

Wiesława Walisiewicz-Niedbalska¹, Andrzej W. Lipkowski^{1,2}, Hanna Gwardiak¹
Krzysztof Różycki¹, Bożena Patkowska-Sokoła³, Adam Opolski⁴
Magdalena Muzalewska⁵

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

² Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

³ Akademia Rolnicza we Wrocławiu

⁴ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu

⁵ Politechnika Gdańska

Pochodne oleju makowego jako związki biologicznie czynne

Poppy seed oil derivatives as biological active substances

Słowa kluczowe: olej makowy, kwas linolowy ze sprzężonymi wiązaniami podwójnymi, CLA, izomeryzacja

Key words: poppy seed oil, conjugated linoleic acid, isomerization

W pracy przebadano skład kwasów tłuszczowych oleju makowego z nasion maku niskomorfinoowego (Michałko, Agat, Mieszko, Zambo, Rubin i Przemko) i wysokomorfinoowego (Lazur). Do dalszych badań wybrano olej makowy odmiany Michałko ze względu na wysoką zawartość kwasu linolowego (72,8%), niską zawartość kwasu oleinowego (12,6%) i kwasu linolenowego (0,8%). Kwasy nasycone głównie palmitynowy (11,3%) mogą być usunięte w odrębnym postępowaniu. Przebadano proces alkalicznej izomerizacji oleju makowego do izomerów CLA, głównie C_{18:2}9c,11t i 10t,12c, w temperaturze 140, 160 i 180°C. Zadawalający stopień przereagowania kwasu linolowego osiągnięto w temp. 180°C, równoległe ze wzrastającą ilością niepożądanych jego izomerów. Obecność wolnych kwasów tłuszczowych w oleju makowym powoduje zmniejszenie ilości powstającego izomeru 10t,12c lub sprzyja jego degradacji do innych niezidentyfikowanych izomerów kwasu linolowego. Stabilność termiczna określona w wyjątkowo drastycznych warunkach wykazała, że izomer 9c,11t jest bardziej stabilny niż izomer 10t,12c. Podsumowując można powiedzieć, że olej makowy może być doskonałym surowcem do otrzymywania biologicznie aktywnych izomerów CLA.

Fatty acids composition of poppy seed oil was investigated. Oil was obtained from seeds of low morphine (Michałko, Agat, Mieszko, Zambo, Rubin and Przemko) and high morphine (Lazur) poppy varieties. Michałko was chosen for further investigation because of high linoleic acid content (72.8%), low oleic acid (12.6%) and linolenic acid (0.8%) content. Saturated acids, mainly the palmitic acid (11.3%), can be removed in a separate process. The process of alkalic isomerization of poppy seed oil to CLA isomers, mainly C_{18:2}9c,11t and 10t,12c, was investigated at temperatures: 140, 160 and 180°C. Satisfactory level of linoleic acid transformation into CLA was achieved at 180°C with a simultaneous formation of undesired C_{18:2} isomers. Presence of free fatty acids in poppy seed oil resulted in reduced formation of 10t,12c isomer or made easier its degradation to undefined linoleic acid isomers. Thermal stability described in very drastic conditions showed that 9c,11t is more stable than 10t,12c isomer. Summing up, poppy seed oil seems to be an excellent substrate for obtaining biologically active CLA isomers.

Wstęp

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił silny rozwój badań w obszarze pozyskiwania izomerów kwasu linolowego zawierającego układy sprzężonych wiązań nienasyconych oraz badania aktywności biologicznej po zidentyfikowaniu ich w grillowanym mięsie wołowym jako składników odpowiedzialnych za hamowanie mutagenezy (Ha 1987) wykazujących działanie antykancerogenne (Ip 1994). Mieszanina izomerów kwasu linolowego zawierających sprzężone wiązania podwójne, głównie w pozycjach 9c,11t i 10t,12c, określana jest ogólnym terminem CLA (ang. *conjugated linoleic acid*, CLA).

