

Zdzisław DOMISZEWSKI, Grzegorz BIENKIEWICZ

PORÓWNANIE METOD PRZYGOTOWANIA ESTRÓW METYLOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH WG AOAC ORAZ METODĄ BEZPOŚREDNIĄ PRZY OZNACZANIU SKŁADU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH TKANKI MIĘSNEJ RYB

DETERMINING FISH FATTY ACID COMPOSITION: A COMPARISON OF PREPARATION FATTY ACID METHYL ESTERS DIRECT AND AOAC METHODS

Katedra Towaroznawstwa i Oceny Jakości, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin

Abstract. Analysis of the composition of lipids is done by separating fatty acids (FA), most often through gas chromatography, after converting FA into their volatile derivatives: fatty acid methyl esters (FAME). The aim of the paper was to compare the results of analysis FA composition of three species of oily fish, both raw and subjected to heat treatment, by converting FA into FAME applying the AOAC method, and using the direct method. FAME were separated by gas chromatography-coupled mass spectrometry (GC-MS). It was shown that, in fish subjected to heat treatment, the percentages of EPA and DHA whose FAME were prepared via the direct method were 5-10% higher than in case of applying the AOAC method. As far as uncooked oily fish are concerned, the method of obtaining FAME had no relevance to the composition of fatty acids. The method of obtaining FAME can have a substantial impact on the percentages of individual acids or acid groups in fat, and, in turn, on results of evaluation its nutritional value.

Słowa kluczowe: chromatografia gazowa, EMKT, kwasy tłuszczowe, zmydlanie.

Key words: FAME, fatty acid, gas chromatography, saponification.

WSTĘP

Bardzo ważnym i cennym składnikiem ryb są lipidy, których zawartość w zależności od gatunku i pory połowu wynosi najczęściej od kilku do kilkunastu procent. Jednym z podstawowych wskaźników decydującym zarówno o wartości odżywczej, jak i właściwościach fizycznych tłuszczu są przede wszystkim kwasy tłuszczowe (KT) (Ziemiański i Budzyńska-Topolowska 1991; Drozdowski 2000). Lipidy rybne w porównaniu z innymi lipidami wyróżniają się przede wszystkim zawartością najcenniejszych kwasów tłuszczowych, tj. długołańcuchowych polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 PUFA (LC n-3 PUFA). Zdominowane są one przede wszystkim przez dwa kwasy: C20:5 eikozapentaenowy (EPA) oraz C22:6 dokozaheksaenowy (DHA) – (Ackman 1989; Kołakowska i in. 2003; Sikorski 2004). Najważniejszą charakterystyczną cechą LC n-3 PUFA jest zdrowotne i terapeutyczne oddziaływanie na organizm człowieka. Kwasy te włączone w odpowiednich ilościach do

diety wywierają korzystny wpływ w przypadku wielu przewlekłych schorzeń. Związki te posiadają udowodnione właściwości, które zapobiegają schorzeniom układu krążenia, sprzyjają prawidłowemu rozwojowi i funkcjonowaniu mózgu i siatkówki oka, ponadto odgrywają znaczącą rolę w profilaktyce cukrzycy, stanów depresyjnych i nowotworów (Lands 1997; Kołakowska i in 2003; Leaf i in. 2003; Gebauer i in. 2006; Fotuhi i in. 2009). Głównie z tego powodu istnieje potrzeba ciągłej kontroli ich zawartości w różnych gatunkach ryb, zwłaszcza ryb tłustych, jak np. śledź i szprot bałtycki, które są ważnym w Polsce źródłem tych kwasów, oraz po przetworzeniu tych surowców na produkty gotowe do spożycia. Najdokładniejszymi metodami analizy składu KT są metody chromatograficzne, a najczęściej do tego celu służy chromatografia gazowa (GC) – Eder 1995; Christie 1995. Jednakże aby móc oznaczyć skład KT metodą GC należy uzyskać najpierw odpowiednie ich pochodne, gdyż same kwasy tłuszczowe, z wyjątkiem kwasów krótkołańcuchowych, nie wykazują właściwości lotnych. Najczęściej przygotowywanymi pochodnymi KT są estry metylowe kwasów tłuszczowych (EMKT). Estry metylu mają najniższy ciężar cząsteczkowy, więc są eluowane z kolumny chromatograficznej w temperaturach niższych niż inne pochodne, w dodatku ze względu na niską ich polarność mogą mieć zastosowanie zarówno w chromatografii gazowej, jak i cieczowej (Christie 1995). Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych w samych rybach oraz produktach rybnych prowadzi się najczęściej, poddając odpowiedniej analizie lipidy wyizolowane z mięsa za pomocą mieszaniny rozpuszczalników: niepolarnego i polarnego wg metody Folcha (Folch i in. 1957), w modyfikacji Bligha–Dyera (Bligh i Dyer 1959) lub innej, np. Erickson (1993), Brooks i in. (1998), Jensen i in. (2003). Oznaczenie składu KT jest metodą dwustopniową, która w pierwszym etapie zakłada ekstrakcję lipidów, a dopiero później w celu otrzymania EMKT wyekstrahowane lipidy poddaje się najczęściej hydrolizie zasadowej, np. wg metody AOAC (1984) lub AOCS (2004). Prowadząc taki schemat postępowania, zwłaszcza przy oznaczaniu tak ważnych z punktu widzenia żywieniowego LC n-3 PUFA, istnieje pewne niebezpieczeństwo niecałkowitego wyekstrahowania lipidów, a tym samym oznaczenia wszystkich kwasów tłuszczowych. Dodatkowo w trakcie różnych procesów technologicznych i biochemicznych zachodzących w trakcie składowania i przetwarzania produktów rybnych i nie tylko, mogą powstawać różne kompleksy chemiczne pomiędzy podstawowymi składnikami żywnościowymi (Guo i in. 1997), które dodatkowo mogą utrudnić przebieg ekstrakcji lipidów z tkanki. W dodatku taki schemat postępowania może prowadzić do przenikania zanieczyszczeń podczas ekstrakcji, strat estrów, jest czasochłonny oraz wymaga dużej ilości odczynników i badanego materiału (Liu 1994). W związku z powyższymi argumentami w zakresie przygotowania EMKT coraz częściej zastosowanie ma bezpośrednie otrzymywanie EMKT (Takeuchi i in. 1991; Park i Goins 1994; Cantellops in 1999; Indarti i in. 2005) z pominięciem ekstrakcji lipidów, która przy obecnie stosowanych metodach nie jest całkowita.

