k [1/s]·10 ⁻⁵	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> [hv / mm ²]·10 ⁶
Po tłoczeniu — <i>After pressing</i>				
– proces szybki — <i>fast</i>	7424	540	12,8	5,8
– proces wolny — <i>slow</i>	10228	3896	1,78	57,5
Po bieleniu — <i>After blanching</i>				
– proces szybki — <i>fast</i>	96	681	10,1	0,95
– proces wolny — <i>slow</i>	132	5514	1,26	1,05



- m – punkty pomiarowe — *measurement points*
- I – dopasowanie funkcji teoretycznej — *theoretical function*
- R – olej rzepakowy naturalny — *natural rapeseed oil* ($R^2 = 0,9995$)
- R_B – olej rzepakowy bielony — *blanched rapeseed oil* ($R^2 = 0,9949$)
- I_1 – składowa funkcji teoretycznej powolnego zaniku
component of theoretical function of slow decay
- I_2 – składowa funkcji teoretycznej szybkiego zaniku
component of theoretical function of fast decay

Rys. 3. Aproksymacja dwuskładnikowej funkcji wykładniczej do punktów pomiarowych CL dla oleju rzepakowego po ozonowaniu — *Approximation of a binary exponential function to measurement points CL registered for rapeseed oil after ozonization*



- m – punkty pomiarowe — *measurement points*
 I – dopasowanie funkcji teoretycznej — *theoretical function*
 W – olej wiesiołkowy naturalny — *natural evening primrose oil* ($R^2 = 0,9987$)
 WB – olej wiesiołkowy bielony — *blanched evening primrose oil* ($R^2 = 0,9742$)
 I₁ – składowa funkcji teoretycznej powolnego zaniku
 component of an theoretical function of slow decay
 I₂ – składowa funkcji teoretycznej szybkiego zaniku
 component of an theoretical function of fast decay

Rys. 4. Aproksymacja dwuskładnikowej funkcji wykładniczej do punktów pomiarowych CL dla oleju wiesiołkowego po ozonowaniu — *Approximation of a binary exponential function to measurement points CL registered for rapeseed oil after ozonization*

Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji w oleju wiesiołkowym po ozonowaniu zebrano w tabeli 7.

Tabela 7

Parametry kinetyki zaniku fotoindukowanej luminescencji w oleju wiesiołkowym po 15 min. ozonowaniu — *Kinetic parameters of the decay of photoinduced luminescence in evening primrose oil after 15 min ozonization*

Olej <i>Oil</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]	Stała szybkości zaniku <i>Constance of decay rate</i> k [1/s]·10 ⁻⁵	Powierzchnia pod krzywą <i>Area under the curve</i> [hv/mm ²]·10 ⁶
Po tłoczeniu — <i>After pressing</i>				
– proces szybki — <i>fast</i>	566	2134	32,5	1,7
– proces wolny — <i>slow</i>	2190	12056	5,75	38,1
Po bieleniu — <i>After blanching</i>				
– proces szybki — <i>fast</i>	31	1169	59,2	0,5
– proces wolny — <i>slow</i>	69	11146	6,22	1,1

Po ozonowaniu olejów stałe szybkości zaniku CL są o rząd wartości wyższe w oleju rzepakowym niż w oleju wiesiołkowym (tab. 5 i 6). Wydaje się, że na szybkość zaniku CL decydujący wpływ ma nie tylko skład kwasów tłuszczowych w olejach (tab. 1), ale także zawartość barwników chlorofilowych i karotenoidowych (tab. 2 i 3). Natężenie CL zależy od ilości barwników, ponieważ po bieleniu to natężenie jest wielokrotnie niższe (tab. 6 i 7). Aproksymacja dwuskładnikowej funkcji wykładniczej do wyników doświadczalnych pozwoliła wyodrębnić dwa procesy: powolny i szybki. Na intensywność tych procesów wpływa bielenie olejów. Analizując sumę kwadratów różnic między krzywą otrzymaną z doświadczenia a obliczoną na podstawie wzoru teoretycznego, można przypuszczać, że w olejach naturalnych ozonowanych przebiega jeszcze jeden proces o długim okresie połowicznego rozpadu. Świadczy o tym duża wartość stałej a : dla oleju rzepakowego wynosi ona 5590, dla oleju wiesiołkowego 1271.