Izomery CLA, głównie izomer C_{18:2}9c,11t, (ang. *rumenic acid*) powstają w żwaczu jako półprodukt biouwodornienia kwasu linolowego wobec izomeru kwasu linolowego z *Butirivibrio fibrisolvens* (Kepler 1965). Dlatego też występują głównie w tłuszczu mleka i mięsa przeżuwaczy. Zawartość izomerów CLA, głównie C_{18:2}9c,11t, w tłuszczu mleka waha się w szerokich granicach od około 0,4 do około 2,0%, wyjątkowo do 3,0% i zależy od gatunku zwierzęcia (np. mleko krowie około 1,0%, mleko kozie około 0,6%, mleko owcze około 2,0%), pory roku (w okresach letnich wyższa zawartość CLA), rodzaju pożywienia i sposobu karmienia jak również od cech osobniczych zwierzęcia (Fritsche 1999, Patkowska-Sokoła 2000, Gwardiak 2000).

Niska zawartość izomerów CLA w produktach pochodzenia zwierzęcego zmusza do ich wzbogacania (Walisiewicz-Niedbalska 2001) oraz do poszukiwania innych sposobów ich otrzymywania. Znane są w literaturze prace nad otrzymywaniem izomerów CLA w procesie alkalicznej izomeryzacji olejów roślinnych: słonecznikowego, krokoszewego, sojowego czy lnianego (Berdeaux 1998, Chen 1999, Ma 1999).

Celem naszych badań był dobór oleju roślinnego o odpowiednim składzie kwasów tłuszczowych, a więc z maksymalną zawartością kwasu linolowego C_{18:2}9c,12c i minimalną zawartością kwasu linolenowego C_{18:3}9c,12c,15c i kwasów nasyconych, a następnie w procesie jego izomeryzacji według znanego sposobu (Ma 1999) przebadanie procesu otrzymywania biologicznie aktywnych izomerów kwasu linolowego (CLA).

Material i metody

Dzięki uprzejmości Zespołu Badawczego w Zakładzie Doświadczalnym IHAR w Borowie mieliśmy możliwość przebadania następujących odmian maku: Michałko, Agat, Mieszko, Zambo, Rubin, Przemko i Lazurowy. Olej z nasion maku pozyskiwano metodą ekstrakcji heksanem w aparacie Soxhleta w temperaturze wrzenia heksanu.

Do dalszych badań stosowano nasiona odmiany Michałko, z którego metodą ekstrakcji uzyskano olej (około 44%) o następującym składzie: kwas palmitynowy 11,3%, kwas stearynowy 1,8%, kwas oleinowy 12,6%, kwas linolowy 72,8%, kwas linolenowy 0,8%; w ilościach poniżej 0,2% obecne były kwasy: mirystynowy, pentadekanowy, palmitooleinowy, margarynowy, eikozenowy. Zawartość fitosteroli wynosiła 0,33%, porównywalnie z olejami słonecznikowym i sojowym.

Izomeryzację prowadzono wobec wodorotlenku sodu, w ilości około 30% wagowych w środowisku glikolu propylenowego; temperatura reakcji 180–200°C, czas 1–2 godziny.

Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatografii gazowej na aparacie HP, detektor FID, kolumna CP Sil 88 długości 50 m; temperatura: kolumny 170°C, dozownika 200°C, detektora 250°C; gaz nośny – hel. Estrы metylowe otrzymywano zgodnie z AOCS Ce2-66. Identyfikację jakościową wykonywano przez porównanie czasów retencji składników badanych związków z wzorcami. Jako wzorce stosowano izomery CLA firmy Sigma. Identyfikację izomerów położeniowych głównych składników przeprowadzono metodą GC/MS wykorzystując specyficzną fragmentację pochodnych tłuszczowych z 2-amino-2-metylo-1-propanolem (DMOX). Rozdział estrów metylowych kwasów tłuszczowych na frakcje kwasów tłuszczowych *trans* (KT-*trans*) i kwasów tłuszczowych *cis* (KT-*cis*) wykonywano metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC-Ag+. Zebrane pasma estrów metylowych odpowiadających frakcjom KT-*trans* i KT-*cis* przeprowadzono w ich pochodne z 4,4-dimetylooxazoliną. Otrzymane pochodne DMOX analizowano metodą GC/MS.