Celem pracy było porównanie składu KT w lipidach ryb tłustych z zastosowaniem przygotowania EMKT wg AOAC oraz metodą bezpośrednią. Powyższy cel postanowiono osiągnąć nie tylko poprzez analizę składu KT ryb surowych ale również poddanych obróbce termicznej, tj. po zamrażalniczym przechowywaniu oraz ogrzewaniu.

MATERIAŁ I METODY

Material

Badania wykonano na mięsie ryb:

- surowych (świeżych): śledzi bałtyckim (*Clupea harengus membras* L.), szprocie (*Sprattus sprattus* L.), pstrągu tęczowym (*Oncorhynchus mykiss* W);
- mrożonych: śledzi bałtyckim po 3-miesięcznym przechowywaniu w temp. -18°C , w postaci ryb całych, szprocie po 3-miesięcznym przechowywaniu w temp. -18°C w postaci ryb całych;
- ogrzewanych: mięso z ryb świeżych oraz po zamrażalniczym przechowywaniu.

Metody

Przygotowanie surowca.

Śledzie i pstrągi surowe oraz po mrożeniu patroszono, odgławiano, a następnie płukano. Po odcięciu wody, tuszki filetowano, a następnie filety wraz ze skórą rozdrabniano na elektrycznej maszynie do mielenia mięsa, wyposażonej w sito o średnicy oczek 2 mm. Szproty surowe i po mrożeniu patroszono i odgławiano, a następnie tuszki wraz z kręgosłupem rozdrabniano w analogiczny sposób jak w przypadku śledzi i pstrągów. Uzyskane w ten sposób rozdrobnione mięso ryb poddawano dalszym badaniom.

Warunki obróbki cieplnej.

Rozdrobnione mięso ryb surowych i po mrożeniu w ilości 40 g ogrzewano w szklanych krystalizatorach o średnicy wewnętrznej 5,6 cm, grubości ścianek 2 mm i wysokości 2,9 cm. Po nałożeniu mięsa całość owijano folią aluminiową i ogrzewano w temp. 100°C przez 30 min w cieplarni ZALMEV SML 32/250.

Metody analityczne

Ekstrakcja lipidów: lipidy z rozdrobnionego mięsa surowego, po obróbce termicznej (mrożeniu i ogrzewaniu), ekstrahowano metodą Bligha-Dyera (1959). Ekstrakcję wykonano w dwóch powtórzeniach. Zawartość lipidów w mięsie ryb oznaczano grawimetrycznie po odparowaniu rozpuszczalnika z ekstraktów chloroformowych.

Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych

EMKT przygotowano dwoma metodami wg:

1) AOAC (1984) (A) oraz

2) metodą bezpośrednią (B): która polegała na poddaniu bezpośrednio hydrolizie zasadowej lipidów zawartych w mięsie ryb (z pominięciem ekstrakcji). W tym celu do kolby stożkowej odważono ok. 600 mg mięsa, dodano standardu wewnętrznego oraz $4,5\text{ cm}^3$ 1N metanolanu sodu (CH_3ONa). Całość umieszczono w łaźni i ogrzewano w temp. 80°C pod chłodnicą zwrotną przez 10 min. Po tym czasie dodano 7 cm^3 14-procentowego trójfluorku boru w metanolu (BF_3MeOH) i ponownie całość ogrzewano przez 30 min w analogicznych warunkach jak wcześniej. Po ochłodzeniu, próby wyciągnięto spod chłodnicy i dodano

10 cm³ heksanu. Następnie całość wytrząsano, dodano nasyconego chlorku sodu (NaCl), po czym warstwę heksanową zawierającą EMKT przeniesiono do wiali, a resztę przeniesiono ilościowo do rozdzielacza. Całość ekstrahowano ponownie heksanem, po czym frakcje te połączono, osuszono bezwodnym siarczanem sodu i zatężono poprzez odparowanie rozpuszczalnika w strumieniu azotu. Ilość użytych odczynników: CH₃ONa oraz BF₃MeOH uzależniona była od zawartości lipidów w badanej próbce i wyznaczono ją na podstawie wcześniejszych badań (Domiszewski 2000; 2001; Domiszewski i in. 2004).

Rozdział EMKT

Rozdziału EMKT przygotowanych wg AOAC i metodą bezpośrednią wykonano metodą chromatografii gazowej, stosując chromatograf gazowy firmy Hewlett Packard GC 5890 series II, wyposażony w dozownik typu split/splitless sprzężony z detektorem masowym G 1800A. Warunki analizy KT: kolumna SPTM – 2560, 100 x 0,25 mm ID, 0,20 μm film, numer katalogowy 24056, gaz nośny hel: przepływ stały w tempie 1,2 cm³/min, split 1:50, temp. dozownika 220°C; temp. detektora 220°C; temperatura pieca: 140°C (5 min) przyrost do 240°C w tempie 4°C/min, całkowity czas analizy 45 min. Interpretację jakościową chromatogramów przeprowadzono, porównując czasy retencji i widma masowe poszczególnych EMKT badanej próbki z czasami retencji i widmami masowymi analogicznych wzorców EMKT firmy Sigma (Lipid Standard). Analizę próbki badanej i standardu wykonano w analogicznych warunkach, w krótkim odstępie czasu. Jako wynik ilościowy przyjmowano średnią z trzech oznaczeń równoległych. Wyniki każdej analizy przedstawiono w procentach (jako % sumy kwasów).

