

OMEGA-3 RASVAHAPOT

Kandidaatintutkielma

Helsingin Yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Kemian laitos

Kemian opettajankoulutusyksikkö

Työn tekijä: Elina Rautapää

Työn ohjaajat: Prof. Maija Aksela, Kemian opettajankoulutusyksikkö

Prof. Mikko Oivanen, Orgaanisen kemian laboratorio

Työ on jätetty tarkastettavaksi: 20.11.2009

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO.....	1
2 RASVAHAPOT OVAT LIPIDEJÄ.....	2
2.1 RASVAT	2
2.2 FOSFOLIPIDIT	3
2.3 VAHAT.....	4
2.4 STEROIDIT.....	4
3 RASVAHAPPOJEN NIMEÄMISESTÄ.....	5
4 RASVAHAPOT ELIMISTÖSSÄ.....	5
4.1 TOIMIMINEN ”POLTTOAINEMOLEKYYLINÄ”	6
4.2 RASVAHAPPOJEN SYNTEESI ELIMISTÖSSÄ	9
4.3 OMEGA-3 RASVAHAPPOJEN MERKITYS TERVEYDELLE	9
5 OMEGA-3 RASVAHAPPOSEOSTEN MUOKKAUSMENETELMIÄ.....	10
5.1 KROMATOGRAFISET MENETELMÄT	10
5.2 TISLAUSMENETELMÄ.....	12
5.3 ENTSYMAATTISET MENETELMÄT	12
5.3.1 <i>Entsymaattinen hydrolyysi</i>	12
5.3.2 <i>Entsymaattinen esteröinti</i>	13
5.4 KITEYTTÄMINEN ALHAISESSA LÄMPÖTILASSA	14
5.4.1 <i>Natriumsuolojen kiteyttäminen</i>	15
5.5 ERISTYS YLIKRIITTISEN NESTEEN AVULLA	16
5.6 UREAKOMPLEKSOINTI.....	17
5.7 KEMIALLINEN HYDROLYSOINTI.....	18
6 YHTEENVETO	19
7 LÄHDELUETTELO.....	20
8 LIITTEET	22

1 JOHDANTO

Rasvoista puhutaan yleisesti nykyään paljon. Ihmisiä neuvotaan syömään vähärasvaisia ruoka-aineita sekä kasvipohjaisia, pehmeitä rasvoja. Ravintorasvoja ovat esimerkiksi voi, margariinit, kasviöljyt, lihassa oleva rasva sekä kookosrasva. Näissä rasvoissa on hyvin paljon erilaisia rasvoja, joilla on erilaisia vaikutuksia elimistössämme. Ravitsemussuositusten mukaan suurin osa rasvoista tulisi saada kertatydyttymättömistä rasvahapoista. Hyviä lähteitä näille ovat esimerkiksi oliivi- ja rypsiöljy sekä manteli ja erilaiset pähkinät. Lisäksi rasvojen vaikutuksiin elimistössä vaikuttavat monitydyttymättömien omega-3 ja omega-6 rasvahappojen suhde.¹

Ihmisille suositellaan kalan syöntiä, koska kalassa on elimistölle tärkeitä omega-3 rasvahappoja sekä luuston kasvuun tarvittavaa D-vitamiinia. Markkinoilla on myös paljon erilaisia funktionaalisia tuotteita, joissa mainostetaan olevan elimistölle hyviä omega-3 rasvahappoja, kuten omega-3 kananmunia. Näiden lisäksi myydään omega-3 rasvahappolisiiä, joilla keuhataan olevan monenlaisia edullisia vaikutuksia esimerkiksi oppimiseen.

Valitsin omega-3 rasvahapot kandidaatintyöni aiheeksi, koska tämä aihe liittyy peruskoulun aihekokonaisuuteen ihmisenä kasvaminen.² Aihekokonaisuuden tavoitteena on ymmärtää omaa fyysistä kasvua, johon mielestäni oleellisesti liittyy hyvä ravinto. Myös keskeisissä sisällöissä 7-9 luokille kemian opetuksessa mainitaan rasvat yhtenä osana opetusta. Lukion opetussuunnitelmien perusteissa³ mainitaan hyvinvoinnin aihekokonaisuus ja kemian kaikille oppilaille pakollisella ykköskurssilla käsitellään ihmisen ja elinympäristön kemiaa, johon rasvat kuuluvat. Tämä aihe antaa myös hyvät mahdollisuudet kemian ja terveystiedon integroimiseen ja näin voisi aiheen käsittelylle saada enemmän oppituntiaikaakin.

Tässä työssä halusin ottaa tarkemmin selvää omega-3 rasvahapoista ja rasvahappolisien valmistusperiaatteista. Työn alussa esitetään lipidien rakenteet pääpiirteittäin. Sen jälkeen tarkastellaan rasvahappojen rakenteita ja nimeämistä. Neljännessä kappaleessa selvitetään rasvahappojen merkitystä elimistössä: toimimista energian lähteenä, rasvahappojen synteesiä sekä luetellaan lyhyesti rasvahappojen muita tärkeitä toimintoja elimistössä.

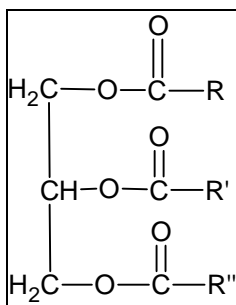
Viimeisessä luvussa käsitellään erilaisia valmistusmenetelmiä, joilla pystytään erottamaan erilaisia rasvahappoja toisistaan niiden ominaisuuksien avulla.

2 RASVAHAPOT OVAT LIPIDEJÄ

Lipidit ovat veteen liukenemattomia aineita. Ne liukenevat hyvin poolittomiin liuottimiin ja voidaan tämän perusteella eristää soluista. Elimistön lipidit voidaan jakaa molekyyliarakenteensa perusteella neljään eri pääryhmään: rasvat, fosfolipidit, vahat ja steroidit.⁴ Näistä kolmen ensimmäisen rakenteessa esiintyy rasvahappoja ja neljäs ryhmä steroidit, eroaa edellisistä rakenteensa puolesta merkittävästi. Seuraavaksi esitellään näiden neljän pääryhmän rakenteet.

2.1 Rasvat

Rasvoilla tarkoitetaan glyserolin ja pitkäketjuisten karboksyylihappojen (eli rasvahappojen) estereitä. Näitä kutsutaan yleisnimellä triglyseridit. Triglyseridien yleinen rakennekaava on esitetty alla kuvassa 1. Rakenteeseen merkityt yleiset ryhmät (R, R', R'') voivat olla joko samanlaisia pitkäketjuisia rasvahappoja tai keskenään erilaisia pitkäketjuisia rasvahappoja.⁴

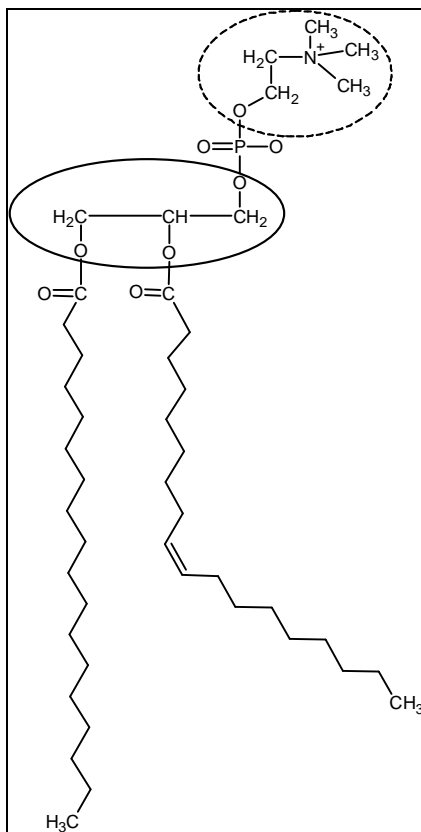


Kuva 1. Triglyseridi.⁴

Rakenteessa on kolme esterisidosta, jotka ovat muodostuneet glyserolin hydroksyyliiryhmän sekä rasvahapon karboksyyliiryhmän välille.

