

УДК 665.214

ВЫДЕЛЕНИЕ ЖИРА ИЗ СТЕРИЛИЗОВАННОЙ ПЕЧЕНИ  
ТРЕСКИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА ЖИРНЫХ  
КИСЛОТ

Ф.М.Ржавская, Т.А.Дубровская

Печень трески является пока единственным источником медицинского жира. Однако несмотря на многолетнее широкое применение трескового жира в медицине, он изучен недостаточно: не выявлено влияние ряда биологических и физиологических факторов на пищевую ценность трескового жира, которая определяется не только содержанием витамина А, но и составом жирных кислот вследствие их биологической активности.

В связи с этим печень трески изучают многие исследователи, что в свою очередь обуславливает необходимость решения некоторых методических вопросов. К таким вопросам относятся способ заготовки проб печени и метод выделения жира для исследования состава жирных кислот.

Окисляется жир при выделении из тканей или во время хранения главным образом под воздействием кислорода воздуха. Поэтому заготавливать пробы печени следует способом, обеспечивающим минимальное влияние кислорода воздуха. Испытанным способом сохранения качества белковых веществ является стерилизация. При стерилизации в герметичной таре печень подвергается воздействию высоких температур. Однако благодаря ограниченному количеству воздуха, соприкасающемуся с печенью и содержащимся в ней жиром, его изменения должны быть весьма незначительными. Следовательно стерилизация проб печени

в герметичной таре может обеспечить минимальное влияние кислорода воздуха и длительное сохранение белковых веществ.

При исследовании многочисленных проб стерилизованной печени трески, заготовленных ежемесячно на протяжении около двух лет, было установлено, что в ее жире продукты окисления или отсутствовали или находились в крайне малых количествах: перекисное число составляло 0-0,07% иода, альдегидное число 0-1,9 мг% коричневого альдегида, количество окисленного кислорода 2-4 и в отдельных случаях 13-19 мг%. Свободных жирных кислот также было мало; об этом свидетельствует низкое значение кислотного числа (0,1-0,7 мг КОН/г). Хорошее качество жира стерилизованной печени трески подтверждается и его органолептическими свойствами: во всех случаях жир не только не имел признаков прогорклости, но даже был лишен специфического рыбного запаха.

По имеющимся экспериментальным данным, при накоплении достаточно больших количеств продуктов окисления в тресковом жире (при перекисном числе 0,40-0,79% иода и альдегидном числе около 7 мг% коричневого альдегида) и приобретении при этом отрицательных органолептических свойств (прогорклости) не происходит деструкции молекул, существенных изменений состава высоконенасыщенных кислот и заметного образования низкомолекулярных кислот /5/. Поэтому присутствие небольших количеств продуктов окисления в жире стерилизованной печени не отражается на составе жирных кислот. Следовательно, заготовка проб печени трески путем ее стерилизации для последующего изучения состава жирных кислот вполне оправдана.

Стерилизованная печень трески, как известно, представляет собой плотную массу коагулированных белковых веществ, погруженную в большое количество жира, выделившегося в процессе стерилизации. Для исследования состава жирных кислот необходимо отобрать пробу жира, правильно отражающую состав жира исходной печени. Решить этот вопрос можно, сопоставив состав жирных кислот жира, извлеченного разными методами из плотной массы стерилизованной печени, с составом жирных кислот жира выделенного из печени в результате ее стерилизации. Цель предлагае-

мой работы — выяснение влияния метода выделения жира из стерилизованной печени трески на состав его жирных кислот.

Объектом исследования была стерилизованная печень баренцевоморской трески, добытой в апреле 1970 г. Результаты определения содержания жира и воды в плотной массе стерилизованной печени и воды в выделившемся жире с соответствующим учетом массы печени и жира показали, что в исходной печени было 28,8% воды и 65,3% жира. В жире, выделенном при стерилизации печени, присутствовало крайне мало продуктов окисления: перекисное число — 0,01% иода, альдегидное число — 0,08 мг% кофейного альдегида, иодное число — 148,1, неомыляемых веществ — 1,5%.

Жир из печени стерилизованной трески выделяли тремя способами: центрифугированием, настаиванием с хлороформом и экстракцией бинарным растворителем (хлороформом и метанолом).

Центрифугирование проводили при 6000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге ЦУМ-1.