Udział procentowy poszczególnych kwasów tłuszczowych (KT) w lipidach/mięsie obliczono wg AOAC 991.39 G/a $\%KT = [A_x / (A_T - A_{IS})] \times 100$; gdzie A_x – pole powierzchni oznaczanego KT, A_T – suma wszystkich pól powierzchni analizowanych KT, A_{IS} – pole powierzchni standardu wewnętrznego.

Analiza statystyczna wyników

Dane zamieszczone w tabelach są średnimi wartościami z trzech równoległych powtórzeń. Analizę statystyczną wyników wykonano na podstawie testu t-Studenta. Porównano udział procentowy: grup kwasów tłuszczowych (SFA, MUFA, PUFA) oraz tylko najważniejszych LC n-3 PUFA, tj. EPA i DHA otrzymanych między metodą AOAC i bezpośrednią. Dane opracowano statystycznie, korzystając z programu firmy StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA[®] (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.

WYNIKI

Surowe mięso z ryb

Generalnie sposób przygotowania EMKT nie miał istotnego wpływu na udział procentowy kwasów tłuszczowych w lipidach mięsa świeżego (surowego) zarówno śledzia, szprota, jak i pstrąga (tab. 1). W większości przypadków maksymalne różnice w udziale % KT lipidów mięsa surowego ryb między metodą bezpośrednią a pośrednią przygotowania EMKT nie przekraczały 3%. Analizując grupę n-3 PUFA, w tym dwa najważniejsze kwasy: DHA i EPA,

stwierdzono, że w przypadku surowego mięsa śledzia oraz pstrąga różnice między sposobami przygotowania EMKT były nieistotne i nieprzekraczały 1,5%, natomiast w przypadku surowego mięsa szprot różnice te były nieco wyższe i sięgały około 3%, ale z punktu statystycznego były one również nieistotne (tab. 1).

Tabela 1. Skład kwasów tłuszczowych [% KT] lipidów ryb świeżych (surowych) w zależności od sposobu przygotowania EMKT (B – metoda bezpośrednia, A – metoda wg AOAC)

Table 1. Fatty acids composition [% FA] of fresh fish lipids depending on the FAME preparation method (B – direct method, A – AOAC method)

Kwas tłuszczowy Fatty acid	Śledź Herring		Szprot Sprat		Pstrąg Trout	
	B	A	B	A	B	A
C 14:0	8,28	8,87	6,05	5,99	4,45	4,17
C 15:0	0,67	0,93	1,25	1,23	0,70	0,67
C 16:0	15,16	14,36	24,22	23,85	17,77	17,31
C 17:0	0,09	0,13	0,29	0,3	0,13	0,13
C 16:1 (n-7)	4,88	5,32	6,2	6,11	4,90	4,84
C 17:0	0,22	0,27	0,44	0,44	0,35	0,36
C 17:1	0,18	0,29	0,66	0,69	0,40	0,4
C 18:0	1,73	1,55	2,66	2,7	3,74	3,73
C 18:1 (n-11)	0,82	0,93	25,7	25,61	0,83	0,74
C 18:1 (n-9)	11,56	10,59	2,79	2,75	18,49	18,41
C 18:1 (n-7)	1,79	1,88	0,49	0,51	3,02	3,01
C 18:2 (n-6)	1,29	1,74	3,29	3,29	10,24	10,44
C 20:1 (n-9)	15,08	15,68	0,47	0,49	4,30	4,57
C 18:3 (n-3)	0,96	0,30	3,00	2,98	2,05	2,06
C 18:4 (n-3)	0,93	1,25	1,94	1,98	1,07	1,07
C 20:2 (n-6)	0,22	0,3	0,44	0,44	0,60	0,63
C 22:1 (n-11)	23,69	22,69	0,00	0,00	4,71	5,03
C 20:3 (n-3)	0,2	0,21	0,29	0,29	0,24	0,24
C 20:4 (n-6)	0,29	0,35	0,45	0,45	0,56	0,56
C 20:4 (n-3)	0,26	0,34	0,40	0,40	0,93	0,94
C 20:5 (n-3)	3,68 ^a	3,73 ^a	6,53 ^a	6,61 ^a	4,21 ^a	4,24 ^a
C 24:1 (n-9)	0,67	0,87	1,37	1,39	0,41	0,41
C 22:5 (n-3)	0,43	0,53	0,36	0,37	1,21	1,24
C 22:6 (n-3)	6,92 ^a	6,89 ^a	10,71 ^a	11,13 ^a	14,70 ^a	14,80 ^a
Σ SFA	26,15 ^a	26,11 ^a	34,91 ^a	34,51 ^a	27,14 ^a	26,37 ^a
Σ MUFA	58,67 ^a	58,25 ^a	37,68 ^a	37,55 ^a	37,06 ^a	37,41 ^a
Σ PUFA	15,18 ^a	15,64 ^a	27,41 ^a	27,94 ^a	35,81 ^a	36,22 ^a
Σ n-3	13,38 ^a	13,25 ^a	23,23 ^a	23,76 ^a	24,41 ^a	24,59 ^a
Σ n-6	1,80 ^a	2,40 ^b	4,18 ^a	4,18 ^a	11,40 ^a	11,63 ^a
Σ n-6/Σ n-3	0,13	5,53	0,18	0,18	0,47	0,47

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe (KT), MUFA – monoenowe KT, PUFA – polienowe KT.

a, b – dane oznaczone tymi samymi literami dla danego kwasu tłuszczowego nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

SFA – saturated fatty acid (FA), MUFA – monounsaturated fatty acid (FA), PUFA – polyunsaturated fatty acid (FA).

a, b – data marked with the same letters within the same fatty acid do not differ significantly at $p \leq 0.05$.