2.2 Fosfolipidit

Kuten rasvatkin, myös fosfolipidit ovat glyserolin estereitä. Erona on se, että kun rasvoissa on glyseroliin liittyneenä kolme rasvahappoa, niin fosfolipideissä niitä onkin vain kaksi. Kolmannen rasvahapon tilalla on fosfolipideissä fosfaattiryhmä.⁴ Tähän fosfaattiryhmään on vielä kiinnittyneenä jokin alkoholi esimerkiksi aminoalkoholi. Alla, kuvassa 2, on esitetty yhden fosfolipidin, lesitiinin rakennekaava. Siinä glyseroliin on kiinnittyneenä kaksi pitkäketjuista karboksyylihappoa, oktadekaanihappo (steariinihappo) ja cis-9-oktadekeenihappo (cis-öljyhappo) sekä fosfaattiryhmä, johon on kiinnittyneenä aminoalkoholi, koliini. Fosfolipidien rakenteessa on kaksi ”normaalia” esterisidosta eli karboksylaattiryhmää sekä fosfodiesterisidos. Myös fosfodiesterisidoksessa esterisidos on muodostunut happo- ja alkoholiryhmän välille.



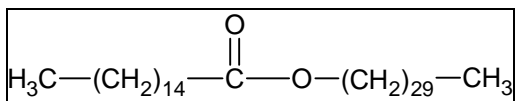
Kuva 2. Lesitiini.⁵

Kuvassa 2. on yhtenäisellä viivalla ympyröity glyserolitähde ja katkoviivalla koliinitähde. Pitkät rasvahappoketjut muodostavat lesitiinin poolittoman eli hydrofobisen pään ja fosforihappotähde ja positiivisesti varautunut koliini muodostavat molekyylin poolisen eli hydrofiilisen pään.

Solukalvojen rakenneaineina fosfolipidit muodostavat kaksoiskerroksia, joissa pooliset päät osoittavat ulospäin ja pitkät poolittomat rasvahappohännät ovat sisäpuolella.

2.3 Vahat

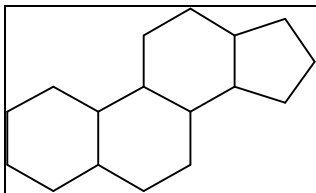
Samoin kuin rasvat ja fosfolipidit, myös vahat ovat estereitä. Rakenne eroaa kuitenkin edellisistä siten, että niiden rakenteessa ei ole glyserolia. Esterisidos muodostuu yhdenarvoisen pitkäketjuisen alkoholin ja pitkäketjuisen karboksyylihapon välille. Esimerkkinä vahoista kuvassa 3 on mehiläisten tuottama mehiläisvaha⁴, joka koostuu palmitiinihaposta (heksadekaanihappo) sekä 1-triakontanolista, joka on suoraketjuinen tyydyttynyt yhdenarvoinen alkoholi.⁶



Kuva 3. Mehiläisvaha koostuu palmitiinihaposta ja triakontanolista.⁴

2.4 Steroidit

Steroidimolekyylit koostuvat neljästä yhdistyneestä hiilirenkaasta, joista kolme on kuusihiilisiä ja neljäs viisihiilinen. Kuvassa 4 on steroidien perusrunko, joka on yhteinen kaikille steroideille.



Kuva 4. Steroidien runkorakenne.⁴

Elimistössä on steroideja, jotka ovat muodostuneet pitkien rasvahappoketjujen muodostaessa renkaita, mutta koska steroidien rakenteeseen ei kuulu rasvahappoja sellaisenaan, ei niitä tässä yhteydessä käsitellä tämän enempää.

3 RASVAHAPPOJEN NIMEÄMISESTÄ

Tärkeimmät asiat, jotka ovat määrääviä rasvahappojen nimeämisessä, ovat hiilivetyketjun pituus sekä tyydyttyneisyyden aste. Rasvahapot voivat olla tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä. Tyydyttyneet rasvahapot sisältävät vain yksinkertaisia hiili-hiilidoksia, kun taas tyydyttymättömät rasvahapot voivat sisältää yhden tai useampia hiili-hiili-kaksoisidoksia. Rasvahapot nimetään kuten lyhyemmätkin karboksyylihapot systemaattisesti. Liitteessä 1 olevassa taulukossa on esitetty joidenkin yleisimpien rasvahappojen rakenteita, systemaattisia nimiä sekä triviaalinimiä.

Systemaattisesti nimettäessä on myös ilmoitettava kaksoisidosten paikat rakenteessa. Jos numeroiminen aloitetaan karboksyylihapporyhmän hiilestä, niin symbolina käytetään Δ . Sen yläindeksinä on hiilen numero, josta kaksoisidos lähtee. Esimerkiksi merkintä *cis*- Δ^9 tarkoittaa, että hiilien 9 ja 10 (ensimmäinen hiili on karboksyyliin kuuluva hiili) välissä on *cis*-kaksoisidos.

Toinen tapa ilmoittaa kaksoisidosten paikat on aloittaa hiilien laskeminen ketjun vastakkaisesta päästä eli metyyliin kuuluva hiilestä, ω -hiilestä. Kaikki rasvahapot, joiden ensimmäinen kaksoisidos on kolmannessa hiilessä metyyliin kuuluva hiilestä laskettuna, kuuluvat ω -3 rasvahappoihin.⁷ Samalla logiikalla muodostavat tietyn rakenteen omaavat rasvahapot ω -6, ω -9 ja ω -12 rasvahappojen ryhmät.

Merkintä 18:0 tai C18:0 tarkoittaa, että rasvahapossa on kahdeksantoista hiiltä ketjussa ja nolla kaksoisidosta eli rasvahappo on tyydyttynyt. Vastaavasti eikosapentaenihappo eli EPA:a merkittäisiin 20:5. Jos haluttaisiin vielä tarkentaa, että rasvahappo kuuluu omega-3 ryhmään, voidaan käyttää merkintänä 20:5n-3.

4 RASVAHAPOT ELIMISTÖSSÄ

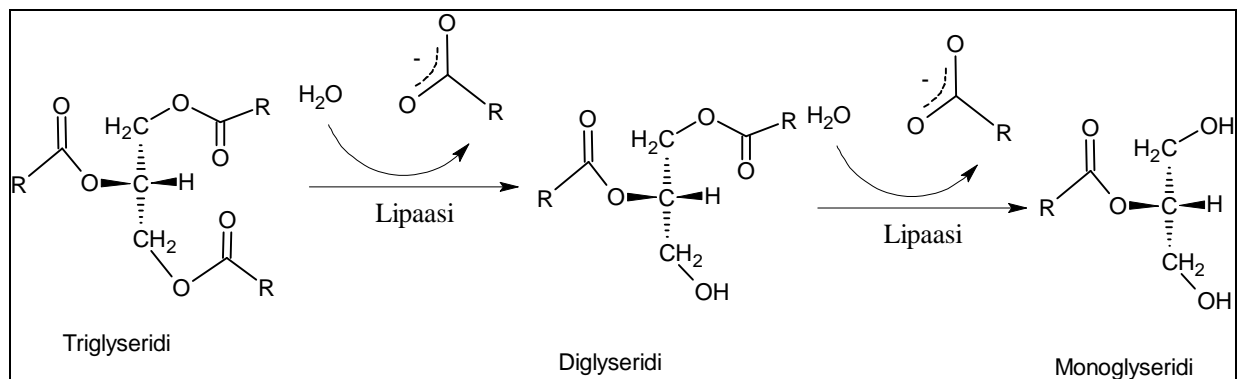
Jo neljän vuosikymmenen ajan ollaan oltu tietoisia siitä, että monitydyttymättömien rasvahappojen merkitys ihmisen ravinnossa on suuri. Sen lisäksi, että ne toimivat solukalvojen rakennusaineina, ne toimivat ”polttoainemolekyyleinä” ja solujen välisinä signaalimolekyyleinä.⁷