Wnioski

Pomimo upływu czasu podczas ustawiania próbek olejowych po napromieniowaniu pod kamerą CCD (nie jest możliwe napromieniowywanie i jednoczesne filmowanie), można dopatrzeć się następujących prawidłowości:

1. Stałe szybkości zaniku chemiluminescencji są tego samego rzędu, tzn. że nie zależą od czasu napromieniowania.
2. Procesy rozpoczęte naświetlaniem trwają nadal (proces wolny).
3. Składowa szybka jest związana z obecnością barwników chlorofilowych.
4. Ozonowanie zwiększa ilość rodników w próbkach olejowych, co ma istotny wpływ na wartość natężenia chemiluminescencji i parametry kinetyki jej zaniku.

Literatura

- AOAC, Official Methods of Analysis the Association of Official Analytical Chemists, 1984.
- Bartosz G. 1995. Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.
- Bellus D. 1978. Singlet oxygen reactions with organic compounds and polymers Eds. B. Ranby, J.F. Rambek. J. Wiley and Sons, Chichester: 61-75.
- Cadenas E., Siest H. 1984. Electronically Excited States in Microsomal Membranes; Use of Chlorophyll a, as an Indicator of Triplet Carbonyls. Photochem. Photobiol., 40: 661-666.
- Chimi B.H., Cillard J. 1994. Autooxidation de l huile d argan *Argania spinosa* L. de Maroc. Sciences de Aliments., 14/1: 35-41.
- Cillard J., Cillard P., Cormier M. 1980. Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of α -tocopherol. J. Am. Oil Chem. Soc., 57: 255-261.
- Kaneda T., Miyazawa T. 1987. Lipid peroxides and nutrition. World Rev. Nutr. Diet., 50: 186-214.
- Kasha M., Monroe B. 1985. Singlet O₂. vol. 1. A.A. Frimer, ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kinter M. 1995. Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. Journal of Chromatography, B. 671: 223-226.
- Loeliger J., Saucy F. 1984. Food oxidation as measured by chemiluminescence. J. of Luminescence, 31-31.2: 908-910.
- Mimuro M., Katoh T. 1991. Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. Pure Appl. Chem., 63: 123-130.
- 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.
- Niewiadomski H., Bratkowska I., Mossakowska E. 1965. Contents chlorophylls and carotenes in rapeseed oil. J. Am. Oil Chem. Soc., 42: 731-743.
- 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.

- PN-ISO 3596-2/1994. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie substancji niezmylejących. 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.
- 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. 1994. Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa.
- Sławińska D., Górski Z., Sławiński J. 1998. Chemiluminescence imaging of oxidative changes in plant food. Polish J. Food and Nutrition Sci., 7/48,2 :67-72.
- Sławiński J. 1989. Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych. W: Biospektroskopia pod red. J. Twardowskiego. PWN, Warszawa, t. 3: 107-206.
- Sławiński J., Rajfur Z., Wierzuchowska D. 1987. Wykorzystanie ultrasłabej luminescencji w medycynie. Post. Fiz. Med., 22: 1-33.
- Stanisz A. 1998. Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny. StatSoft Polska Kraków.
- Stołyhwo A. 1992a. Analityczne kryteria jakości zdrowotnej oleju z wiesiołka i innych bioolejów z surowców naturalnych. I Sympozjum „Olej z nasion wiesiołka w profilaktyce i terapii”, Łódź, 8-10 X: 9-21.
- Stołyhwo A. 1992b. 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.
- Szterk A., Lewicki P.P. 2009. A New Chemiluminescence Method for Detecting Lipids Peroxides. In Vegetable Lipid Oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 87: 361-367.
- Usuki R., Endo J., Kaneda T. 1984. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the oxidation of edible oils. Agric. Biol. Chem., 48: 991-994.
- Usuki R., Kaneda T., Yamagishi A., Takyu C., Inaba H. 1979. Estimation of oxidative deterioration of oils and foods by measurements of ultraweak chemiluminescence. J. Food Sci., 44: 1573-1576.
- Yanishlieva-Maslarova N.V. 1984. On the antioxidative effect of some polyphenols in lipid system. Bul. Lias. Groupe Polyphenols, 12: 470-480.
- Zadernowski R., Sosulski F. 1978. Composition of total lipids in rapessed. JAOCS, 55, 12: 870-872.

Podziękowanie

Składamy serdeczne podziękowania Panu Profesorowi dr hab. Januszowi Sławińskiemu za cenne wskazówki i uwagi.