Ogrzewane mięso z ryb

Zupełnie inny wpływ miał sposób przygotowania EMKT na udział % kwasów tłuszczowych w lipidach mięsa ryb poddanego obróbce cieplnej. W tym przypadku sposób przygotowania EMKT miał istotny wpływ zarówno na udział % całej grupy PUFA, jak i poszczególnych najważniejszych z tej grupy kwasów tłuszczowych, tj.: EPA i DHA (tab. 2). Największe różnice w udziale procentowym KT stwierdzono w lipidach ogrzewanego mięsa śledzia. W tym przypadku udział % PUFA, n-3 PUFA, DHA i EPA był średnio o 10% istotnie wyższy w przypadku gdy EMKT otrzymano bezpośrednio z tkanki, niż w sposób pośredni z wyekstrahowanych wcześniej lipidów wg metody AOAC (tab. 2).

Tabela 2. Skład kwasów tłuszczowych [% KT] lipidów ryb ogrzewanych w zależności od sposobu przygotowania EMKT (B – metoda bezpośrednia, A – metoda wg AOAC)

Table 2. Fatty acids composition [% FA] of heated fish lipids depending on the FAME preparation method (B – direct method, A – AOAC method)

Kwas tłuszczowy Fatty acid	Śledź Herring		Szprot Sprat		Pstrąg Trout	
	B	A	B	A	B	A
C 14:0	8,44	8,72	5,93	6,23	3,68	3,9
C 15:0	0,73	0,66	1,22	1,32	0,59	0,67
C 16:0	13,61	14,38	23,48	24,19	17,12	16,76
C 17:0	0,08	0,08	0,31	0,31	0,13	0,14
C 16:1 (n-7)	4,82	4,62	6,02	6,06	4,57	4,7
C 17:0	0,23	0,21	0,43	0,44	0,34	0,38
C 17:1	0,22	0,16	0,71	0,69	0,37	0,41
C 18:0	1,32	1,34	2,73	2,86	3,79	3,76
C 18:1 (n-11)	1,11	1,00	25,55	25,47	0,87	0,62
C 18:1 (n-9)	10,01	10,11	2,70	2,90	18,18	18,45
C 18:1 (n-7)	1,93	1,79	0,53	0,5	3,1	3,05
C 18:2 (n-6)	1,56	1,41	3,28	3,24	10,14	10,45
C 20:1 (n-9)	16,12	16,6	0,5	0,48	4,67	4,83
C 18:3 (n-3)	1,06	0,93	2,96	2,89	1,92	2,06
C 18:4 (n-3)	1,21	1,03	2,02	1,95	1,05	1,07
C 20:2 (n-6)	0,26	0,19	0,43	0,43	0,62	0,68
C 22:1 (n-11)	25,35	26,19	0,00	0,00	5,04	5,34
C 20:3 (n-3)	0,27	0,23	0,29	0,27	0,22	0,24
C 20:4 (n-6)	0,26	0,18	0,45	0,44	0,57	0,57
C 20:4 (n-3)	0,29	0,22	0,40	0,39	0,90	0,96
C 20:5 (n-3)	3,57 ^b	3,18 ^a	6,68 ^b	6,29 ^a	4,44 ^b	4,15 ^a
C 24:1 (n-9)	0,82	0,74	1,41	1,34	0,42	0,42
C 22:5 (n-3)	0,51	0,38	0,38	0,30	1,29	1,31
C 22:6 (n-3)	6,22 ^b	5,66 ^a	11,56 ^b	11,00 ^a	15,98 ^b	15,08 ^a
Σ SFA	24,41 ^a	25,39 ^a	34,10 ^a	35,35 ^a	25,65 ^a	25,61 ^a
Σ MUFA	60,38 ^a	61,21 ^a	37,43 ^a	37,45 ^a	37,22 ^a	37,82 ^a
Σ PUFA	15,21 ^b	13,41 ^a	28,45 ^b	27,20 ^a	37,13 ^b	36,57 ^a
Σ n-3	13,13 ^b	11,63 ^a	24,29 ^b	23,09 ^a	25,80 ^b	24,87 ^a
Σ n-6	2,08 ^b	1,78 ^a	4,16 ^a	4,11 ^a	11,33 ^a	11,70 ^a
Σ n-3/Σ n-6	0,16	0,15	0,17	0,18	0,44	0,47

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe (KT), MUFA – monoenowe KT, PUFA – polienowe KT.

a, b – dane oznaczone tymi samymi literami dla danego kwasu tłuszczowego nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

SFA – saturated fatty acid (FA), MUFA – monounsaturated fatty acid (FA), PUFA – polyunsaturated fatty acid (FA).

a, b – data marked with the same letters within the same fatty acid do not differ significantly at $p \leq 0,05$.

Podobną zależność również zaobserwowano w ogrzewanym mięsie szprota i pstrąga. W tych rybach udział % KT z rodziny n-3 PUFA był średnio o 5–6% wyższy, w przypadku oznaczania składu kwasów tłuszczowych metodą bezpośrednią niż wg AOAC (tab. 2). Sposób przygotowania EMKT, mimo około 3-procentowej różnicy między tymi metodami, nie miał istotnego wpływu na udział procentowy kwasów nasyconych tłuszczowych (SFA) i monoenowych kwasów tłuszczowych (MUFA) zarówno w lipidach ogrzewanego mięsa śledzia, szprota, jak i pstrąga (tab. 2).

