مقایسه روشهای مختلف استخراج روغن از کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا و مقدار ویتامین‌های A و D در آنها

دکتر سهیلا هنری*، مهندس محمود معموری**، دکتر جعفر اکبری***، دکتر رضا عنایتی‌فرد***، مهناز حیدری†

چکیده:

زمینه وهدف: **روغن ماهی و کبد کوسه ماهی منابع غنی از ویتامینهای A و D می‌باشند. ویتامین A در شب کوری، تقویت سیستم ایمنی، رشد استخوانی و رشد سلول های بدن ضروری بوده و ویتامین D در جذب کلسیم و فسفر دخالت دارد و برای رشد استخوان ها لازم است. روغن ماهی و کبد کوسه ماهی حاوی اسیدهای چرب ضروری ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید بوده که در کاهش بروز بیماری های قلبی - عروقی تأثیر بسزائی دارد. این پژوهش با هدف بررسی روش های مختلف استخراج و میزان روغن کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا و نیز تعیین مقدار ویتامین‌های A و D در آنها، برای استفاده بهینه از منابع زیستی موجود در کشور طراحی گردید.**

روش مطالعه: **روغن از کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا با استفاده از روش های مکانیکی، هضم قلیایی، استخراج با حلال و روش Bligh & Dyer استخراج شد. ویتامین های A و D در روغن حاصله با استفاده از روشهای مدون تعیین مقدار گردید.**

نتایج: **نتایج نشان داد از بین روشهای انجام شده، بیشترین بازده روغن متعلق به روش Bligh & Dyer می‌باشد. (۴۵/۳٪ در نمونه کبد کوسه ماهی و ۶/۶۳٪ در نمونه ماهی کیلکا) و نیز میزان ویتامین های A و D در روش مذکور نسبت به سایر روشهای انجام گرفته بالاتر می‌باشد. این مقدار برای استفاده در مورد ماهی کیلکا به علت میزان کم روغن در آن مناسب نمی باشد.**

نتیجه گیری: **با توجه به یافته‌های این تحقیق مشخص گردید، روغن کبد کوسه ماهی دارای مقادیر مناسبی از ویتامین های A و D بوده که استخراج آن از کبد کوسه ماهی به منظور استفاده در فرمولاسیون فرآورده‌های دارویی مورد نظر سودمند می‌باشد.**

واژه‌های کلیدی: روغن ماهی، ویتامین A، ویتامین D، کوسه ماهی، ماهی کیلکا.

مقدمه:

استفاده از CLO (Cod liver oil) در درمان ناراحتی‌های استخوان و روماتیسم از مدت ها قبل مرسوم بود. تقریباً در سال ۱۹۵۰ محققان به وجود اسیدهای چرب ضروری ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) ودکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) که جزء اسیدهای چرب ضروری امگا (ω) محسوب می‌شوند، در روغن کبد و روغن ماهی پی

* استادیار دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران: *ساری - بخش ۸ خیابان سلمان فارسی - دانشکده داروسازی، تلفن: ۰۱۵۱-۳۲۵۹۸۰۲*، (**مؤلف مسئول**).

** فوق لیسانس شیمی - دانشگاه مازندران.

*** استادیار دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

†دکترای داروسازی - دانشکده داروسازی ساری.