Wyniki

Charakterystykę oleju makowego uzyskanego metodą ekstrakcji z nasion różnych odmian maku przedstawiono w tabeli 1.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki reakcji izomeryzacji oleju makowego (kwasu linolowego związanego w triacyloglicerolach) wobec NaOH jako katalizatora w środowisku glikolu propylenowego.

Wpływ obecności wolnych kwasów tłuszczowych w surowcu — oleju makowym na przebieg procesu izomeryzacji przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 1

Charakterystyka oleju makowego uzyskanego z kilku odmian nasion maku
Composition of poppy seed oil fatty acids

| Rodzaj oznaczenia [%] | Michałko | Agat | Mieszko | Zambo | Rubin | Przemko | Lazur |
|--|----------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|
| Zawartość oleju w nasionach maku <i>Oil content in poppy seeds</i> | 42,0 | 41,0 | 43,0 | 40,0 | 41,0 | 44,0 | 43,0 |
| Zawartość steroli w oleju <i>Sterole content in oil</i> | 0,33 | 0,34 | 0,33 | 0,34 | 0,35 | 0,30 | 0,30 |
| Skład kwasów tłuszczowych w oleju — <i>Fatty acid composition in oil</i> | | | | | | | |
| C ₁₄ | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | – | < 0,1 |
| C ₁₅ | < 0,2 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | – | – |
| C ₁₆ | 11,3 | 10,7 | 9,7 | 11,1 | 9,5 | 9,8 | 10,3 |
| C _{16:1} | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| C ₁₇ | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 |
| C _{17:1} | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | – | < 0,1 |
| C ₁₈ | 1,8 | 2,1 | 1,9 | 2,1 | 2,1 | 1,8 | 1,9 |
| C _{18:1} | 12,6 | 14,4 | 14,7 | 14,0 | 14,3 | 14,1 | 19,7 |
| C _{18:2} | 72,8 | 71,4 | 72,4 | 71,5 | 72,8 | 72,9 | 67,0 |
| C _{18:3} | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,7 |
| C _{20:1} | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 | < 0,1 |

Tabela 2

Główne produkty reakcji izomeryzacji oleju makowego o LK 0,2 w zależności od temperatury reakcji; katalizator, NaOH, rozpuszczalnik, glikol propylenowy, czas 2 godz
The contents of linoleic acid and conjugated linoleic acid in product of isomerization (catalyst NaOH, solution propylene glycol, time 2h) in relation to the temperature

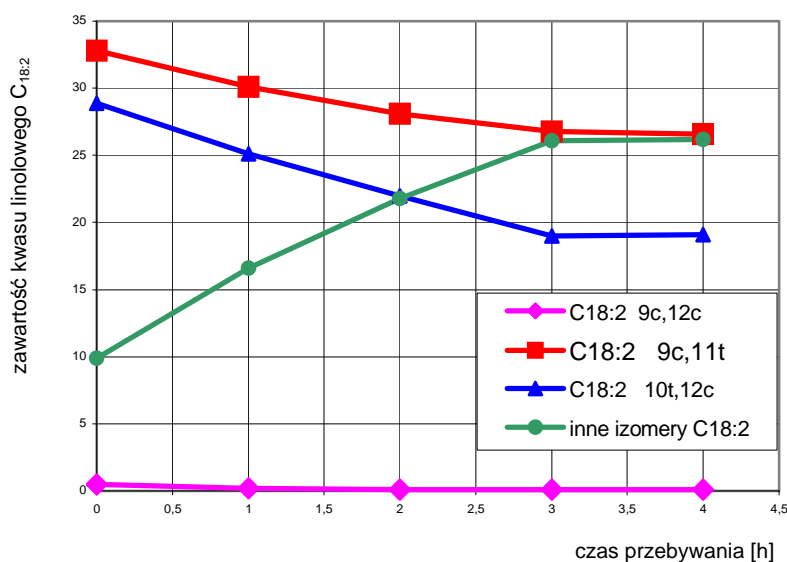
| Kwas <i>Acid</i> | Zawartość składnika — <i>Component content [%]</i> | | | |
|--|--|---|------|------|
| | surowiec <i>resource</i> | produkt — <i>product</i> | | |
| | | temperatura reakcji — <i>temperature [°C]</i> | | |
| | | 140 | 160 | 180 |
| C _{18:2} 9c,12c (linolowy) | 72,8 | 46,4 | 24,3 | 3,0 |
| C _{18:2} 9c,11t (CLA) | 0 | 12,2 | 23,2 | 32,7 |
| C _{18:2} 10t,12c (CLA) | 0 | 12,6 | 24,3 | 35,1 |
| Inne izomery | | 0,5 | 0,8 | 1,1 |
| C _{18:2} 10t,12c / C _{18:2} 9c,11t | – | 1,0 | 1,1 | 1,2 |