Mrożone mięso ryb

Podobnie jak w rybach surowych, także w przypadku ryb po zamrażalniczym przechowywaniu (śledź i szprot) sposób przygotowania EMKT nie miał istotnego wpływu zarówno na SFA, MUFA, PUFA: w tym n-3 PUFA, DHA oraz EPA. Maksymalne różnice w udziale procentowym analizowanych KT między metodą bezpośrednią a AOAC nie przekraczały 2–3% (tab. 3).

Tabela 3. Skład kwasów tłuszczowych [% KT] lipidów ryb mrożonych w zależności od sposobu przygotowania EMKT (B – metoda bezpośrednia, A – metoda wg AOAC)

Table 3. Fatty acids composition [% FA] of frozen fish lipids depending on the FAME preparation method (B – direct method, A – AOAC method)

Kwas tłuszczowy Fatty acid	Śledź Herring		Szprot Sprat	
	B	A	B	A
C 14:0	8,72	8,54	5,84	5,72
C 15:0	0,97	1,07	1,29	1,28
C 16:0	23,58	22,82	22,61	22,07
C 17:0	0,16	0,14	0,33	0,35
C 16:1 (n-7)	8,15	8,24	6,08	6,04
C 17:0	0,25	0,29	0,43	0,46
C 17:1	0,32	0,34	0,71	0,75
C 18:0	1,73	1,65	2,95	2,99
C 18:1 (n-11)	0,22	0,29	24,05	24,13
C 18:1 (n-9)	20,61	21,16	3,37	2,94
C 18:1 (n-7)	3,99	4,17	0,69	0,73
C 18:2 (n-6)	3,09	2,89	3,35	3,59
C 20:1 (n-9)	2,92	3,13	0,67	0,70
C 18:3 (n-3)	1,96	1,85	2,99	3,11
C 18:4 (n-3)	1,47	1,39	1,91	2,07
C 20:2 (n-6)	0,34	0,38	0,51	0,64
C 22:1 (n-11)	5,18	5,26	0,00	0,00
C 20:3 (n-3)	0,28	0,27	0,36	0,42
C 20:4 (n-6)	0,3	0,33	0,61	0,55
C 20:4 (n-3)	0,38	0,41	0,47	0,58
C 20:5 (n-3)	6,17 ^a	6,03 ^a	6,63 ^a	6,52 ^a
C 24:1 (n-9)	0,64	0,75	1,80	1,98
C 22:5 (n-3)	0,2	0,26	0,44	0,55
C 22:6 (n-3)	8,37 ^a	8,34 ^a	11,92 ^a	11,85 ^a
Σ SFA	35,41 ^a	34,51 ^a	33,45 ^a	32,87 ^a
Σ MUFA	42,03 ^a	43,34 ^a	37,36 ^a	37,25 ^a
Σ PUFA	22,56 ^a	22,15 ^a	29,19 ^a	29,88 ^a
Σ n-3	18,83 ^a	18,55 ^a	24,72 ^a	25,10 ^a
Σ n-6	3,73 ^a	3,60 ^a	4,47 ^a	4,78 ^a
Σ n-3/Σ n-6	0,20	0,19	0,18	0,19

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe (KT), MUFA – monoenowe KT, PUFA – polienowe KT.

a, b – dane oznaczone tymi samymi literami dla danego kwasu tłuszczowego nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

SFA – saturated fatty acid (FA), MUFA – monounsaturated fatty acid (FA), PUFA – polyunsaturated fatty acid (FA).

a, b – data marked with the same letters within the same fatty acid do not differ significantly at $p \leq 0.05$.

Mrożone a następnie ogrzewane mięso z ryb

Podobnie jak w przypadku ryb surowych poddanych ogrzewaniu, tak również w przypadku ryb po mrożeniu, a następnie poddanych ogrzewaniu, sposób przygotowania EMKT miał istotny wpływ na udział % KT z grupy PUFA w lipidach ryb (tab. 4). Zarówno w przypadku mięsa śledzi, jak i szprotów bezpośrednio przygotowanie EMKT pozwoliło uzyskać średnio o 5% wyższy udział procentowy: PUFA, n-3 PUFA, DHA i EPA niż w metodzie standardowej z zastosowaniem ekstrakcji lipidów. Sposób przygotowania EMKT nie miał natomiast istotnego wpływu na udział % SFA i MUFA w lipidach ogrzewanego mięsa ryb uprzednio poddanego zamrażalnictwu przechowywaniu (tab. 4).

Tabela 4. Skład kwasów tłuszczowych [% KT] lipidów ryb mrożonych/ogrzewanych w zależności od sposobu przygotowania EMKT (B – metoda bezpośrednia, A – metoda wg AOAC)
 Table 4. Fatty acids composition [% FA] of frozen/heated fish lipids depending on the FAME preparation method (B – direct method, A – AOAC method)