Sekä omega-3, että omega-6 rasvahapot toimivat myös eikosanoidien esiasteina. Eikosanoidit ovat hormonien kaltaisia yhdisteitä, joilla on tärkeä rooli elimistössä.⁸ Tämän lisäksi näillä monitydyttymättömillä rasvahapoilla on tärkeä rooli näkemiseen, hermostoon ja lisääntymiseen liittyvissä elimistön systeemeissä.⁹

Tärkeimmät omega-3 ryhmään kuuluvat rasvahapot ovat eikosapentaeenihappo (EPA, C20:5), dokosaheksaeenihappo (DHA, C22:6) ja alfa-linoleenihappo (ALA, C18:3)

4.1 Toimiminen ”polttoainemolekyylinä”

Rasvoja saadaan elimistöön ravinnosta. Imeytyäkseen verenkiertoon rasvat pitää ensin pilkkoa pienemmiksi yksiköiksi. Sappisuolat erottavat rasvan pieniksi miselleiksi, jolloin haiman lipaasi pääsee toimimaan. Lipaasi hajottaa triglyserolit monoglyseroliksi ja kahdeksi vapaaksi rasvahapoksi kuvan 5 mukaisesti.

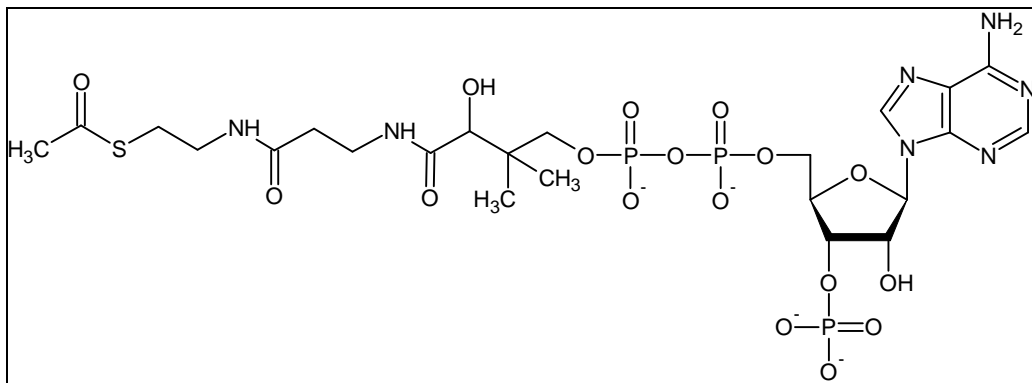


Kuva 5. Haiman lipaasi pilkkoo triglyseridit.⁷

Osat kulkeutuvat veren mukana kudoksiin, joissa ne joko varastoidaan taas triglyserideinä tai käytetään energian tuottamiseen.

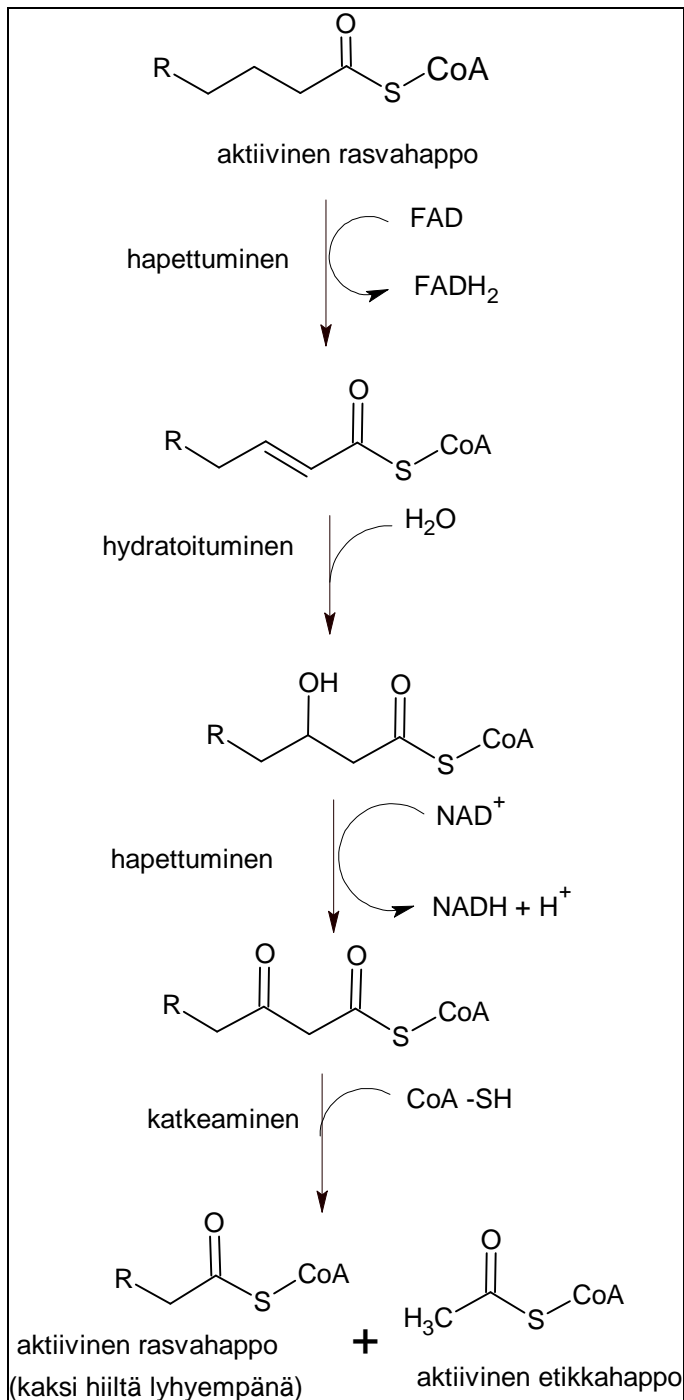
Rasvojen metabolisessa hapettumisessa vapautuu elimistöön enemmän energiaa kuin esim. hiilihydraattien hapettumisessa. Rasvojen hapettuminen vaatii myös happea enemmän. Tämä selittyy sillä, että rasvojen rakenteessa on enemmän hiiliä, jotka ovat erittäin pelkistyneessä metyyli muodossa, kun taas esim. hiilihydraateissa hiilet ovat jo hapettuneessa muodossa.¹⁰

Elimistön tarvitessa energiaa triglyseridit hydrolysoituvat glyseroliksi ja vapaiksi rasvahapoiksi. Tätä kutsutaan lipolyysiksi. Kulkeuduttuaan kudoksiin, joissa tarvitaan energiaa, rasvahapot aktivoituvat ja siirtyvät mitokondrioon. Mitokondrioissa rasvahappojen hiiliketjut pilkkoutuvat beetaoksidaatiossa kahden hiilen mittaiseksi asetyyliksi, joka esteröityy asetyylikoentsyymi-A:n kanssa aktiiviseksi etikkahapoksi (kuva 6). Aktiivinen etikkahappo hapettuu edelleen hiilidioksidiksi ja vedeksi sitruunahappokierrossa. Prosessissa vapautuu energiaa elimistön käyttöön.⁷



Kuva 6. Asetyylikoentsyymi-A:n rakenne (Ac-CoA, aktiivinen etikkahappo)⁵

Betaoksidaatiossa tyydyttynyt rasvahappo aktivoituu (aktiivinen rasvahappo, fatty acyl-CoA) ja hapettuu flaviiniadeniinidinukleotidin (FAD) toimiessa koentsyyminä. Tällöin molekyyliin syntyy uusi hiili-hiili kaksoissidos. Tämän jälkeen kaksoissidokseen liittyy vettä, jonka jälkeen syntynyt hydroksyyliiryhmä hapettuu nikotiiniamidiadeniinidinukleotidikoentsyymillä (NAD⁺) avulla ketoniksi. Lopuksi molekyyli katkeaa kahden karbonyylihapen välisestä kohdasta koentsyymi A:n vaikutuksesta, jolloin tuloksena on aktiivinen etikkahappo ja aktiivinen rasvahappo, jonka ketjun pituus on kaksi hiiltä lyhyempi kuin alkuperäinen rasvahappo. Tämä prosessi jatkuu edelleen, kunnes koko alkuperäinen rasvahappo on muuttunut aktiiviseksi etikkahapoksi. Tämän prosessin vaiheet on esitelty kuvassa 7.