بـــردند (۱). اسـیدهای چـــرب مذکـــور بـــا ایجـــــاد آراشـیدونیک اسـید قـادر بـه اعمـال اثـرات ضـد التـــهابی، ضـد تجمع پلاکتـی و وازودیـــــلاتاسیون عـــروق خونـــی می‌باشـند (۵). از طـــرفی اسیـــــدهای چـرب ω3 سـبب کـاهش تـــری‌گلیسـریدهای بـدن از طریـق کـاهش نشـــر VLDL در کبـــــد و افـــــزایش ســـطح HDL پلاســـما می‌گـــردند (۱۳،۹). روغن ماهـــی همچنین ممکن اسـت در درمـــــان درمـاتیت هـــای غـیرتیپیک، پسـوریازیس، روماتوئید آرتریت بسـیار مؤثـــر باشـد. اثـــرات جـانبی مصرف زیـاد روغـن مـاهی بـه صـورت چاقـــی، کـاهش تعـــداد پلاکت، افـــزایش زمـان خونریـزی و مسـمومیت ناشـــی از هایپرویتـــامینوز بـــا ویتـــامین هـــای A و D می‌توانـــد بـــروز کنـد (۱۱). کمبود ویتامین از رایج‌ترین انـــواع سوء جذب محسوب مـــی‌شود. یک منبـــع غنی از ویتـــامین A و D کبـد مـاهی هـای غضروفـی از جملـه کوسـه ماهی‌هـا می‌باشـــد (۱۲). نقش‌هـای اســـاسی ویتـامین A در بـــدن، عـــلاوه بـر سـاخت رنگدانـه‌های بینائی و در نتیجه جلـوگیری از شـب کـوری بوسـیلهٔ رشـد طبیعـی بیشـتر سلـــول هـای بـدن بـه ویـژه رشـد و تکثـیر طبیعـــی انـــواع مختلف سلول های اپی‌تلیـــال می‌باشـد. در فقـــدان ویتـامین A تمـایل بـــه شاخـــی و کراتینـیزه شدن سلول های اپیتلیال افزایش می‌یـابد. تظاهرات کمبـود ویتـــامین A در بدن بصورت پوسته پوسته شـدن پوسـت و گاهی آکنه، نارسائی رشـــد حیوانـات جـــوان از جملـه توقف رشـد اسـکلتی، نـاتوانی در تولیـد مثـــل، کراتینـیزه شـدن و کـدورت قرنیـه و عفونـــی شـدن سـاختمان‌های آسیب دیـــده اپیتلیال و کـــوری بـروز می‌نمـاید بـه همیـن دلیل ویتـــامین A، ویتامین ضـــد عفونـت نامیـــده شـده است (۷،۴).

از گذشتـــه کمبـود ویتـامین D و رابطـــه آن بـــا بیماری راشیتیسـم مـــورد توجـــه پزشـکان بـوده و بـرای درمـان ایـن عارضـه دو روش متفـاوت، مصـرف روغـن کبد ماهـــی و استفـاده از نـور آفتاب توصیه می‌گردیـده است. ویتـامین D بـــرای تشـکیل استخـــوان طبیعـــی لازم است و جذب کلسیم و فسفـــر را از روده‌ها آســـان نمـــوده و قرار گرفتـــن کلسیم در بافت استخـــوان در نتیجهٔ عمـــل این ویتامین می‌باشد. ویتامین D در استحکام، دوام و شکل گیـــری استخـوان هـا و دنـــدان هـا نقـش مهمی را ایفا می‌کنـد. نشـان داده شـــده کـه بیـــن وقـوع ســـرطان کولـون بـا میـزان جـذب کلسـیم رابطـــه معکـــوس وجود دارد. به طوری که یون کلسیم در لومـن روده بـا چربی‌هـا و اسیـــــدهای صفـراوی بـاند شـده و صـابون هـای کلسـیمی را ایجـــاد می‌کنـــد کـه اپیتلیـــوم روده را از مـواد تـــوکسیک نسبتـــاً قـوی محـافظت می‌کنـد و اینکـه احتمـالاً کلسـیم در تنظیـم پرولیفـــراسیون و تمـــایز سلـــول هـای روده مؤثـــر است (۱۰،۶). در بنـــادر جنـــوب کشـور مـا یکـی از مـــوارد غیـــر مصرفی کـه در نتیجـــه صیـــد کوسـه ماهی حاصل می‌شـــود کبد کوسه ماهـــی می‌باشد.

در بعضی از کشورها استخراج روغن کبد مـاهی از برخـی از انـواع کوسـه مـــاهی، بدلیـل غنـی بـودن آن از ویتـــامین هـای A و D و اسیدهای چـرب غیـر اشـباع از اهمیت بـالائی برخـــوردار اسـت. از طـرف دیگـر گـاهی روغن ماهـــی به عنـوان یک محصول فرعـــی در هنگـام تولید پودر ماهـــی به دست می‌آیـد. از ماهی‌هـایی کـه بـه طور عمـده در شمـــال کشـــور برای تهیه پـــودر مـاهی استفاده می‌گردد ماهـــی کیلـــکا می‌باشد و روغن مـاهی کیلکا، ماده جـانبی ایـن فرآینـد محســـوب مـی‌گـردد. در ایـــن تحقیق انتخاب هـــر دو نمـــونه مـــذکور، بـــا توجـه بـه اهمیـت مصـرف روغـــن مـاهی و بـــه منظـور استفـــاده بهینه از منـــابع طبیعی در دسترس، مـد نظـر قـرار گرفتـه است.