При извлечении жира хлороформом печень, предварительно обработанную безводным сульфатом натрия в соотношении 1:1,5, настаивали с трехкратным количеством хлороформа в течение 24 ч при периодическом перемешивании; затем хлороформ отделяли фильтрованием, а остаток промывали двухкратным количеством хлороформа. Хлороформ удаляли на водяной бане в вакууме и в токе инертного газа (азота) при температуре около 30°C.

Для выделения жира экстракцией бинарным растворителем использовали метод, предложенный Фолчем и его соавторами /10/ в модификации Блайя и Дайера /9/, Кельман и Лясковский /4/, Острандера и Дюгана /11/ и в этих модификациях ранее примененный Дубровской (в 1969 г.) для исследования жира морского окуня.

Метод Фолча предусматривает применение двух растворителей разной степени полярности: хлороформа и метанола. В соответствии с условиями, предложенными Блайем и Дайером, при экстракции соблюдали определенное соотношение хлороформа, мета-

нола и воды. Экстракцию проводили при непрерывном перемешивании на аппарате для встряхивания. Начальное соотношение хлороформа, метанола и воды, достигающее 1:2:0,8, учитывает и количество воды, находящейся в исследуемом объекте; поэтому экстракции жира предшествовало определение содержания воды в печени. По истечении 10 мин. добавляли хлороформ до соотношения названных компонентов 2:2:0,8; после непрерывного перемешивания в продолжении 5 мин. вводили 2%-ный водный раствор ацетата цинка в количестве, необходимом для получения соотношения 2:2:1,8, перемешивали 30 сек и фильтрованием отделяли жидкую массу.

Фильтрат отстаивали для отделения слоя хлороформа с растворенным в нем жиром от смеси метанола с водой, а остаток вторично обрабатывали хлороформом. После фильтрования для отделения от белковых веществ хлороформ соединяли с раствором жира в хлороформе, полученном в результате первой экстракции, а затем хлороформ удаляли в вакууме и атмосфере инертного газа (азота) при температуре около 30°C.

В жире, извлеченном из стерилизованной печени тремя описанными методами, а также в жире, выделившемся из печени в процессе стерилизации и составляющем около половины весового состава исследуемого образца печени, определяли состав жирных кислот. Для этого использовали наиболее эффективный современный метод — газо-жидкостной хроматографии /6/. Хроматографии подвергали смесь метиловых эфиров жирных кислот; жирные кислоты из каждого исследуемого образца жира были специально выделены общепринятым методом, включающим следующие операции: омыление жира, удаление неомыляемых веществ, разложение солей жирных кислот, растворенных в воде (мыл), экстракцию жирных кислот серным эфиром и его удаление. Выделенные жирные кислоты метилировали в присутствии сухого хлористого водорода по видоизмененному методу Штоффеля /12/. Изменения заключались в том, что метилированию подвергали не микродозу кислот, а навеску около 0,3 г и неосаждаемые вещества удаляли не возгонкой, а экстракцией петролейным эфиром. Источником сухого хлористого водорода служил хлористый ацетил.

Условия разделения метиловых эфиров соответствовали оптимальным, специально установленным нами ранее применительно

к газовому хроматографу фирмы "Griffin and George", использованному для наших исследований.

Условия разделения метиловых эфиров жирных кислот  
жира стерилизованной печени трески на газовом  
хроматографе фирмы "Griffin and George"  
с пламенно-ионизационным детектором

Твердый носитель . . . . .	Целит-545, 60-80 меш.
Жидкая неподвижная фаза . . . . .	Диэтиленгликольсукцинат (ДЭГС), 15%
Длина и диаметр колонки, см . . . . .	200 x 0,3
Газ-носитель . . . . .	Азот особой чистоты
Давление газа-носителя, атм:	
на входе в колонку . . . . .	2
на выходе из колонки . . . . .	Атмосферное
Температура, °С . . . . .	190
Скорость движения шкалы потен- циометра, см/ч . . . . .	20
Продолжительность процесса разделения эфиров, мин . . . . .	45
Размер пробы, мкл 25%-ного раствора в гексане . . . . .	0,8-1

Для идентификации пиков хроматограммы - отдельных метиловых эфиров жирных кислот - использовали:

1) сравнение относительного удерживаемого объема идентифицируемого компонента с литературными данными об относительных удерживаемых объемах различных метиловых эфиров жирных кислот по отношению к эфирам пальмитиновой и олеиновой кислот /1, 8/;

2) линейную зависимость между логарифмом относительных удерживаемых объемов и числом атомов углерода в алифатической цепи жирных кислот /3, 7/.