Kuva 7. Betaoksidatio, jossa rasvahappo pilkkoutuu aktiiviseksi etikkahapoksi. Reaktiossa vapautuu energiaa.¹⁰

Tyydyttymättömien rasvahappojen pilkkoutumisreaktiot ovat pääpiirteittäin samanlaiset. Kuitenkin ennen trans-sidoksen hydratoitumista on tyydyttymättömien rasvahappojen cis-sidokset muutettava trans-muotoon. Tähän reaktioon osallistuu joko enoyyli-CoA isomeraasi tai 2,4-dienoyyli-CoA reduktiaasi.¹⁰

4.2 Rasvahappojen synteesi elimistössä

Rasvahappojen synteesi tapahtuu sytoplasmassa. Se on pääpiirteittäin edellä kuvatun pilkkoutumisreaktion vaiheita päinvastaiseen suuntaan noudattava prosessi. Tässä monivaiheisessa prosessissa rasvahapposyntaasi kokoaa rasvahappomolekyylin alkaen kahden hiiliatomin pituisista aktiivisista etikkahapoista. Näitä yksiköitä saadaan muista elimistössä tapahtuvista reaktioista, esim. glykolyysin jälkeisessä puryvaatin oksidaatiossa. Rasvahapposynteesin päätuotteena on 16 hiiliatomin pituinen palmitiinihappo ja jonkin verran muodostuu myös 18 hiiliatomin mittaista steariinihappoa. Muut rasvahapot muodostuvat näistä pidennys- ja desaturaatioreaktioilla, joita katalysoivat tietyt desaturaasi- ja elongaasi-entsyymit. Tavallisimmat tyydyttymättömät rasvahapot eläinsoluissa ovat öljyhappo (18:1) ja palmitoleiinihappo (16:1). Nisäkäsolut eivät pysty valmistamaan kaksoissidosta kauemmaksi kuin 9 asemaan karboksyylihappopäästä lukien. Tämän takia näitä rasvahappoja on saatava ravinnosta. Tästä syystä linolihappoa (18:2n-6) ja linoleenihappoa (18:3n-3) kutsutaan välttämättömiksi rasvahapoiksi.¹⁰

4.3 Omega-3 rasvahappojen merkitys terveydelle

On esitetty, että varsinkin länsimaissa tyypillinen ruokavalio, joka sisältää paljon omega-6 rasvahappoja, mutta vähän omega-3 rasvahappoja, ei ole kovin hyvä elimistön toiminnalle. Näiden rasvahappojen puutteen on todettu yhdistyvän erilaisiin tauteihin, kuten sydän- ja verisuonitauteihin, tulehdus- ja autoimmuunisairauksiin, sokeritautiin, depression ja neurologisiin häiriöihin.^{9,11}

Omega-3 rasvahapoilla on todettu olevan monenlaisia terapeuttisia ja lääkinnällisiä käyttökohteita. Niistä valmistetuilla tuotteilla on positiivisia vaikutuksia sydämen ja verenkiertoon liittyvien ongelmien hoitamisessa, sekä vaikutuksia tulehduksien ja jopa syövän hoidossa.⁹

Seuraavassa luvussa käsitellään menetelmiä, joita voidaan käyttää omega-3 rasvahappojen eristämiseen ja rasvahappovalmisteiden teolliseen valmistamiseen.

5 OMEGA-3 RASVAHAPPOSEOSTEN MUOKKAUSMENETELMIÄ

Mikäli ravinnosta ei saada tarpeeksi omega-3 rasvahappoja, on mahdollista syödä rasvahappoja ravintolisänä. Tällaiset ravintolisät ovat yleensä erilaisia kapseleita, jotka sisältävät kalaöljyä, erityisesti yleensä kalanmaksaöljyä. Jotta näillä tuotteilla olisi rasvahappojen suhteen tarpeeksi vaikutusta, on niitä otettava niin paljon, että riski saada A-vitamiinia ja D-vitamiinia liikaa lisääntyy. Samalla lisääntyy kolesterolin sekä muiden tyydyttyneiden rasvahappojen saanti. Tämän takia on kehitetty rasvahappotiivisteitä.^{8,12}

Rasvahappotiivisteet voidaan valmistaa konsentroimalla eli poistamalla ei-toivottuja rasvahappoja sisältävät rasvat seoksesta, jolloin jäljelle jää suurempi pitoisuus haluttuja rasvahappoja sisältäviä rasvoja. Voidaan myös valmistaa vapaita rasvahappoja sisältäviä tiivisteitä sekä rasvahappojen metyyli- ja etyyliesteritiivisteitä.⁸

Pitkäketjuisia monitydyttymättömiä omega-3 rasvahappoja, erityisesti EPA ja DHA -happoja on paljon meressä elävissä kala- ja nisäkäslajeissa. Etenkin Atlantin valtameressä alhaisemmissa lämpötiloissa asustavissa kalalajeissa on paljon omega-3 rasvahappoja. Nämä merestä saatavat öljyt toimivat erilaisten rasvahappovalmisteiden raaka-ainelähteinä. Öljyissä rasvahapot ovat triglyserideinä, joiden erottaminen on hankalaa. Näiden triglyserideissä olevien rasvahappojen hiiliketjun pituus ja tyydyttyneisyysaste vaihtelevat suuresti. Näiden ominaisuuksien takia erottaminen on kuitenkin mahdollista.⁸

Seuraavaksi käsitellään muutamia menetelmiä, joilla on mahdollista erotella eri rasvahappoja toisistaan.

5.1 Kromatografiset menetelmät

Käänteisfaasikromatografia on ehkä kaikista erotusmenetelmistä suosituin. Sitä käytetään usein täydentämään urean avulla suoritettua kiteyttämistä. Menetelmä koostuu kolmesta kohdasta: kalaöljyn triglyseridien hajottaminen vapaiksi rasvahapoiksi saippuoimismenetelmällä, rikastamalla vapaiden rasvahappojen seos jonkin tietyn hapon

suhteen kiteyttämällä urean avulla ja eri rasvahappojen erottaminen käänteisfaasikromatografian avulla.⁹

Kromatografia perustuu pakkausmateriaalin ja vapaiden rasvahappojen välisiin erilaisiin vuorovaikutuksiin. Toisilla rasvahapoilla on enemmän vuorovaikutusta pakkausmateriaalin kanssa kuin toisilla. Erotusta voidaan parantaa kytkemällä kolonneja sarjaan ja lisäämällä antioksidanttia estämään rasvahappojen hapettuminen.⁹ Antioksidanttina voidaan käyttää esimerkiksi butyylihydroksianisolia, joka on 2-tert-butyyli-4-hydroksianisolin ja 3-tert-butyyli-4-hydroksianisolin seos ja joka tunnetaan lisäainekoodilla E320. Elintarvikeviranomaiset tosin epäilevät aineen aiheuttavan yliherkkyyttä.¹³

