

**ВЛИЯНИЕ НЕОМЫЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ
ТРЕСКИ И УСАТЫХ КИТОВ НА РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСИ
МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ
ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ****Ф. М. Ржавская, А. М. Макарова**

В исследованиях состава жирных кислот липидов рыб и морских млекопитающих методом газожидкостной хроматографии разделению обычно подвергают смесь метиловых эфиров жирных кислот. Для этого липиды обрабатывают для освобождения от неомыляемых веществ и выделения жирных кислот, которые затем метилируют. Такая обработка включает ряд операций: превращение глицеридов в растворимые в воде соли жирных кислот (мыла); экстракцию неомыляемых веществ; разложение солей жирных кислот; извлечение освободившихся кислот органическим растворителем и удаление последнего. Некоторые процессы: омыление, разложение мыл, удаление растворителя, осуществляют при повышенных температурах.

Следовательно, процесс выделения жирных кислот трудоемок, а дополнительное воздействие повышенных температур нежелательно в связи с легкой окисляемостью жирных кислот липидов морских организмов.

Вместе с тем во многих липидах рыб и морских млекопитающих количество неомыляемых веществ незначительно: например, в липидах усатых китов и печени трески, вырабатываемых в промышленных масштабах, неомыляемые вещества не превышают 2%.

Исключение процессов удаления неомыляемых веществ и выделения жирных кислот в значительной мере сократило и упростило бы подготовку образцов для определения их состава методом газожидкостной хроматографии.

Поэтому были проведены специальные исследования для выявления влияния неомыляемых веществ названных липидов на разделение метиловых эфиров жирных кислот.

Объектами такого исследования были липиды печени баренцево-морской трески (*Сadus morhua*) и мяса усатого кита сейвала (*Balaenoptera borealis*). Стерилизованная печень охлажденной трески по нашим методическим указаниям была заготовлена сотрудниками ПИРО, образцы липидов сейвала — на китобазе «Советская Украина»¹ в специализированных опытах, связанных с изучением качества жиров из различных видов сырья.

Липиды предварительно были охарактеризованы по их составу (содержанию неомыляемых веществ и значению йодных чисел) и качественному состоянию, т. е. степени их окисления и гидролиза, которые оценивали по значениям показателей окислительной порчи и кислотного числа; методы их определения были аналогичны использованным в других исследованиях [4]. Значения показателей степени окисления свидетельствуют о том, что окислительные процессы в этих липидах были в самой начальной стадии; по содержанию неомыляемых веществ

¹ Научной группой под руководством Б. С. Василевского.

липиды печени трески и сейвала были идентичны, но зато значительно отличались по значению йодных чисел (табл. 1), что указывает на существенные различия в составе жирных кислот.

Таблица 1

Характеристика исследованных липидов печени трески и мышечной ткани сейвала

Показатели состава и степени окисления липидов	Печень трески	Мясо сейвала
Содержание неомыляемых веществ, %	1,5	1,5
Йодное число	148,1	119,7
Перекисное число, % йода	0,01	0,08
Содержание оксианового кислорода, мг %	—	10,5
Альдегидное число, мг % коричневого альдегида	0,08	7,5
Кислотное число, мгКОН/г	0,4	0,9

Для выяснения влияния неомыляемых веществ на разделение метиловых эфиров жирных кислот их получали двумя способами: метилированием жирных кислот, выделенных из липидов после удаления неомыляемых веществ, и непосредственной переэтерификацией липидов в присутствии неомыляемых веществ.

При метилировании жирных кислот и переэтерификации липидов катализатором служил сухой хлористый водород. В этом смысле использованный метод был близок к методу Лудди [8], но отличался от него тем, что источником хлористого водорода служил хлористый ацетил, метанол после реакции метилирования удаляли, а петролейный эфир был заменен диэтиловым (серным). Метилирование и переэтерификация состояли в следующем: к навеске липидов или жирных кислот (около 0,3 г) добавляли 25 мл безводного метанола и осторожно, по каплям, во избежание взрыва вводили 2,5 мл перегнанного хлористого ацетила. Затем с обратным холодильником, снабженным трубкой с безводным хлористым кальцием, обрабатывали на водяной бане в течение 2—2,5 ч в атмосфере азота особой чистоты. После окончания реакции метилирования метанол отгоняли в вакууме также в атмосфере азота. Затем вводили 6 мл воды и 10 мл серного эфира, хорошо встряхивали. Полученную массу количественно при помощи серного эфира переводили в небольшую делительную воронку для отделения водно-метанолового слоя. Для полного извлечения метиловых эфиров водно-метаноловый слой экстрагировали 2 раза серным эфиром по 10 мл. Собранные экстракты для удаления воды обрабатывали безводным сульфатом натрия в течение 20 мин, фильтровали для освобождения от последнего, а серный эфир удаляли в атмосфере азота при температуре 30—40° С.