Количество каждого компонента разделяемой смеси метиловых эфиров жирных кислот определяли по площади соответствующего пика на хроматограмме /1, 3, 6/.

Для определения количественного соотношения отдельных компонентов применили метод внутренней нормализации, основанной на том, что сумма площадей всех пиков хроматограммы принимается за 100%. Площадь каждого пика соответствует относительному содержанию компонента. Полученные данные приведены в таблице и на рисунках.

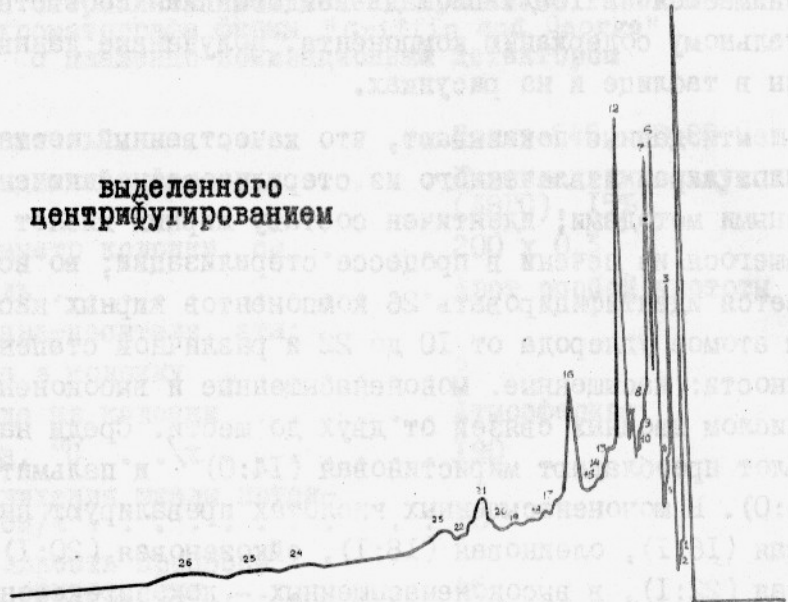
Эти данные показывают, что качественный состав жирных кислот жира, извлеченного из стерилизованной печени трески разными методами, идентичен составу жирных кислот жира, выделенного из печени в процессе стерилизации; во всех случаях удается идентифицировать 26 компонентов жирных кислот с числом атомов углерода от 10 до 22 и различной степени ненасыщенности: насыщенные, мононенасыщенные и высоконенасыщенные с числом двойных связей от двух до шести. Среди насыщенных кислот преобладают миристиновая (14:0)<sup>X/</sup> и пальмитиновая (16:0). В мононенасыщенных кислотах превалируют пальмитолеиновая (16:1), олеиновая (18:1), ейкозеновая (20:1) и докозеновая (22:1), в высоконенасыщенных – докозагексаеновая (22:6) и ейкозапентаеновая (20:5) с двойными связями, расположенными через каждые три атома углерода от пятого до семнадцатого, считая от карбоксильной группы (см. таблицу); такое расположение двойных связей соответствует концевой углеродной цепи с тремя атомами углерода.

По количественному соотношению кислот существенно выделяется жир, полученный из плотной массы стерилизованной печени трески центрифугированием: по сравнению с жиром, извлеченным экстракцией растворителями и выделенным при стерилизации, отцентрифугированный жир содержит больше олеиновой кислоты и меньше основных высоконенасыщенных кислот – ейкозапентаеновой и докозагексаеновой. Относительно низкое содержание этих кислот отмечается и визуально на хроматограмме (см. пики 23 и 26 на рисунках). Эти различия отражаются на общей сумме мононенасыщенных и высоконенасыщенных кислот: в жире, полученном центрифугированием, зафиксировано 65% мононенасыщенных и 16% высоко-