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) käyttää korkeata painetta pakottaakseen ajoliuoksen kulkemaan pakatun kolonnin läpi. Kolonni on pakattu hyvin hienojakoisilla partikkeleilla, jotka aiheuttavat suuremman virtausvastuksen kolonnin läpi kulkevalle nesteelle, kuin isommat partikkelit. Näin saadaan erotus tapahtumaan paremmin ja jotta virtaus olisi suuresta vastuksesta huolimatta käytännöllinen, on näyte pakotettava kolonnin läpi suurella paineella.¹⁴

Rasvahappojen erotuksessa voidaan käyttää esimerkiksi seuraavanlaisia kolonneja: hopeanitraatilla kyllästettyä silicageelikolonnia, fenyyli-silicageelikolonnia, piihappokolonnia (silic acid), hopealla kyllästettyä hartsikolonnia.⁸

Erotukseen vaikuttaa tietysti käytetyn pakkausaineen lisäksi liuotin, johon näyte on liuotettu. Rasvahappojen estereiden erotuksessa käytettävän liuottimen valinta riippuu tuotteen halutusta puhtaudesta sekä tuotteen lopullisesta käyttötarkoituksesta. Liuottimina voidaan käyttää esimerkiksi n-heksaania, dietyylieetteriä, asetonitriiliä, metanolia tai vettä. Näitä käytetään erilaisina seoksina, joiden koostumus vaikuttaa erotuksen lopputulokseen. Myös tetrahydrofuraanilla (THF) on saatu valmistettua hyvin puhtaita tuotteita, mutta koska THF hapettuu helposti ja saattaa olla räjähtävää ei sitä voida käyttää varsinkaan silloin, kun lopullinen käyttötarkoitus on tuotteen käyttäminen ravintolisänä.⁸ Tätä on mietittävä kaikkien liuottimien kohdalla.

5.2 Tislausmenetelmä

Tislausmenetelmät eivät ole tarpeeksi tehokkaita, mutta niitä on käytetty rasvahappoesteriseosten osittaiseen erotukseen. Tislausmenetelmät käyttävät hyväkseen rasvahappojen kiehumispisteiden eroja sekä eroja molekyylipainossa. Eniten käytetty menetelmä on rasvahappojen metyyliestereiden fraktiotislaus alipaineessa (0,1 - 1,0 mmHg). Jopa tässä paineessa tarvitaan kuitenkin myös suhteellisen korkeita lämpötiloja. Korkeiden lämpötilojen käyttö altistaa kuitenkin pitkäketjuiset omega-3 rasvahapot hydrolysoitumiselle, termiselle hapettumiselle, polymeroitumiselle sekä isomeroitumiselle, jolloin alkuperäinen molekyyli vahingoittuu. Tutkimukset osoittavat, että rasvahappojen etyyliestereiden tislaminen onnistuu paremmin kuin vastaavien vapaiden rasvahappojen tislaminen.⁸

5.3 Entsymaattiset menetelmät

Lipaasit ovat entsyymiryhmiä, jotka katalysoivat rasvahappojen esteröitymistä, rasvahappoestereiden hydrolyysiä ja rasvahappojen vaihtumista niiden estereissä.⁸

5.3.1 Entsymaattinen hydrolyysi

Tiivisteitä valmistettaessa voidaan myös ensin hydrolysoida eri triglyseridit ja vasta sen jälkeen konsentroida seos. Hydrolysointi voidaan tehdä joko kemiallisesti tai entsyymaattisesti. Entsyymaattisessa hydrolysoinnissa käytetään matalampia lämpötiloja, jolloin on pienempi mahdollisuus rasvahapon epätoivotulle muuttumiselle hapettumisen tai cis-trans-isomeroitumisen johdosta.¹⁵

Lipaasit ovat entsyymiryhmä, johon kuuluvat entsyymit katalysoivat hyvin rasvojen hydrolyysireaktioita. Lipaasit toimivat hyvin hydrolyysireaktioissa, joissa mukana olevat rasvahapot ovat tyydyttyneitä tai monotyydyttymättömiä, mutta reaktiot, joissa on mukana pitkäketjuisia ja monityydyttymättömiä omega-3 rasvahappoja eivät onnistu yhtä hyvin kaikilta lipaaseilta. Tämä johtuu steerisestä esteestä, joka syntyy rasvahapoissa olevista monista kaksoisidoksista: molekyyli on niin monin kerroin taittunut, että lipaasi ei mahdu

toimimaan. Tästä syystä lipaaseja voidaan käyttää erottamaan EPA ja DHA muista rasvahapoista.⁸

Edellisen periaatteen mukaisia tutkimuksia on tehty enemmän, mutta on tutkittu myös lipaaseja, jotka pystyvät hydrolysoimaan EPA:a ja DHA:ta sisältäviä triglyseridejä. Meksikolaisessa tutkimuksessa käytettiin *Pseudomonas* sp. lipaasia, joka hydrolysoi EPA ja DHA:ta sisältäviä triglyseroleja sardiiniöljystä. Tämän entsymaattisen hydrolyysin jälkeen vapaat rasvahapot erotettiin seoksesta sekä metyloitiin ja eri rasvahappojen pitoisuus määritettiin kaasukromatografilla.¹⁵

Lisäksi lipaasien avulla on mahdollista tehdä eroa EPA:n ja DHA:n välillä, jolloin voidaan valmistaa joko EPA:n tai DHA:n suhteen rikkaita rasvahappotiivisteitä.⁸

Rasvahappojen entsymaattisessa hydrolyysissä liuotetaan ensin entsyymi sopivaan puskuriliuokseen, jonka jälkeen lisätään hydrolysoitava rasva. Seosta sekoitetaan ja lämpötila pidetään sopivana. Seoksesta otetaan näytteitä tietyin väliajoin ja kun haluttu pitoisuus on saavutettu, lisätään seokseen alkoholia, joka deaktivoi entsyymien. Seoksesta määritetään vapaiden rasvahappojen pitoisuudet.⁸

Entsyymien toimintaa hydrolysoida tietyn tyyppisiä rasvoja ja näin lisätä jonkin tietyn omega-3 rasvahapon estereiden pitoisuutta hydrolysoitumattomassa osassa, on tutkittu paljon. Tanaka et al.¹⁶ havaitsivat, että *Candida cylindracea*, CC-lipaasi oli kaikkein tehokkain mikrobiininen lipaasi hydrolysoimaan tonnikalan öljyä siten, että hydrolysoitumattoman öljyn osan DHA-pitoisuus nousi kolminkertaiseksi alkuperäiseen verrattuna.

Tällaista entsyymejä hyödyntävää tutkimusta on tehty paljon ja tutkijat ovat todenneet, että lipaasien spesifisyys on tärkein tekijä, kun valmistetaan erilaisia tuotteita merenelävistä saatavista öljyistä.⁸

5.3.2 Entsymaattinen esteröinti

Mikäli halutaan lisätä rasvahappojen saantia, on elimistölle suotuisampaa, että rasvahapot ovat mieluummin triglyserideinä kuin erilaisina etyyli- ja metyyliestereinä. Rasvahappoja

myydään ravintolisinä kummankinlaisessa muodossa, mutta elimistö käsittelee paremmin ”normaalirasvojen” tyyppisiä molekyylejä eli neutraalilipidejä eli triglyseroleja.⁸

Erilaisten lipaasien katalysoimia esteröitymisreaktioita on tutkittu paljon. Tiedetään esimerkiksi, että *Chromobacterium viscosum*, CV-lipaasi katalysoi hyvin glyserolin ja vapaiden rasvahappojen (sisältäen EPA ja DHA) suoraa esteröitymisreaktiota. Näissä esteröitymisreaktioissa määräävin tekijä on veden määrä tasapainoreaktiossa. Jos vettä on paljon, siirtyi reaktiotasapaino hydrolyysin suuntaan ja jos taas vettä on liian vähän, entsyymi deaktivoituu. Optimi veden määrä on siis minimi, jossa entsyymi pystyy toimimaan. Näin pienennetään osittaisen hydrolyysin ja mono- ja diglyserolien syntyminen.⁸

5.4 Kiteyttäminen alhaisessa lämpötilassa

Menetelmä perustuu rasvahappojen erilaisiin liukoisuuksiin orgaanisiin liuottimiin sekä niiden erilaisiin sulamispisteisiin. Rasvahappojen tyydyttyneisyysaste ja ketjun pituus sekä haaroittuneisuus vaikuttavat niiden ominaisuuksiin.