Kwas tłuszczowy Fatty acid	Śledź Herring		Szprot Sprat	
	B	A	B	A
C 14:0	7,83	7,75	5,60	5,98
C 15:0	0,85	0,86	1,26	1,33
C 16:0	20,9	21,27	22,45	23,15
C 17:0	0,17	0,18	0,35	0,39
C 16:1 (n-7)	8,11	8,37	6,15	6,04
C 17:0	0,24	0,27	0,45	0,48
C 17:1	0,36	0,36	0,76	0,72
C 18:0	1,68	1,69	2,93	2,95
C 18:1 (n-11)	0,22	0,22	24,27	24,55
C 18:1 (n-9)	20,87	21,19	3,07	2,94
C 18:1 (n-7)	4,12	4,14	0,72	0,71
C 18:2 (n-6)	3,27	3,17	3,62	3,56
C 20:1 (n-9)	2,75	2,77	0,7	0,68
C 18:3 (n-3)	2,15	2,11	3,31	3,00
C 18:4 (n-3)	1,79	1,70	2,04	2,00
C 20:2 (n-6)	0,47	0,59	0,60	0,60
C 22:1 (n-11)	4,89	4,95	0,00	0,00
C 20:3 (n-3)	0,31	0,31	0,41	0,41
C 20:4 (n-6)	0,39	0,37	0,52	0,56
C 20:4 (n-3)	0,51	0,50	0,55	0,57
C 20:5 (n-3)	7,18 ^b	6,80 ^a	6,40 ^b	6,08 ^a
C 24:1	0,93	0,93	1,93	1,97
C 22:5 (n-3)	0,37	0,35	0,5	0,51
C 22:6 (n-3)	9,64 ^b	9,15 ^a	11,41 ^b	10,82 ^a
Σ SFA	31,67 ^a	32,02 ^a	33,04 ^a	34,28 ^a
Σ MUFA	42,25 ^a	42,93 ^a	37,60 ^a	37,61 ^a
Σ PUFA	26,08 ^b	25,05 ^a	29,36 ^b	28,11 ^a
Σ n-3	21,95 ^b	20,92 ^a	24,62 ^b	23,39 ^a
Σ n-6	4,13 ^a	4,13 ^a	4,74 ^a	4,72 ^a
Σ n-3/Σ n-6	0,19	0,20	0,19	0,20

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe (KT), MUFA – monoenowe KT, PUFA – polienowe KT.

a, b – dane oznaczone tymi samymi literami dla danego kwasu tłuszczowego nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

SFA – saturated fatty acid (FA), MUFA – monounsaturated fatty acid (FA), PUFA – polyunsaturated fatty acid (FA).

a, b – data marked with the same letters within the same fatty acid do not differ significantly at $p \leq 0.05$.

DYSKUSJA

Badania nad porównaniem sposobu przygotowania EMKT na udział procentowy kwasów tłuszczowych w lipidach przeprowadzono na przykładzie trzech gatunków ryb tłustych: śledzi i szprotce bałtyckim oraz pstrągu dlatego, że są one głównym naturalnym źródłem LC n-3 PUFA (Ackman 1967; Kołakowska i in. 2006; Stołyhwo i in. 2006).

W niniejszej pracy zaproponowano przygotowanie EMKT bez wcześniejszej ekstrakcji lipidów, ponieważ założono, że standardowe przygotowanie EMKT ogranicza się jedynie do oznaczenia KT tylko w części lipidów ekstrahowanych, których zawartość w dużym stopniu zależy od użytych rozpuszczalników i sposobu przeprowadzenia ekstrakcji. Bienkiewicz i Kołakowska (2003) wykazali ponadto na układach modelowych, że oznaczanie składu KT, zwłaszcza DHA w wyekstrahowanych lipidach, nie odzwierciedla pełnego składu KT lipidów rybnych w obecności białek lub skrobi. Jest to spowodowane interakcjami lipidów z tymi

składnikami. Interakcje lipidy–białko występują naturalnie w tkankach, oraz tworzą się w produktach podczas przetwarzania i przechowywania (Sikorski i Pan 1994; Alzagat i Intez 2002; Pokorny i Kołakowska 2003). W niniejszej pracy wykazano, że sposób przygotowania EMKT miał istotny wpływ na udział % kwasów z grupy PUFA w lipidach mięsa ryb poddanych ogrzewaniu. W próbach tych udział: n-3 PUFA w tym DHA i EPA był statystycznie wyższy gdy EMKT przygotowano bezpośrednio z mięsa niż wg AOAC z wyekstrahowanych lipidów. Dotyczyło to zarówno lipidów ryb mięsa surowego (świeżego), a następnie ogrzewanego oraz uprzednio mrożonego, a następnie również ogrzewanego. Niższe zawartości PUFA w tym n-3 PUFA i DHA w metodzie AOAC wynikają prawdopodobnie z niepełnej ekstrakcji lipidów zawartych w mięsie ryb ogrzewanych. Z badań przeprowadzonych przez Pikula i Wojciechowską (1994), Regulską-Iłow i in. (1996) oraz Kołakowską i Bienkiewicza (1999) wynika, że obróbka cieplna powodować może zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie ekstrahowalności lipidów. Chociaż ekstrakcji lipidów dokonano mieszaniną rozpuszczalnika niepolarnego i polarnego (chloroformu i metanolu), to jednak w wyniku zachodzących interakcji między składnikami tkanki zawsze pewna część lipidów zostaje trwale związana, a tym samym jest nieekstrahowalna. Właśnie z tego powodu w celu dokładniejszego wyekstrahowania lipidów z tkanki Bligh i Dyer (1959) sugerują dodatkowe przemycie otrzymanego poekstrakcyjnego osadu chloroformem, a następnie dodanie tego filtratu do właściwego ekstraktu. Za Pokornym (Pokorny i Janicek 1975) przyjęto uważać, że nieekstrahowalne lipidy są związane kowalencyjnie. Prawdopodobnie zastosowanie bezpośredniej transestryfikacji lipidów, zawartych w ogrzewanej tkance, pozwoliło na uwolnienie lipidów trwale związanych, gdyż lipidy związane kowalencyjnie mogą być ekstrahowane dopiero po hydrolizie tych wiązań, np. w reakcji zmydlania (Kozubek i in. 1996). Porównując skład kwasów tłuszczowych w odchodach ryb, będących na dwóch różnych pod względem zawartości białka dietach, Takeuchi i in. (1991) wykazali, że w przypadku zastosowania bezpośredniego zmydlania podczas otrzymywania EMKT zawartość PUFA w tym EPA i DHA jest wyższa niż w metodzie standardowej z zastosowaniem ekstrakcji. Zależności tej nie stwierdzono natomiast dla KT w samej diecie. Prawdopodobnie dostępność a tym samym możliwość oznaczenia kwasów tłuszczowych uzależniona jest również od obecności i ilości innych składników takich jak białka, cukry czy woda. Badania przeprowadzone przez Bienkiewicza i Kołakowską (2003) wykazały, że polienowe kwasy tłuszczowe, zwłaszcza kwas DHA, preferencyjnie uczestniczą w interakcjach tak, że w układach modelowych z białkiem i skrobią, w wyniku mrożenia oraz ogrzewania mikrofalowego, nawet 90% kwasu było wiązanych w sposób niedający się wyekstrahować mieszaniną chloroformu i metanolu. Być może powodem braku w niniejszej pracy istotnych różnic w udziale % kwasów z grupy PUFA w próbach surowych mogło być niepełne zmydlenie lipidów zawartych w tkance oraz wyższa zawartość wody niż w próbach po obróbce cieplnej. Z badań przeprowadzonych przez O'Fallon i in. (2007) wynika, że na udział procentowy KT istotny wpływ może mieć zawartość wody w próbce. Zastosowany czas zmydlania lipidów zawartych w surowym mięsie ryb mógł nie być wystarczająco długi aby doszło do uwolnienia wszystkich kwasów tłuszczowych. W niniejszych badaniach w stosunku do wszystkich prób zastosowano te same warunki zmydlania, chociaż zdawano sobie sprawę, że na skuteczność tego procesu mogą mieć wpływ takie czynniki jak zmiany tkanki spowodowane obróbką termiczną.