مواد و روشها:

مواد و دستگاهها:

اتانول، ایـــــزوپروپیل الکل، پتـــــاس، دی اتیل اتر، متانول (۱)، کلروفورم سدیم سولفادکاهیدرات، متانول (۲)	(Merck, Germany)
کبد کوسه ماهی	Carcharhinus macloti
ماهی کیلکا	Clupeonolla grimi
استاندارد ویتامین	D_3 Roch, Switzerland
سانتریفوژ	Hettich, Zentrifugen D-7200
اسپکتروفتومتر	Spectronic ® Grnesys2 USA
روتاری مجهز به پمپ خلاء	Heidolph, Germany
دستگاه **HPLC** با ستون **250*4.6 mm،Vydac،silica**	HPLC Waters 2487 USA

روش کار:

تهیه نمونه: ماهی کیلکا، از بـــازارهـای محلی در فصل بهار و کبـــد کوســه ماهی از بنـــادر جنوب در فصل پائیز تهیه شـــد و انتقال آنها به آزمایشگاه بصورت یخ زده صورت گرفت. سپس هر دو نمونه در فـــریزر منجمد و نگهداری شـد. مقدار نمونـــه مورد نیـاز بـرای هـر آزمایش، بعـد از رسیدن به دمـــای محیـــط بوسیلـــه آسیاب برقـی خـرد گردید. لازم به ذکـر است جهت آماده سازی نمونه، باید کیســه صفـــرا از کبـد جـدا می گردید.

روشهای مورد استفاده:

۱-استفاده از سیستم مکانیکی: ۱۰۰ گرم از نمـــونه بـــا آسیاب برقی کامـــلاً خرد شده و بـه یک بشر ۲۵۰ml، به همراه ۵۰ ml آب انتقال یافت و به مدت ۲ ساعت داخل بن ماری در حرارت ۷۰°C–۶۰ پخته شد. سپس نمونـه بـه یک کیسه پارچه‌ای انتقال یافت و با فشـار مکـانیکی و بـا استفاده از آب میـوه‌گیری دستی عصـاره گـیری شـد. عصاره بدست آمده با قیف بوخنر حاوی کـاغذ صـافی بـا مکش صاف شد. جداسازی فاز مائی از روغن بـا اسـتفاده از دستگاه سانتریفوژ با سرعت rpm ۳۰۰۰ بـه مـدت ۲۰–۱۵ دقیقه صورت گرفت و حجم روغن در پایان بر حسب میلی لیتر گزارش شد (۸).

۲- روش هضـم قلیـایی: ۱۰۰ گـرم از نمونـه مـــورد نظـــر همـانند روش قبـل کـاملاً خـرد گردیـد و بـه یـــک بشـــر ۲۵۰ml، به همراه ۵۰ml آب انتقـال یـافت و بـه مـدت ۳۰ دقیقه داخل بن ماری با حـرارت ۷۰°C–۶۰ قـرار گرفـت. سپس ۲–۱ درصد وزن ماهی، قلیایی قوی (سود) با غلظت ۱ درصد اضافـه گردیـد. بـه طـوری کـه pH در محـدوده ۹-۸ حفظ گردد. در طی فرآیند عملیـات هـم زدن بـدون وقفه، برای هضم کامل نمونه صورت گرفت. بعد از مدت ۴۰ دقیقه نمونه به یک کپسـول پـارچـه‌ای انتقـال یـافت و همانند روش قبل عمل گردید (۸).

۳- روش استخراج با حلال ایزوپـروپیـل الکـل:۱۰۰ گـرم نمونـه با آسیاب برقـی کـاملاً خـرد شـده و بـه یـک بشـر ۶۰ml ایزوپروپیل الکل به یک بشر ۲۵۰ میلی‌لیتری انتقـال یافت. حجم حلال به گونه‌ای استفاده شد که نمونـه را بـه خوبی مرطوب نموده و کمی بالای نمونه قرار گیرد. برای جلوگیری از تبخیر حلال، درب بشـر بـا اسـتفاده از فویـل آلومینیومی مسـدود گردیـد. بشـر در بـن مـاری در دمـای ۷۰°C–۶۰ بـــه مدت ۳۰–۲۰ دقیقـه با تکان‌هـای مکـرر حرارت داده شد. نمونه سپس در کیسه پارچه‌ای با فشـــار آب میوه‌گیری دستی عصاره گـیری شـد و بوسـیله قیـف بوخنر حاوی صافی با مکش صاف گردید. عملیات فـوق بر روی تفاله ماهی با ۵۰ میلی لیتر ایزوپروپیل الکل تکرار