Shahidi et al.⁸ esittävät artikkelissaan kirjallisuudesta löytämiään liukoisuussääntöjä:

- tyydyttyneistä rasvahapoista lyhytketjuiset ovat liukoisempia
- tyydyttyneet rasvahapot ovat niukkaliukoisempia kuin samanpituiset yhden tai kahden kaksoissidoksen omaavat rasvahapot
- tyydyttymättömistä rasvahapoista cis-isomeerit ovat liukoisempia kuin trans-isomeerit
- suoraketjuiset rasvahapot ovat niukkaliukoisempia kuin haaroittuneet

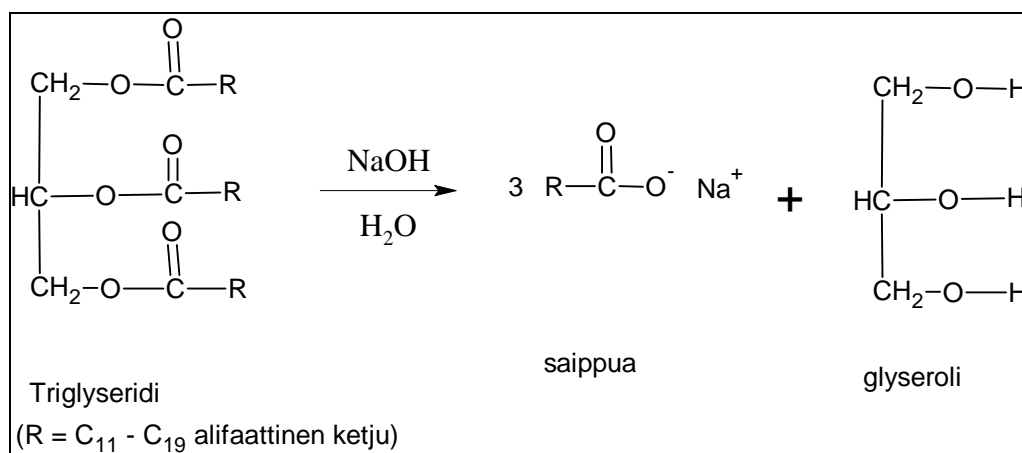
Näiden liukoisuussääntöjen perusteella on mahdollista erottaa eri rasvahappoja toisistaan. Kiteyttäminen voidaan suorittaa esimerkiksi metanoli/asetoni -seoksessa. Kiteyttämismenetelmässä lopputuloksen omega-3 rasvahappopitoisuuden vaikuttaa käytettyjen liuottimien valinta sekä lämpötila. Menetelmä on yksinkertainen sekä tarvittavan laitteiston että työvaiheiden suhteen. Tarvitaan vain erotettavan seoksen (öljy) jäädyttämistä liuottimessa sopivaan lämpötilaan, seoksen pitämistä halutussa lämpötilassa tietyn ajan (eli kiteytymisen odottelua) ja kiteytyneen osan erotus suodattamalla.⁸

5.4.1 Natriumsuolojen kiteyttäminen

Shahidi et al.⁸ kertovat artikkelissaan korealaisesta tutkimuksesta, jossa tutkijat huomasivat, että vähemmän tyydyttymättömien (vähemmän kaksoissidoksia sisältävien) rasvahappojen alkalisuolat kiteytyvät nopeammin liuoksen jäähtyessä, kuin niiden tyydyttymättömien rasvahappojen alkalisuolat, joissa on neljä tai useampi kaksoissidos (kuten EPA ja DHA).

Tämä menetelmä sisältää rasvahappojen alkalisuolojen valmistuksen, jota käytetään hyväksi myös saippuan valmistuksessa. Siinä rasvoja hydrolysoidaan emästen, kuten NaOH tai KOH, kanssa, jolloin rasvahapot irtoavat glyserolista ionisoituneina Na⁺ ja K⁺ -suoloina.^{10,17}

Tätä reaktiota voidaan kuvata esimerkiksi seuraavasti:



Kuva 8. Saippuoitusreaktio.¹⁷

Tämän menetelmän tuloksiin ei näyttänyt vaikuttavan jäähtymisen nopeus eikä jäähtytysalue.⁸ Tämä menetelmä voisi olla käytännöllinen erilaisia omega-3 rasvahappovalmisteita valmistettaessa suuressa mittakaavassa.

Guil-Guerrero et al.¹⁸ ovat julkaisseet artikkelin menetelmästä, joka perustuu näihin liukoisuuseroihin. Tämä menetelmä on yksivaiheinen. Siinä kolme eri asiaa; eristys, kemiallinen hydrolyysi ja rasvahappojen konsentroiminen tapahtuvat yhdellä kertaa. Menetelmä perustuu rasvahappojen natriumsuolojen erilaiseen liukoisuuteen etanoliin. Enemmän kaksoissidoksia sisältävät ja lyhyemmät saman tyydyttyneisyysasteen omaavat

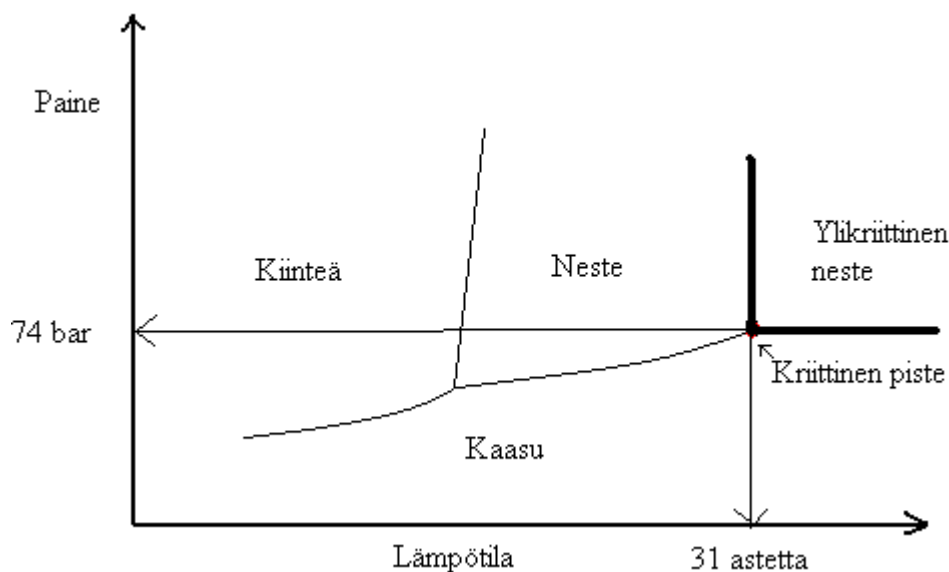
rasvahappojen suolat liukenevat paremmin etanoliin, jolloin lämpötilan laskiessa seoksessa ei-toivotut vähemmän kaksoissidoksia sisältävät rasvahapot kiteytyvät ja ne voidaan suodattaa seoksesta pois.