Tabela 3

Zawartość izomerów kwasu linolowego w produkcie izomeryzacji oleju makowego (temp. 180°C, czas 2 godz.) w zależności od zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w surowcu
The content of conjugated linoleic acid in isomerization product (temp. 180°C, time, 2h) in relation to free fatty acid content in raw material

| Kwas Acid | Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w surowcu [%] <i>Free fatty acid content in raw material</i> | | |
|--|---|------|------|
| | 0,1 | 0,4 | 8,7 |
| C _{18:2} 9c,12c (linolowy) | 3,5 | 0,6 | 0,3 |
| C _{18:2} 9c,11t (CLA) | 32,7 | 32,8 | 32,8 |
| C _{18:2} 10t,12c (CLA) | 36,1 | 35,1 | 28,9 |
| Inne izomery | 1,7 | 3,5 | 10,0 |
| C _{18:2} 10t,12c / C _{18:2} 9c,11t | 1,10 | 1,07 | 0,88 |

Zmiany w zawartości kwasu linolowego i jego izomerów w produkcie izomeryzacji oleju makowego w czasie ich przechowywania w temp. 185°C przedstawiono na wykresie — rysunek 1.



Rys. 1. Zmiany w zawartości kwasu linolowego i jego izomerów w czasie ogrzewania w temp. 185°C
Changes of linoleic acid and conjugated linoleic acid contents during storage (temp. 185°C) in relation to time

Dyskusja

Na podstawie analizy składu kwasów tłuszczowych różnych odmian nasion maku niskomorfinowego (Michańko, Agat, Mieszko, Zambo i Rubin) i wysokomorfinowego (Lazur) dokonano wyboru oleju do dalszych badań. Najwyższe zawartości kwasu linolowego (72,8%) oznaczono w oleju makowym odmian Michańko, Rubin i Przemko, a najniższe w odmianie wysokomorfinowej Lazur (67,0%) (tab. 1). Do dalszych badań nad otrzymywaniem izomerów CLA wybrano odmianę Michańko. Kwas palmitynowy, obecny w tym oleju w stosunkowo dużej ilości (11,3%), jak również pozostałe kwasy nasycone, można usunąć w odrębnym postępowaniu.

W produkcie izomeryzacji oleju makowego obok głównych izomerów 9c,11t i 10t,12c (CLA) zidentyfikowano izomery C_{18:2}, 8t,10c, 8c,10t, 10c,12t w ilości od 0,5 do 1,1%, a także pozostałe niezidentyfikowane izomery kwasu linolowego w ilości około 0,5% (tab. 2). Wzrost temperatury reakcji ze 140 do 180°C, jak należało oczekiwać, powoduje zwiększenie stopnia przereagowania oraz powstaje większa ilość produktów ubocznych. Stosunek izomerów C_{18:2} 10t,12c / C_{18:2} 9c,11t wzrasta wraz ze wzrostem temperatury reakcji. Może to być powiązane również ze stopniem przereagowania, jako że w temperaturze niższej nie osiągnięto całkowitego przereagowania kwasu linolowego (w temp. 140°C pozostało 46,4% kwasu linolowego). Badania są kontynuowane.