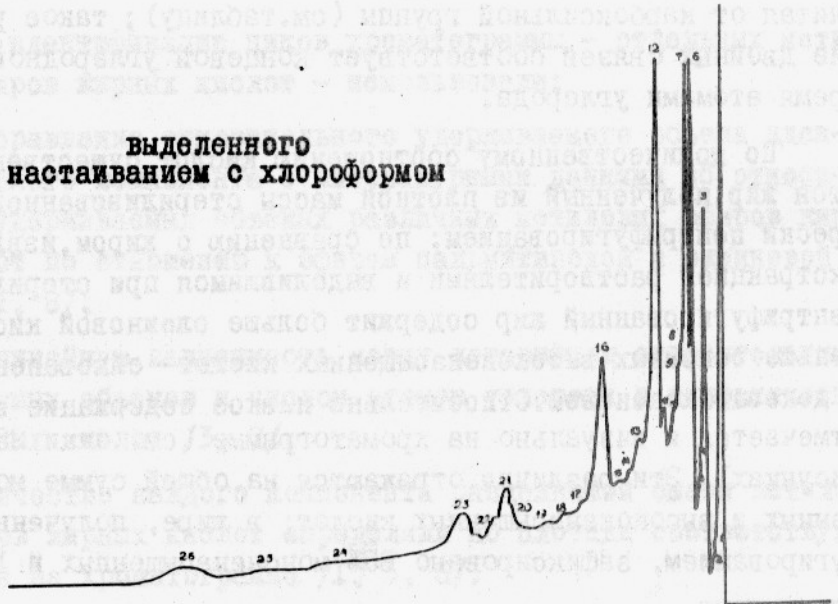
<sup>X/</sup> Число атомов углерода: число двойных связей.

**Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот**

**выделенного  
центрифугированием**

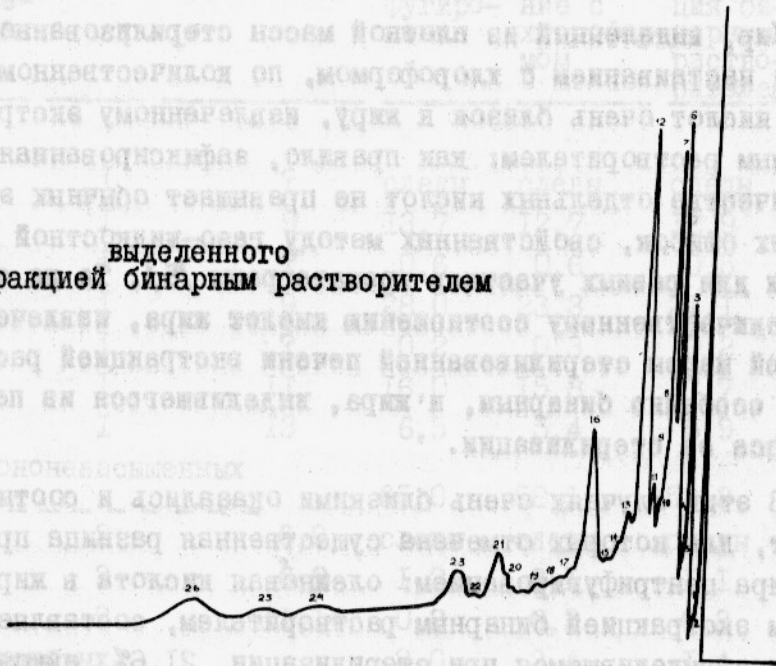


**выделенного  
настаиванием с хлороформом**

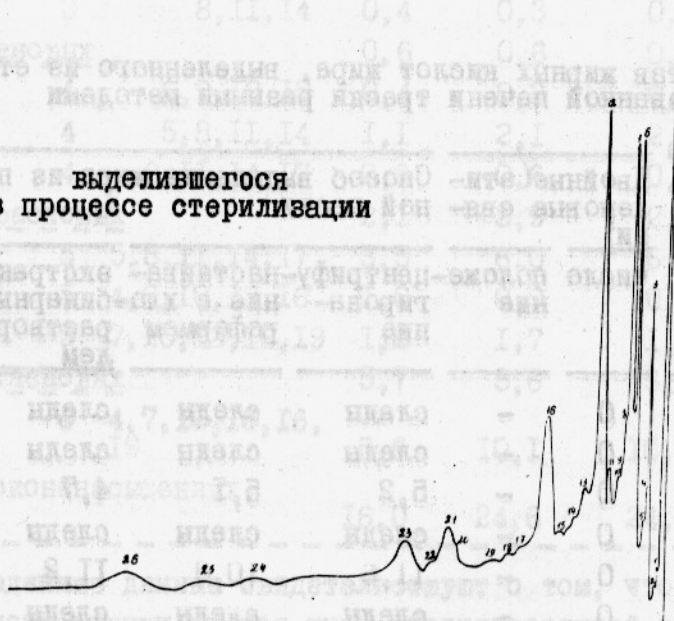


**жира из стерилизованной печени трески**

**выделенного  
экстракцией бинарным растворителем**



**выделившегося  
в процессе стерилизации**





ненасыщенных кислот против 58-59% мононенасыщенных и около 24% высоконенасыщенных кислот - в жире, полученном из печени трески другими методами.

Жир, выделенный из плотной массы стерилизованной печени трески настаиванием с хлороформом, по количественному соотношению кислот очень близок к жиру, извлеченному экстракцией бинарным растворителем: как правило, зафиксированная разница в количестве отдельных кислот не превышает обычных экспериментальных ошибок, свойственных методу газо-жидкостной хроматографии для разных участков хроматограмм /5/. То же относится и к количественному соотношению кислот жира, извлеченного из плотной массы стерилизованной печени экстракцией растворителями, особенно бинарным, и жира, выделившегося из печени в процессе ее стерилизации.

В этих случаях очень близкими оказались и соотношения кислот, для которых отмечена существенная разница при отделении жира центрифугированием: олеиновая кислота в жире, извлеченном экстракцией бинарным растворителем, составляет 21,1%, а в жире выделившемся при стерилизации, 21,6%, ейкозапентаеновая - 6,0 и 5,7%, а докозагексаеновая - 10,7 и 10,4% соответственно.

Состав жирных кислот жира, выделенного из стерилизованной печени трески разными методами

№ пи-ка	Количество атомов углерода	Двойные (этиленовые связи)		Способ выделения жира из плотной части			Жир, выделенный в процессе стерилизации
		число	положение	центрифугирование	настаивание с хлороформом	экстракция бинарным растворителем	
1	10	0	-	следы	следы	следы	следы
2	12	0	-	следы	следы	следы	следы
3	14	0	-	5,2	5,1	4,7	4,9
5	15	0	-	следы	следы	следы	следы
6	16	0	-	11,6	10,3	11,2	10,3
8	17	0	-	следы	следы	следы	следы
11	18	0	-	2,2	1,9	1,6	2,0
Сумма насыщенных кислот				19,0	17,3	17,5	17,2
I20							

№ пи-ка	Количество атомов углерода	Двойные (этиленовые связи)		Способ выделения жира из плотной части			Жир, выделенный в процессе стерилизации
		число	положение	центрифугирование	настаивание с хлороформом	экстракция би-растворителем	
4	14	I	?	следы	следы	следы	следы
7	16	I	9	13,7	12,7	12,9	13,2
10	17	I	?	0,6	0,6	0,5	0,6
12	18	I	9	28,0	23,3	21,1	21,6
14	19	I	?	0,2	0,3	0,2	0,2
16	20	I	II	16,0	15,8	17,7	17,8
21	22	I	13	6,5	5,4	5,9	5,8
Сумма мононенасыщенных кислот				65,0	58,1	58,3	59,2
9	16	2	6,9	следы	следы	следы	следы
13	18	2	6,9	1,2	2,1	1,1	1,4
18	20	2	11,14	0,8	0,3	0,3	0,4
<u>Всего диеновых</u>				2,0	2,4	1,4	1,8
15	18	3	6,9,12	0,2	0,3	0,4	0,2
19	20	3	8,11,14	0,4	0,3	0,4	0,2
<u>Всего триеновых</u>				0,6	0,6	0,6	0,6
17	18	4	6,9,12,15	0,4	0,2	0,2	0,3
20	20	4	5,8,11,14	1,1	2,1	2,3	2,4
22	20	4	8,11,14,17	0,6	0,6	0,3	0,5
<u>Всего тетраеновых</u>				2,1	2,9	2,8	3,2
23	20	5	5,8,11,14,17	3,5	6,0	6,0	5,7
24	22	5	4,7,10,13,16	1,0	0,9	0,9	0,8
25	22	5	7,10,13,16,19	1,2	1,7	1,8	1,1
<u>Всего пентаеновых</u>				5,7	8,6	8,7	7,6
26	22	6	4,7,10,13,16,19	5,6	10,1	10,7	10,4
Сумма высоконенасыщенных кислот				16,0	24,6	24,2	23,6

Приведенные данные свидетельствуют о том, что для определения состава жирных кислот жира стерилизованной печени трески

нет надобности специально извлекать жир из плотной массы стерилизованной печени; достаточно воспользоваться жиром, выделившимся из печени во время стерилизации.