5.5 Eristys ylikriittisen nesteen avulla

Joillakin kaasuilla tiedetään olevan erityisiä ominaisuuksia, kun ne saavuttavat kriittisen pisteensä. Tämän ylitettyä niitä kutsutaan ylikriittisiksi nesteiksi, joilla viskoosi- ja diffuusio-ominaisuudet ovat lähempänä kaasujen ominaisuuksia kuin tavallisten nesteiden.⁸

Hiidioksidi (CO_2) on todettu hyväksi ylikriittiseksi nesteeksi, jota käytetään rasvahappojen erotuksessa. Tämän tekniikan avulla voidaan erottaa aineita, jotka ovat herkkiä liian korkealle lämpötilalle tai hapettumiselle. Menetelmässä ei myöskään tarvitse käyttää toksisia liuottimia, kuten heksaania. Hiilidioksidi ei ole toksinen eikä helposti syttyvä, se on halpaa ja se voidaan erottaa helposti seoksesta.¹⁹

Hiilidioksidin kriittinen piste sijaitsee aika helposti saavutettavalla alueella ($p = n. 74 \text{ bar}$, $T = n. 31^\circ\text{C}$). Seuraavalla sivulla olevassa kuvassa on esitetty hiilidioksidin faasidiagrammi. Vaaka-akselilla on lämpötila ja pystyakselilla paine. Kriittinen piste ja ylikriittisen nesteen alue on merkitty punaisella.⁸

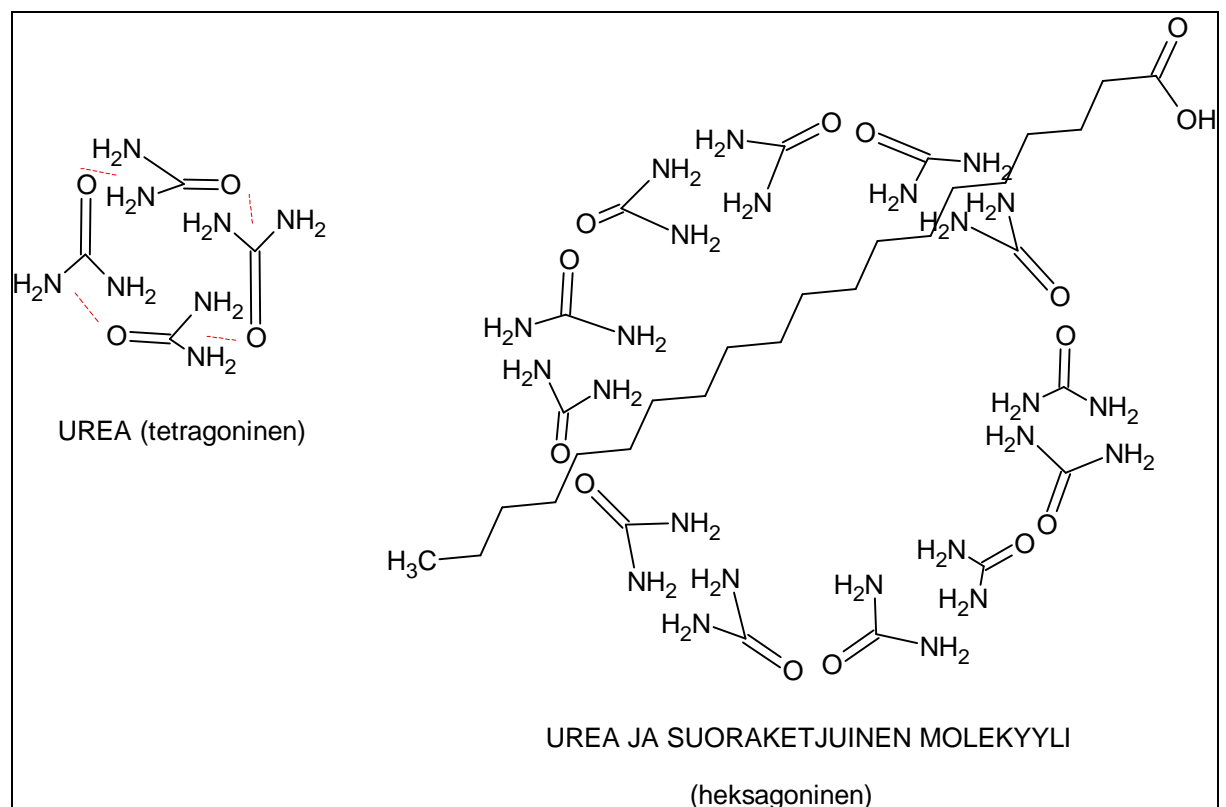


Kuva 9. Hiilidioksidin faasidiagrammi.⁸

Erotus perustuu siihen, että vapaat rasvahapot liukenevat paremmin ylikriittiseen hiilidioksidiin kuin mono-, di- tai triglyseridit.¹⁹ Ylikriittisen nesteen avulla tapahtuva erotus perustuu enimmäkseen molekyylin molekyylimassaan kuin tyydyttyneisyysasteeseen. Tämän takia ennen ylikriittisen nesteen käyttöä tarvitaan esierottelu. Esierottelu voidaan tehdä muilla kuvatuilla menetelmillä.

5.6 Ureakompleksointi

Menetelmä perustuu siihen, että urea muodostaa komplekseja helpommin tyydyttyneiden kuin tyydyttymättömien rasvahappojen kanssa. Kompleksinmuodostustaipumus vähenee myös kaksoissidosten lisääntyessä.⁸ Tällä menetelmällä saadaan siis ei-toivotut rasvahapot kompleksoitumaan urean kanssa, jolloin kiinteä osa voidaan suodattaa liuoksesta pois.



Kuva 10. Urean tetragonaalinen kiderakenne vasemmalla ja oikealla heksagonaalinen rakenne. Tetragonaalisessa rakenteessa on esitetty ureamolekyylien väliset vetysidokset katkoviivoilla. Heksagonaalisisessa rakenteessa tyydyttynyt rasvahappo on ureamolekyylien muodostamassa kanavassa.⁸

Menetelmässä hydrolysoidaan ensin muokattavissa oleva öljy emäksisellä (NaOH tai KOH) alkoholilla, jolloin saadaan aikaiseksi ionisoituneita rasvahappojen alkalisuoloja. Tästä erotetaan ksenobiootit ja muut ei-toivotut aineet ja rasvahapposeokseen lisätään urean ja alkoholin (metanoli tai etanoli) seosta. Seuraavaksi seoksen annetaan jäähtyä tiettyyn lämpötilaan, joka riippuu halutun tuotteen rasvahappopitoisuudesta. Tällöin kiteytyvät tyydyttyneet rasvahapot ja dieenit, jotka voidaan suodattaa halutusta omega-3 seoksesta pois.

Ureakompleksointi voidaan suorittaa esimerkiksi saippuoimisreaktion jälkeen. Vapaiden rasvahappojen seos sekoitetaan kiinteän urean kanssa etanoliin. Seosta sekoitetaan ja lämmitetään varovaisesti, kunnes syntyy kirkas homogeeninen seos. Tämän jälkeen seos jäädytetään huoneenlämpötilaan ja sen annetaan kiteytyä. Kiteet poistetaan suodattamalla. Liuos laimennetaan vedellä ja tehdään hiukan happamaksi (pH 4-5) suolahapolla. Vapautuneet rasvahapot erotetaan heksaanikerrokseen ja liuotin haihdutetaan pois, jolloin jäljelle jää rasvahappokonsentraatti.⁹

Ureakompleksointimenetelmää ei ehkä kuitenkaan kannata käyttää, jos halutaan valmistaa tuotteita ihmisten käyttöön, koska sen käytöstä on raportoitu syntyvän mahdollisia karsinogeenisia aineita, etyyli- tai metyylikarbamaatteja.¹⁸

5.7 Kemiallinen hydrolysointi

Saippuointi hajottaa triglyseridit glyseroliksi ja vapaiksi rasvahapoiksi. Hydrolysointi voidaan suorittaa esimerkiksi refluksoimalla kalaöljyä KOH-vesi-etanoli seoksen kanssa typpikaasu-ilmakehässä.⁹ Typpikaasu on ilmeisesti tarpeen siksi, että halutaan estää rasvahappojen hapettuminen. Tämän jälkeen syntynyt seos laimennetaan vedellä, jolloin varautuneet rasvahapot jäävät vesifaasiin. Hydrolysoitumaton osa erotetaan heksaanikerrokseen. Vesifaasi neutraloidaan suolahapolla, jolloin rasvahapot muuttuvat happomuotoon (neutraaleiksi) ja vapaat rasvahapot erotetaan heksaanilla. Heksaanikerros erotetaan ja kuivataan kidevedettömän magnesiumsulfaatin avulla. Muodostunut sakka erotetaan imusuodatuksella ja liuoksesta haihdutetaan liuotin pois. Jäljelle jää vapaiden rasvahappojen seos.⁹