شد. حاصل صاف شده بـا مـواد جـاذب الرطوبـه (۳ گـرم سـولفات سـدیم) آب گـیری و سـپس بـا قیـف شیشـه‌ای حاوی کاغذ صـافی، صـاف گردیـد. سـپس حـلال آن بـا کمک دستگاه روتاری مجهز به پمپ خلاء تحت حرارت ۴۰°C تبخیر گردید و حجم روغن بدست آمـده در پایـان اندازه‌گیری شد (۸).

۴- روش Bligh & Dyer ۱۰۰ گرم از نمونه با اسـتفاده از آسیاب برقی کاملاً خرد گردیـد و بـا ml ۱۰ کلروفـرم و ۲۰۰ml متـانول (۱) بـه یـک بشـر ۵۰۰ میلی‌لیـتری انتقـال یافت و برای ۴-۲ دقیقه بخوبی مخلوط گردید، به مخلوط ۱۰۰ml کلروفـرم اضافـه و حـدود ۳۰ ثانیـه مخلـوط شـد. سپس ۱۰۰ml آب مقطـر بـه آن افـزوده و اختـلاط تـا ۳۰ ثانیه دیگر صورت گرفت. سـپس بـا قیـف بوخـنر حـاوی کاغذ صافی با مکش صاف گردید. حاصل صافی به یـک دکانتور ۵۰۰ میلی لیتری انتقال یافت. جـدا سـازی بعـد از جدا شدن کامل دو فاز از یکدیگر صـورت گرفـت. لایـه بالائی حاوی آب و متانول و لایه زیرین حـاوی کلروفـرم بوده که حجم کلروفرم حداقل ml ۱۵۰ می‌باشد و حـاوی چربی خالص شده است. لایه کلروفرمی بـه بـالن تـه‌گـرد ۲۵۰ml انتقـال یـافت و بـا اسـتفاده از روتـاری در دمـای ۳۰ °C تحت خلاء، حلال آن تبخیر گردید و مقدار آن بر حسب میلی لیتر گزارش شد (۳).

روش تعیین مقدار ویتامین A:

مقداری از نمونه به صورتی که وزن روغن کمـتر از یک گرم نبوده و نمونه یک گرمی حداقل ۰/۱۵ رتینـول داشته باشد. (۰/۵g روغن کبد کوسه مـاهی و ۰/۳g روغـن ماهی کیلکا) به دقت وزن شد و به یک بالن تـه گـرد تـیره ۱۰۰ میلی لیتری به همـراه ۱۰ml آب مقطـر انتقـال یـافت و برای مدت ۱۰ دقیقه رفلاکس گردید در مرحله بعد ml ۳۰ الکل °۹۶ و ml ۳ محلول پتاس ۹/۱۰ به آن اضافه گردید و مرحله رفلاکس تا ۳۰ دقیقه دیگر ادامه یافت. بعـد از سـرد شدن محلول به همراه ۳۰ml آب مقطر به دکانتور ml ۲۵۰ تیره انتقال یافت و g ۴ پودر نرم سدیم سولفا دکاهیدرات و ۱۵۰ml دی اتیل اتر به آن اضافـه گردیـد و اختـلاط آن بـه آرامی به مـدت ۲ دقیقـه انجـام شـد تـا از ایجـاد امولسـیون جلوگیری شود. بعد از اینکه محلول بـه دو فـاز تقسـیم شـد فاز مائی از فاز اتری جدا گردید و به دکانتور دیگـر انتقـال یافت. عمل استخراج از فاز مائی دوبـار دیگـر و هـر بـار بـا ۲۵ml اتر انجام گرفت و عصاره اتری به دکانتور اول انتقال یافت. در مرحله بعد شستشوی عصاره اتری هر بار با ۵۰ml آب مقطر انجام گرفت تا جائیکـه فـاز مـائی جـدا شـده بـا افزودن معرف فنل فتالئین تغییر رنگ نداده و قلیایی نباشـد. برای جلوگیری از ایجاد امولسیون ، در مرحله اول شستشـو اختلاط باید به آرامی صورت گیرد. سپس عصاره اتری بـه بالن ۲۵۰ میلی‌لیـتری تـیره انتقـال یـافت و بـا اتـر بـه حجـم رسانده شد. در مرحله بعد نمونـــه با استفاده از حرارت تـا حجـم ۳ml تغلیـظ گردیـد. سـپس بـه بالـــن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال یافت و باقیمانده اتـر تحـت جریـان بسـیار آرام گـاز N_2 برطـرف گردیـــد و در مقـــــدار کـــافی ایزوپروپیل الکل حل گردید به طوری که غلظـت ویتـامین A به ۵-۳ میکـروگـرم در میلـــی لیـتر برسـد و بـا جـذب ویتامین A در ۳۲۵ نانومتر در محدودهٔ ۰/۸-۰/۵ قرار گیرد. لازم به ذکـــر است جذب نمونـــه روغـن کبـــد کوسـه ماهی و نمونه روغـن کیلکـا حاصـــل از روش Bligh & Dyer در ml ۲۵ ایزوپروپیل الکل و نمونه کیلکا حاصـــل از روش حلال در ml ۲۵ ایزوپروپیـــل الکل نهـــایی در سر طول مـــوج ۳۱۰ و ۳۲۵ و ۳۳۴ نانومتر خوانـــده شـد. از ایـزوپـروپیـل الکـل بـه عنـوان نمونـه بلانـک استفـــاده گردید. بـــرای محاسبه مـیزان ویتـامین A از رابطـــه زیـر استفاده می‌گردد.

مقدار ویتامین A = $0.549 \frac{A_{325}}{LC}$

L – عرض سل بر حسب

C – غلظـت نمونـه برحسـب گـرم در ۱۰۰ میلـی لیـتر (g/100ml) ایزوپروپیل نهائی

چنانچه جذب نمـــونه در ۳۲۵ نانومتر بین $\frac{A_{325}}{1.03}$ و $\frac{A_{325}}{0.97}$ نباشـد از رابطـه زیـر در تعییـن مقـدار ویتـامین A اســتفاده می‌گردد.

$$VitA(mg) = 0.549\frac{A_{325}}{LC}$$

[A325] = جذب تصحیح شده ویتامین A که از رابطه زیر بدست می‌آید. $[A_{325}] = 6.85A_{325} - 20555A_{310} - 4.260A_{334}$

در ضمن هر یک واحد بین‌المللی ویتامین A برابر بـا ۰/۳ میکروگرم ویتامین A می‌باشد (۱۳).

تعیین مقدار ویتامین D:

برای تعییـن مقـــدار ویتـــامین D_3 از روش HPLC استفاده گردید.

آمـاده سـازی اسـتاندارد ویتـامین D_3 بـرای انجـــام HPLC:

۸/۵ میلی‌گـرم از اسـتاندارد ویتـامین D_3 بـا درصـــد خلوص ۹/۸ درصد (بر اســـاس مقـــدار قید شـده بـر روی بر چسب ظرف) با تـــرازوی آنالیتیک به دقـت وزن شـــد و در یک بالـــن ژوژه ۲۵ میـــلی‌لیتـــری با اتانول (۲) بـه حجـم رسانـــــده شـد. در مرحلـه بعـــد ml ۲ از ایـــــن محلول بـه ml ۱۸ اتانـــــول (HPLC) افـزوده شـــــده و محلول استانـــــدارد بـــا غلظـت ۰/۰۳۳۹۲mg/ml حـاصل گردید (۳).

آماده سازی نمونه:

ml ۱ نمونـه روغـن مـورد نظـــر در یـــک بـــالن ژوژه ml ۱۰۰ بـا اتانـــول (۲) بـه حجـم رسـانده شـد و سـپس بـه کمـک Vortex خـوب تـــکان داده و ml ۱۰ آن بـه بـــالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری انتقـال یـافت و بـا اتـانول (HPLC) بـه حجـم رسـانده شـد بـرای اختـــلاط بـهتر نمونـه مجـــدداً از دستگاه Vortex به مدت ۱۰ دقیقه استفـاده گردید و نمونـه با ضریب رقت ۲۵۰ تهیه شد (۳).