Badania przeprowadzone przez Carrapiso i in. (2000) oraz Indarti i in. (2005) nad porównaniem sposobu przygotowania EMKT na zawartość KT wykazały, że na całkowitą zawartość KT w próbach istotny wpływ ma zarówno czas, jak i temperatura ogrzewania podczas procesu transestryfikacji. Na podstawie własnych, wcześniejszych badań stwierdzono, że dodatkowo wpływ na oznaczenie zawartość PUFA, w tym szczególnie na DHA, ma zarówno ilość, jak i stężenie użytego metalonianu sodu i trójfluorku boru (Domiszewski 2000; Domiszewski i in. 2004). Wskazywałoby to na konieczność doboru warunków zmydlania nie tylko dla każdego produktu osobno, ale należałoby uwzględnić proces technologiczny jakiemu został on poddany. Potwierdzają to badania Indarti i in. (2005), które wykazały, że inne powinny być warunki przygotowania EMKT dla oleju rybnego a inne dla tranu. Zastosowaną w pracy temperaturę i czas zmydlania ustalono również na podstawie własnych wcześniejszych badań (Domiszewski 2000, 2001; Domiszewski i in. 2004) i były to parametry optymalne dla prób poddanych ogrzewaniu. Użyto właśnie tych warunków, gdyż z punktu żywieniowego najważniejsze jest prawidłowe określenie zawartości n-3 PUFA w produktach gotowych do spożycia, a więc tym samym poddanych oddziaływaniu wysokiej temperatury.

PODSUMOWANIE

Zastosowana metoda bezpośredniego przygotowania EMKT w porównaniu z metodą AOAC podczas oznaczania składu kwasów tłuszczowych w mięsie ryb tłustych – surowych oraz po zamrażalniczym przechowywaniu – daje zbliżone wyniki składu kwasów tłuszczowych. Natomiast bezpośrednio przygotowanie EMKT pozwala na oznaczenie dodatkowego udziału długołańcuchowych kwasów z rodziny n-3 PUFA w mięsie ryb poddanych obróbce cieplnej, a tym samym pozwala na dokładniejsze zbadanie wpływu obróbki cieplnej na skład kwasów tłuszczowych.

PIŚMIENNICTWO

- Ackman R.G.** 1967. Characteristic of the fatty acid composition and biochemistry of some freshwater fish oils and lipids in comparison with marine oils lipids. *Biochem. Physiol.* 22, 907–922.
- Ackman R.G.** 1989. *Fatty Acids* [w: *Marine Biogenic Lipids, at and Oils*]. Red. R.G. Ackman. Boca Raton, CRC Press, 103–138.
- Alzagtat A.A., Intez A.** 2002. Protein-lipid interactions in food systems: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53, 249–260.
- AOAC.** 1984. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Method 991.39. Fatty acids in encapsulated fish oils and fish oil methyl and ethyl esters.
- AOCS.** 2004. *Official methods and recommended practices of the American oil chemists society (Fifth Edition)*. Methods Ce 1b-89. Fatty acid composition by GLC. Marine Oil.
- Bligh E.G., Dyer W.J.** 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Bienkiewicz G., Kołakowska A.** 2003. Effect of lipid oxidation on fish lipids – amylopectin interactions. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 105, 410–418.
- Brooks S.P.J., Ratnayake W.M.N., Lampi B.J., Hollywood R.** 1998. Measuring total lipid content in rat carcasses: a comparison of commonly employed extraction methods. *J. Agr. Food Chem.* 46, 4214–4217.