### Заключение

Жир, полученный центрифугированием плотной массы коагулированных белковых веществ стерилизованной печени, по количественному соотношению некоторых доминирующих кислот существенно отличается от жира, выделившегося из печени в процессе ее стерилизации, а также от жира, извлеченного экстракцией органическими растворителями (хлороформом или его смесью с метанолом). В связи с этим отцентрифугированный жир не отражает состав жирных кислот жира стерилизованной печени трески и не может быть использован для определения их количественного соотношения методом газо-жидкостной хроматографии.

Жир, извлеченный из плотной массы стерилизованной печени экстракцией бинарным растворителем, по качественному составу и количественному соотношению отдельных жирных кислот близок к жиру, полученному методом настаивания с хлороформом, и особенно близок к жиру, выделившемуся из печени трески в процессе ее стерилизации и находящемуся в свободном состоянии. Поэтому при определении состава жирных кислот жира печени трески, пробы которой заготовлены посредством стерилизации в герметичной таре, можно воспользоваться жиром, выделившимся из печени во время ее стерилизации.

### Литература

1. Берчфилд Г., Сторре Э. Газовая хроматография в биохимии. М., изд-во "Мир", 1964.
2. Дубровская Т.А. Изменение тканевого жира морского окуня под действием  $\gamma$ -облучения. Труды молодых ученых ВНИРО. Вып.2, 1970.
3. Кельман Л.Ф., Лясковская Ю.Н. Ускоренный метод выделения и количественного определения липидов мышечной ткани. "Мясная индустрия", 1965.
4. Ржавская Ф.М. Окисление жиров рыб и морских млекопитающих и оценка их качественного состояния. ЦНИИТЭИРХ. Обработка рыбы и морепродуктов. Вып.3-4, 1970а.

5. Ржавская Ф.М. Газо-жидкостная хроматография жирных кислот. ОНТИ ВНИРО, 1970б.
6. Руководство по газовой хроматографии. Ред.нем.изд. - Лейбниц Е. и Штруппе П., ред.русс.пер. Хуховицкий А.А. М., изд-во "Мир", 1969.
7. Ackman, R.G. Structural correlation of unsaturated fatty acid esters through graphical comparison of gas-liquid chromatographic retention times on a polyester substrate. J. Am. Oil. Chem. Soc., 40, 10, 1963.
8. Ackman, R.G. and Burgher, R.D. Cod liver oil fatty acids as secondary reference standards in the GLC of polyunsaturated fatty acids of animal origin: analysis of a dermal oil of the Atlantic Leatherback turtle, J. Am. Oil. Chem. Soc., 42, I, 1965.
9. Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. "Canad. J. Bioch. Physiol.", 37, 8, 1959.
10. Folch, J., Ascoli, J., Less, M., Meath, M.A., Lessaron, T.H. Preparation of lipid extracts from brain tissue, J. Bio. Chem., 1951.
11. Ostrander, J. and Dugan, L.R. Jr. Some differences in composition of covering fat, intermuscular fat, and intramuscular fat of meat animals. J. Am. Oil. Chem. Soc. 39, 3, 1962.
12. Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, E.H., Jr., Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. Micromethod for preparation of methyl esters. Anal. Chem. 31, 2, 1959.

THE RECOVERY OF OIL FROM STERILIZED COD LIVER  
USED FOR THE DETERMINATION OF FATTY ACID COMPOSITION

F.M.Rzhavskaya, T.A.Dubrovskaya

S U M M A R Y

By the gas-liquid chromatographic method the fatty acid composition of fat (lipids) extracted from the solid mass of coagulated substances of sterilized cod liver by various methods (centrifuging, extraction with chloroform and a binary solvent) as well as the fatty acid composition of oil obtained from liver during the sterilization period and which remained free, were investigated. It was found that while determining the fatty acid composition of liver oil (the samples had been prepared in sealed cans by sterilization) it was suitable to use oil recovered from the liver during the sterilization process.