با اسـتفاده از سیسـتم HPLC بـا مشـخصات سـرعت جریان فاز متحرک: ۲ میلی لیتر در دقیقه، رد یـاب مـاوراء بنفش با طول موج ۲۶۵ نانومتر، سـرعت کـاغذ ثبـات: ۰/۵ سـانتیمتر در دقیقـه، حجـم تزریـق: ۱۰۰ میکـرو لیـتر، فـــاز متحرک: متـانول (HPLC) آنالیز انجام گرفت.

محاسبه میزان ویتامین D_3:

برای محاسبه میزان ویتامین D_3 بر حسب میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر از نمونه روغن از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\frac{A_u}{A_s t} \times \frac{C_s T}{V} \times 250 = VitD_3 mg/ml$$

A_u: میـانگین Area نمونه مورد آزمایش، **$A_s t$**: میـــانگین Area نمونـــه استاندارد، **V:** حجـــم برداشتی از نمونـــه، **$C_s T$:** غلظت استانـدارد، ۲۵۰: ضریب رقت نمونه.

جدول شماره ۱: میانگین نتایج به دست آمده از روش های مختلف استخراج بر حسب میلی لیتر

روش استخراج / نمونه	روش مکانیکی	هضم قلیایی	استخراج با حلال	Bilgh & Dyer
کبد کوسه ماهی	۲۰/۵۳±۱/۲۸	۲۲/۰۶ ± ۰/۹ *	۱۰/۱±۰/۵۳	٤٥/۳ ±۳/۰٥
ماهی کیلکا	۳/۲ ±۰/۲۵*	٤/٤٦ ±۰/۳۰*	۳/۹ ±۰/۲	٦/٦۳ ±۰/٥۱

داده ها به صورت میانگین ±انحراف معیار می باشد.

**-روغن ماهی استخراج شده شفاف نبوده و همراه ذراتی از ماهی خرد شده می باشد.*

جدول شماره ۲: میانگین جذب ویتامین A با غلظت ۰/۰۲ g/ml ایزوپروپیل از روغن کبد

طول موج (nm) * / روش استخراج	۳۱۰	۳۲۵	۳۲٤
Bligh & Dyer	۰/۷±۰/۰۱۵	۰/۷۸٤ ±۰/۰۰۸۵	۰/٦٥±۰/۰۱۲
استخراج با حلال	۰/٥۱٤±۰/۰۰۷۲	۰/٥۷۲±۰/۰۱۲	۰/٤۸۱±۰/۰۱۱
روش مکانیکی	۰/٥۰۸ ±۰/۰۰٥۳	۰/٥٦٥ ±۰/۰۰٦۲	۰/٤۷۲ ±۰/۰۰۹

** مقادیر مربوطه میانگین ±انحراف معیار می باشند.*

هر میکروگرم ویتامین D معادل با ۴۰ واحد بین‌المللی می‌باشد (۱۴).

نتایج:

به منظور کاهش خطاهای تصادفی و به دست آوردن جواب صحیح‌تر، استخراج روغن سه مرتبه انجام شد و میانگین نتایج حاصله همراه با انحراف معیار به عنوان پاسخ قابل قبول محاسبه گردید (جدول شماره ۱). میانگین جذب ویتامین A با روش USP برای روغن کبد و ماهی کیلکا به ترتیب در جداول شماره های ۲ و ۳ گزارش گردیده است. در نهایت مقادیر مربوط به ویتامین A و D در این دو روغن به ترتیب در جداول شماره های ۴ و ۵ مشاهده می گردد.

بحث:

در مورد استخراج روغن ازکبد کوسه و ماهی کیلکا ذکر موارد زیر لازم به نظر می‌رسد: در استخراج روغن از نمونه کبد، هر چه رنگ کبد روشن‌تر باشد میزان روغن آن بالاتر می‌باشد. در استخراج روغن به روش مکانیکی، بعد از پایان مرحله سانتریفوژ سه فاز در لوله آزمایش مشاهده می‌شود. فاز بالائی حاوی روغن، در فاز میانی ذرات کبد یا ماهی غنی از چربی و فاز زیرین حاوی آب می‌باشد. روغن بدست آمده غیر شفاف بوده و در رنگ قهوه‌ای مایل به کرم می‌باشد.