- Cantellops A.P., Reid A.P., Eitenmilleand R.R., Long A.R.** 1999. Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatography. *J. AOAC Int.* 82, 1128–1139.
- Carrapiso A.I., Timón M.L., Petrón M.J., Tejada J.F., García C.** 2000. In situ transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. *Meat Sci.* 56, 159–164.
- Christie W.W.** 1995. *Lipid analysis*. Bridgwater, UK, The Oily Press.
- Domiszewski Z.** 2000. Wpływ sposobu przygotowania metyloestrów na skład kwasów tłuszczowych [w: Postęp w technikach chromatograficznych w zastosowaniu do badań żywności]. *Materiały z Sesji Młodych*, Rynia, 29–30 maja. Rynia 2000, 24.
- Domiszewski Z.** 2001. The comparison of fatty acids composition fish lipids with the use of direct and indirect saponification of a sample [w: *Chromatographic Methods of Organic Compounds Investigation*]. *Materiały z sympozjum*, Katowice-Szczyrk, 7–9 czerwca 2000, 123.
- Domiszewski Z., Tupko-Tubik A., Grzymek S.** 2004. Wpływ temperatury i czasu zmydlenia na oznaczenie zawartości kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej kurcząt [w: *Nauki przyrodnicze w służbie człowieka*]. *Materiały z Jubileuszowej Sesji Naukowej 50 lat AR*, Szczecin 24 września 2004, 197.
- Drozdowski B.** 2002. Lipidy [w: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*]. Red. Z. Sikorski. WNT, Warszawa, 167–232.
- Eder K.** 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B* 671, 113–131.
- Erickson M.C.** 1993. Lipid extraction from channel catfish muscle: comparison of solvent systems. *J. Food Sci.* 58, 84–89.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fotuhi, M., Mohassel P., Yaffe K.** 2009. Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association. *N. Clin. Pract. Neuro.* 5, 140–52.
- Guo S.T., Tomotada O., Masayuki M.** 1997. Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4601–4605.
- Gebauer S.K., Psota T.L., Harris W.S., Kris-Etherton P.M.** 2006. N-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1526–1535.
- Indarti E., Majid M.I.A., Hashim R.A., Chong A.** 2005. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. *J. Food Compos. Anal.* 18, 161–170.
- Jensen S., Hageberg L., Jorundsdottir H., Odham G.A.** 2003. Quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5607–5611.
- Kołąkowska A., i Bienkiewicz G.** 1999. Stability of fish during microwave heating, *Acta Ichth. Piscat.* 29, 101–111.
- Kołąkowska A., Olley J., Dunstan G.A.** 2003. Fish lipids [w: *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*]. Red. Z. Sikorski i A. Kołąkowska. New York, CRC Press, 133–166.
- Kołąkowska A., Domiszewski Z., Bienkiewicz G.** 2006. Effects of biological and technological factors on the utility of fish as a source of n-3 PUFA [w: *Omega 3 Fatty Acid Research*] Red. M.C. Teale. New York, Nova Sci. Publi., 83–108.
- Kozubek A., Sikorski A.F., Szopa J.** 1996. Ekstrakcja lipidów z materiałów biologicznych [w: *Molekularna organizacja komórki*] Red. A. Kozubek. Wrocław, Wydaw. Uniw. Wrocław., 17–21.
- Lands W.E.M.** 1997. Rethinking balance between n-6, n-3. *Inform.* 7, 704–705.
- Leaf A., Kang J.X., Xiao Y., Billman G.E.** 2003. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation.* 107, 2646–2652.
- Liu K.S.** 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1179–1187.
- Manirakiza P., Covaci A., Schepens P.** 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. *J. Food Compos. Anal.* 14, 93–100.
- O’Fallon J.V., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T.** 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues oils, and feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 85, 1511–1521.

- Park P.W., Goins R.E.** 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.* 59, 1262–1266.
- Pikul J., Wojciechowska K.** 1994. Wpływ panierowania i smażenia zanurzeniowego tuszek kurcząt na utlenienie lipidów mięsa podczas chłodniczego przechowywania. *Gospod. Mięsna* 46, 2, 27–30.
- Pokorny J., Janicek G.** 1975. Wechselwirkung zwischen Proteinen und oxidierten Lipiden. *Nahrung*. 29, 459–463.
- Pokorny J., Kołakowska A.** 2003. Lipid–protein and lipid–saccharide interactions [w: *Chemical and functional properties of food lipids*]. Red. Z. Sikorski i A. Kołakowska. New York, CRC Press, 345–362.
- Regulska-Iłow B, Iłow R., Szumczak J.** 1996. Ocena utlenienia tłuszczu w produktach spożywczych podczas ogrzewania konwencjonalnego oraz w kuchence mikrofalowej. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2, 123–128.
- Sikorski Z.** 2004. Wartość użytkowa morskich surowców żywnościowych [w: *Ryby i bezkręgowce morskie*]. Red. Z. Sikorski. PWN, Warszawa, 57–107.
- Sikorski Z.E., Pan B.S.** 1994. The effect of heat-induced changes in nitrogenous on the properties of seafoods [w: *Seafood proteins*]. Red. Z.E. Sikorski, B.S. Pan i F. Shahidi. New York, Chapman & Hall, 84–98.
- Stołyhwo A., Kołodziejska I., Sikorski Z.E.** 2006. Long chain polyunsaturated fatty acids in smoked Atlantic mackerel and Baltic sprats. *Food Chem.* 94, 589–595.
- Takeuchi T., Ackman R.G., Lall S.P.** 1991. Differences in fatty acid composition of fish faeces as determined by two extraction methods. *J. Sci. Food Agric.* 56, 259–264.
- Undeland I., Härröd M., Lingnert H.** 1998. Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chem.* 61, 355–365.
- Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J.** 1991. Tłuszcze pożywienia [w: *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*]. Red. Ś. Ziemiański. PWN, Warszawa 15–127.