Метиловые эфиры растворяли в перегнанном безводном гексане из расчета получения 20—25%-ного раствора, который использовали для их разделения методом газо-жидкостной хроматографии. При метилировании жирных кислот удаление неомыляемых веществ и выделение жирных кислот также осуществляли в атмосфере азота.

Разделение смеси метиловых эфиров производили на газовом хроматографе фирмы «Griffin and George» с пламенно-ионизационным детектором; условия разделения были оптимальными, специально установленными для данного хроматографа [3].

Отдельные метиловые эфиры жирных кислот, соответствующие пикам хроматограммы, идентифицировали путем сравнения относительного удерживаемого объема идентифицируемого компонента с литературными данными об относительных удерживаемых объемах метиловых эфиров различных жирных кислот по отношению к эфирам пальмити-

новой и олеиновой кислот [1, 7]. В ряде случаев идентификацию проводили при помощи линейной зависимости между логарифмом относительного удерживаемого объема, числом атомов углерода и числом двойных связей в алифатической цепи жирных кислот [5, 6].

Количество каждого компонента разделяемой смеси определяли по площади соответствующего пика на хроматограмме, соотношение отдельных компонентов — методом внутренней нормализации [1, 2, 5].

Результаты разделения метиловых эфиров, полученных из жирных кислот и путем непосредственной переэтерификации липидов (триглицеридов) печени трески и мяса сейвала, показали, что качественный состав кислот идентичен, а их количественные соотношения близки (табл. 2).

Таблица 2

Соотношение (в %) метиловых эфиров жирных кислот липидов печени трески и мышечной ткани в зависимости от присутствия неомыляемых веществ

Количество атомов углерода	Двойные (этиленовые) связи		Печень трески		Мышечная ткань сейвала	
	число	положение	общие липиды	жирные кислоты	общие липиды	жирные кислоты
12	0	—		Следы	0,5	0,8
14	0	—	5,9	4,9	6,9	7,6
15	0	—		Следы		
16	0	+	9,4	10,3	13,5	14,8
17	0	—		Следы	1,5	1,6
18	0	—	1,4	2,0	2,1	2,0
Сумма эфиров насыщенных кислот			16,7	17,2	24,5	26,8
14	1	?		Следы	0,4	0,4
16	1	9	11,5	13,2	9,5	9,9
17	1	?	0,2	0,6	—	—
18	1	9	22,1	21,6	16,4	16,4
19	1	?	0,2	0,2	0,4	0,5
20	1	11	17,7	17,8	13,7	14,8
22	1	13	6,5	5,8	9,4	8,3
Сумма эфиров мононенасыщенных кислот			58,2	59,2	49,8	50,3
16	2	6, 9		Следы	0,8	0,8
18	2	6, 9	1,4	1,4	1,0	1,4
20	2	11, 14	0,4	0,4	0,8	0,7
Всего диеновых			1,8	1,8	2,6	2,9
18	3	6, 9, 12	0,2	0,4	0,2	0,2
20	3	8, 11, 14	0,4	0,2	0,7	0,8
Всего триеновых			0,6	0,6	0,9	1,0
18	4	6, 9, 12, 15	0,4	0,3	0,5	0,4
20	4	5, 8, 11, 14	1,8	2,4	2,0	1,9
20	4	8, 11, 14, 17	1,1	0,5	2,8	2,0
Всего тетраеновых			3,3	3,3	5,3	4,3
20	5	5, 8, 11, 14, 17	4,9	5,7	3,7	3,6
22	5	4, 7, 10, 13, 16	1,4	0,8	2,7	3,0
22	5	7, 10, 13, 16, 19	0,9	1,1	—	—
Всего пентаеновых			7,2	7,6	6,4	6,6
22	6	4, 7, 10, 13, 16, 19	12,2	10,3	10,5	8,1
Сумма эфиров полиненасыщенных кислот			25,1	23,6	24,7	22,9

Отмеченные расхождения, как правило, укладывались в допускаемые погрешности определения. Исключение составлял лишь эфир докозагексаеновой кислоты (22 : 6), количество которого в случае переэтерификации липидов было несколько большим по сравнению с зафиксированным в смеси эфиров, полученной метилированием выделенных жирных кислот. Такая разница превышала допускаемые расхождения

и отмечена как для липидов печени трески, так и для липидов сейвала. Это позволяет полагать, что она обусловлена меньшим отрицательным воздействием повышенных температур при непосредственной переэтерификации липидов вследствие исключения процесса выделения жирных кислот, что, по-видимому, обеспечило несколько лучшую сохранность наиболее лабильной кислоты с шестью двойными связями.