Obecność wolnych kwasów tłuszczowych w surowcu powoduje podwyższenie stosunku izomerów C_{18:2} 10t,12c / C_{18:2} 9c,11t w produkcie izomeryzacji, co sugeruje powstawanie mniejszych ilości izomeru C_{18:2} 10t,12c na korzyść izomeru C_{18:2} 9c,11t i pozostałych izomerów kwasu linolowego (tab. 3).

Wstępnie określono, w bardzo drastycznych warunkach (temp. 184°C), stabilność termiczną produktu izomeryzacji oleju makowego zawierającego jako główne izomer C_{18:2} 9c,11t w ilości 28,9% i izomer C_{18:2} 9c,11t w ilości 32,8%. W czasie przechowywania w tej temperaturze znacznie szybciej degradacji izomer C_{18:2} 10t,12c, z 28,9 do 19,1% niż izomer C_{18:2} 9c,11t z 32,8 do 26,6%, a więc stosunek ilości tych izomerów po 4 godzinach zmniejszył się z 0,88 do 0,73.

Wnioski

- Olej makowy ze względu na jego skład kwasów tłuszczowych, a więc wysoką zawartość kwasu linolowego (powyżej 72%), kwasów nasyconych (powyżej 10%), które można usunąć w odrębnym postępowaniu oraz niską zawartość kwasu linolenowego (poniżej 0,9%), może być stosowany do otrzymywania biologicznie aktywnych izomerów kwasu linolowego ze sprzężonymi wiązaniami podwójnymi C_{18:2} 9c,11t i C_{18:2} 10t,12c.

- W wyniku alkalicznej izomeryzacji oleju makowego uzyskuje się produkt zawierający mieszaninę biologicznie aktywnych izomerów kwasu linolowego C_{18:2} 9c,11t do C_{18:2} 10t,12c w stosunku około 1 : 1,1 w ilości około 65%.

Conclusions

- Poppy seed oil contains linolenic acid above 72%, saturated acids above 10% (these can be removed in a separated process) and linoleic acid below 0.9%. Because of its fatty acid content this oil can be used for obtaining biologically active linoleic acid isomers with conjugated double bonds C_{18:2} 9c,11t and C_{18:2} 10t,12c.
- As a result of poppy seed oil alcalic isomeration it was obtained the product containing a mixture of biologically active linolenic acid isomers C_{18:2} 9c,11t and C_{18:2} 10t,12c in a rate 1 : 1.1 and at efficiency 65%.

Literatura

- Fritsche J., Rickert R., Steinhart H., Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Sehat N., Roach J.A.G., Kramer J.K.G., Ku Y. 1999. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. *Fett/Lipid* 101 (8): 272.
- Gwardiak H., Walisiewicz-Niebalska W., Lipkowski A.W., Otwinowska H., Pawlak I. 2000. Naturally occurring products as a source of conjugated linoleic acid (CLA). *Annual Report ICRI*.
- Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.
- Ip C., Scimeca J.A., Thompson H.J. 1994. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer* 74 (3 Suppl.) 1050.
- Kepler C.R., Hirons K.P., McNeill J.J., Tove S.B. 1965. Intermediates and Products of the Biohydrogenation of Linoleic Acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241: 1350-1354.
- Ma D.W.L., Wierzbicki A.A., Field C.J., Clandinin M.T. 1999. Preparation of Conjugated Linoleic Acid from Safflower Oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 76 (6): 729.
- Patkowska-Sokoła B., Bodkowski R., Jędrzejczak J. 2000. The content of conjugated dienes of linoleic acid in meat and milk of different animal species. (in polish) *Zeszyty Nauk. AR Wrocław, Ser. Conferences XXX: 399: 257*.
- Walisiewicz-Niebalska W., Patkowska-Sokoła B., Lipkowski A.W., Bodkowski R., Kwiatkowski J., Gwardiak H. 2001. Studies of conjugated linoleic acid (CLA) in sheep milk fat. *Arch. Animal Breeding., Dummerstorf* 44, Special Issue: 322-328.