6 YHTEENVETO

Rasvojen rasvahappokoostumukseen voidaan vaikuttaa monella eri tavalla. Käytettävän menetelmän valinnassa on otettava huomioon erotuksen tarkoitus. Jos tarkoitus on ainoastaan analysoida tietyn seoksen rasvahappokoostumusta, voidaan käyttää pienen mittakaavan erotuslaitteistoja, kuten kromatografiaa sekä paljon erilaisia liuottimia. Jos taas on tarkoitus valmistaa suuria määriä tietyn rasvahappopitoisuuden omaavaa rasvahapporavinnelisää, on otettava huomioon eri vaiheissa käytettävät liuottimet ja muut apuaineet ja niiden myrkyllisyys ihmiselle. Erilaiset entsymaattiset menetelmät vaikuttavat olevan toimivia jopa suuren mittakaavan tuotantoon spesifisyytensä takia. Entsymaattisissa menetelmissä prosessiolosuhteet on säädettävä tarkalleen, jotta entsyymeillä on oikeanlainen toimintaympäristö. Myös eristys ylikriittisen hiilidioksidin avulla tuntuu toimivalta menetelmältä, tosin prosessiolosuhteiden paine on suuri. Parhain vaihtoehto on kuitenkin varmasti monien eri menetelmien yhdistäminen toimivaksi kokonaisuudeksi.

7 LÄHDELUETTELO

1. Ravitsemustieteen perusteita, Avoimen yliopiston nettisivut, haettu 6.11.2009, http://www.avoin.helsinki.fi/oppimateriaalit/ravitsemustieteen_perusteet/01_rar_ravintorasvat.shtml#7_3
2. Perusopetuksen opetussuunnitelman perusteet 2004 (POPS), Opetushallitus, säädökset ja ohjeet, Opetussuunnitelmien ja tutkintojen perusteet, haettu 5.11.2009, http://www.oph.fi/koulutuksen_jarjestaminen/opetussuunnitelmien_ja_tutkintojen_perusteet
3. Lukion opetussuunnitelman perusteet 2003 (LOPS), Opetushallitus, säädökset ja ohjeet, Opetussuunnitelmien ja tutkintojen perusteet, haettu 5.11.2009, http://www.oph.fi/koulutuksen_jarjestaminen/opetussuunnitelmien_ja_tutkintojen_perusteet
4. Zumdahl, S.S., *Chemistry*, 3.p., D.C.Heath and Company, Toronto, 1993, s. 1110.
5. Hiltunen, E., Holmberg, P., Jyväsjärvi, E., Kaikkonen, M., Lindblom-Ylänne, S., Nienstedt, W. ja Wähälä, K., *Galenos: Ihmiselämä kohtaa ympäristön*, WSOY Oppimateriaalit Oy, 2007.
6. Molecule of the week, 1-triacontanol, American Chemical Society:n nettisivut, http://portal.acs.org/portal/acs/corg/content?_nfpb=true&_pageLabel=PP_ARTICLEMAIN&node_id=841&content_id=WPCP_008261&use_sec=true&sec_url_var=region1&__uuid=0451c0a6-2654-43dd-80a5-150e91dc9165, haettu 18.10.2009.
7. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. ja Stryer, L., *Biochemistry*, 5.p., W.H.Freeman and Company, New York, 2002.
8. Shahidi, F. ja Wanasundara, U. N., *Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies*, Trends in Food Science & Technology 9 (1998) 230-240.
9. Hidajat, K., Ching, C.B. ja Rao, M.S., *Preparative-scale liquid chromatographic separation of ω -3 fatty acids from fish oil sources*, Journal of Chromatography A **702** (1995) 215-221.
10. Mathews, C. K. ja van Holde, K. E., *Biochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990, s. 300.

11. Lehto, T., *Uusinta tietoa rasvahappojen terveystieteistä*, 2004, artikkeli MDD Terveyspalveluiden nettisivujen uutisarkistossa, http://www.mdd.fi/Pages/uutisia11_03_04.html, haettu 5.10.2009.
12. Gámez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Medina-Juárez, L.A., Ortega-García, J., Monroy-Rivera, J., Toro-Vázquez, F.J., García, H.S. ja Angulo-Guerrero, O., *Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation*, *Food Research International* **36** (2003) 721-727.
13. Elintarvikkeiden lisäaineiden E-koodiavain, Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, 2007 www.evira.fi.
14. Harris, D., *Quantitative chemical analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 1987, s. 646-648.
15. Bottino, Vanderburg & Reiser, 1967, Henderson, Burkow & Millar, 1993, Lawson & Hughes, 1988.
16. Tanaka, Y., Hirano, J. ja Funada, T., *Concentration of Docosahexaenoic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oils with Candida cylindracea Lipase*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **69** 1992 1210-1214.
17. McMurry, J., *Organic Chemistry*, Thompson Learning, Inc 2008.
18. Guil-Guerrero, J.L., López-Martínez, J.C., Rincón-Cervera, M.A. ja Campra-Madrid, P., *One-Step Extraction and Concentration of Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Liver*, *J Amer Oil Chem Soc* **84** 2007 357-361.
19. Follegatti-Romero, L.A., Piantino, C.R., Grimaldi, R. ja Cabral, F.A., *Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) seeds*, *The Journal of Supercritical Fluids* **49** 2009 323-329.
20. Fennema, O. R.(edit.), *Food Chemistry*, Marcel Dekker Inc., 1985, s.142.

8 LIITTEET

Taulukko 1. Joidenkin luonnossa esiintyvien rasvahappojen nimiä ja rakenteita.^{7,20}

Taulukko 1. Luonnossa esiintyviä rasvahappoja.				
Hilten lukumäärä	C=C -sidosten lukumäärä	Triviaalinimi	Systemaattinen nimi	Rakenne
12	0	lauriinihappo ²⁰	n-dodekaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
14	0	myristiinihappo ²⁰	n-tetradekaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
16	0	palmitiinihappo ²⁰	n-heksadekaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
18	0	steariinihappo ²⁰	n-oktadekaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
20	0	arakidiinihappo ²⁰	n-eikosaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
22	0	beeenihappo	n-dokosaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH
24	0	lignoseerihappo	n-tetrakosaanihappo	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH
16	1	palmitoleiinihappo	cis-Δ ⁹ -heksadekeenihappo	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
18	1	öljyhappo ²⁰	cis-Δ ⁹ -oktadekeenihappo	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
18	2	linolihappo ²⁰	cis-cis-Δ ⁹ -Δ ¹² -oktadekadieeni-happo	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH
18	3	alfalinoleeni-happo	all-cis-Δ ⁹ , Δ ¹² , Δ ¹⁵ -oktadekatrieenihappo	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH
20	4	arakidoni-happo	all-cis-Δ ⁵ , Δ ⁸ , Δ ¹¹ , Δ ¹⁴ -eikosatetraeenihappo	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COOH
20	5	EPA	all-cis-Δ ⁵ , Δ ⁸ , Δ ¹¹ , Δ ¹⁴ , Δ ¹⁷ -eikosapentaeenihappo	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₅ (CH ₂) ₂ COOH
22	6	DHA	all-cis-Δ ⁴ , Δ ⁷ , Δ ¹⁰ , Δ ¹³ , Δ ¹⁶ , Δ ¹⁹ -dokosaheksaeni-happo	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₆ CH ₂ COOH