Нашими исследованиями установлена возможность исключения предварительного удаления неомыляемых веществ и выделения жирных кислот из липидов печени трески и усатых китов при определении состава их жирных кислот методом газо-жидкостной хроматографии.

Одновременно отмечены различия в составе жирных кислот липидов печени трески и усатого кита сейвала. Они относятся к кислотам разной молекулярной массы и разной степени ненасыщенности. В липидах сейвала прежде всего существенно больше насыщенных кислот, в основном обусловленных относительно повышенным содержанием миристиновой и пальмитиновой кислот.

В этих липидах меньше пальмитолеиновой (16:1), ейкозеновой (20:1) и особенно олеиновой (18:1) кислот, что отразилось на общей сумме мононенасыщенных кислот, которая, несмотря на преобладание докозеновой кислоты (22:1), в липидах сейвала оказалась ниже, чем в липидах печени трески. В липидах сейвала, кроме этого, находится несколько меньше докозагексаеновой, но больше одной из ейкозатраеновых кислот, что несколько снивелировало разницу в общей сумме полиненасыщенных. Все это определило разную неопределенность исследованных липидов, выраженную значениями их иодных чисел (см. табл. 1), которые совершенно справедливо свидетельствуют о большей насыщенности липидов печени трески.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что неомыляемые вещества липидов печени трески и усатых китов не оказывают существенного влияния на разделение метиловых эфиров жирных кислот методом газо-жидкостной хроматографии.

2. Показана возможность исключения процессов удаления неомыляемых веществ и выделения жирных кислот из липидов печени трески и мышечной ткани усатых китов для приготовления метиловых эфиров жирных кислот, которые могут быть получены переэтерификацией липидов.

3. Выявлена разница в составе жирных кислот липидов печени трески и усатого кита сейвала. Она обусловлена соотношениями основных насыщенных, мононенасыщенных и некоторых полиненасыщенных кислот, обеспечивающих повышенную неопределенность липидов печени трески.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берчфилд Г. и Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии. М. «Мир», 1964, с. 598.
2. Ржавская Ф. М. Газо-жидкостная хроматография жирных кислот. М., ОНТИ ВНИРО, 1970, с. 62.
3. Ржавская Ф. М., Дубровская Т. А. Выделение жира из стерилизованной печени трески для определения состава жирных кислот. — «Труды ВНИРО», 1972, т. 88, с. 112—124.
4. Ржавская Ф. М., Дубровская Т. А., Правдина Л. В. Влияние метода выделения жира из мышечной ткани охлажденных рыб на его состав и свойства. Опубликовано в настоящем сборнике.
5. Руководство по газовой хроматографии. (Ред. русск. пер. — А. А. Жуховицкий. Ред. нем. изд. — Е. Лейбниц и Х. Штруппе. М. «Мир», 1969, с. 482.
6. Ackman R. G. Structural correlation of unsaturated fatty acid esters through graphical comparison of gas-liquid chromatographic retention times on polyester substrates. J. Am. Oil Chem. Soc. 1963, vol. 40, No. 10, p. 558—564.

7. 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.* 1965, vol. 42, No. 1, p. 38—42.

8. Luddy F. E., Barford R. A., Riemenschneider R. W. Direct conversion of lipid components to their fatty acid methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1960, vol. 37, No. 9, p. 447—451.

EFFECT OF UNSAPONIFIABLE MATTER IN THE COD LIVER AND BALEEN WHALE LIPIDS ON THE SEPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

F. M. Rzhavskaya, A. M. Makarova

SUMMARY

It has been shown that there is no necessity to preliminary remove the unsaponifiable matter and recover fatty acids from cod liver and baleen whale lipids when examining their fatty acid composition by gas liquid chromatography

The possibility of methylation by direct trans-esterification of such lipids has been established.

INFLUENCE DES MATIÈRES NON-SAPONIFIABLES DES LIPIDES DU FOIE DE MORUE ET DES BALEINES SUR LA SEPARATION DU MÉLANGE DES ESTERS MÉTHYLIQUES DES ACIDES GRAS AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE

F. M. Rzhavskaya, A. M. Makarova

RÉSUMÉ

On montre qu'il n'est pas nécessaire d'éliminer préalablement des matières non-saponifiables et d'extraire les acides gras des lipides du foie de morue et des baleines pour la détermination de la composition des acides gras au moyen de la chromatographie gaz-liquide.

La possibilité de l'obtention des esters méthyliques des acides gras par la transestérification directe de tels lipides a été établie.