جدول شماره ۳: میانگین جذب ویتامین A با غلظت ۰/۰۰۷ g/ml در روش Bligh & Dyer در روغن ماهی کیلکا

طول موج (nm) * / روش استخراج	۳۱۰	۳۲۵	۳۲٤
Bligh & Dyer	۰/٦۰٤ ± ۰/۰۲	۰/٥٥۳ ± ۰/۰۱٥	۰/۳۹٥ ± ۰/۰۰۲
استخراج با حلال	۰/٥٥٦ ± ۰/۰۲	۰/٥۱۸ ± ۰/۰۱۲	۰/۳۷۷ ± ۰/۰۱٦

** مقادیر مربوطه میانگین ±انحراف معیار می باشد.*

جدول شماره ۴: ویتامین A در روغن کبد کوسه ماهی [۱] با غلظت ۰/۰۲g/۱۰۰ و در روغن ماهی کیلکا [۲] با غلظت ۰/۰۱در روش حلالی و ۰/۰۰۷ در Bligh & Dyer بر حسب میلی گرم و واحد بین المللی

میزان جذب و مقادیر ویتامین A روش استخراج	$A_{۳۲۵}$	$A_{۳۲۵/۱۰۳}$	$\{A_{۳۲۵}\}$	Vit A (mg)	Vit A (I.U)
Bligh & Dyer[۱]	۰/۷۸٤	۰/۷۵۸	۰/۷٦	۲۱/۵۲	۷۱۷۲۹
استخراج با حلال [۱]	۰/۵۷۲	۰/۵۵۵	۰/۵۵۰	۱۵/۱۰	۵۰۳۲۸/۳۳
روش مکانیکی [۱]	۰/۵٦۵	۰/۵٤۸	۰/۵٤۲	۱٤/۸۸	٤۹۵۸۸
Bligh & Dyer[۲]	۰/۵۵۳	۰/۵۳۷	۰/۵٤۲	٤۳/۳۷	۱٤٤۵۵۵
استخراج با حلال [۲]	۰/۵۱۸	۰/۵۰۳	۰/۵۰٤	۲٦/۹۲	۸۹۷۵٦

$A_{۳۲۵}$=جذب در طول موج ۳۲۵ نانومتر *$\{A_{۳۲۵}\}$ = جذب استاندارد* *$A_{۳۲۵/۱۰۳}$= نسبت جذب ۳۲۵ به ۱۰۳*
***(I.U)**=واحد بین المللی*

معایب این روش عبارتست از:

کند و سخت بودن مرحلهٔ صاف کردن: به طوری که عصاره حاصل از مرحله پرس، به صورت سوپ یکنواخت و هموژن بوده که با توجه به غلیظ بودن و ناخالصی های زیاد به سختی و کندی صاف می گردد. این مسئله بویژه در نمونه ماهی کیلکا و کبد تیره کوسه ماهی مشاهده شد، ناخالصی های روغن استخراج شده حتی با بالا بردن مدت زمان و افزایش سرعت سانتریفوژ نیز قابل جدا سازی نبود و پائین بودن بازده حاصله (۲/۹۶٪ روغن ماهی کیلکا و ۲۰/۵۳٪ روغن کبد کوسه ماهی) این مسئله احتمالاً بدین علت بوده که با وجود تخریب سلول های کبدی در اثر حرارت دادن مقداری از روغن بوسیلهٔ بافت پروتئینی کبد نگه داشته شده و آزاد نمی گردد (۱۱).

به منظور هضم و تخریب بهتر بافت نمونه مورد نظر و سهولت آزاد سازی روغن از سلول ها از روش هضم قلیایی استفاده شد. در روش استخراج روغن به روش هضم قلیایی حاصل استخراج به صورت روغن شفاف نبوده و شکل سوپ و امولسیونی را می‌دهد که مقدار آن در ۱۰۰ گرم نمونه کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا به ترتیب ۲۳/ ۵ml و ۳/۵ml می‌باشد.

جدول شماره ۵: میانگین‌نتایج بدست آمده از تعیین مقدار ویتامین D_3 در ۱ ml روغن کبد کوسه ماهی [۱] و روغن کیلکا [۲]

روش استخراج	A_st	$*A_u$	Vit D_3 (mg)	Vit D_3 (USP)
Bligh & Dyer[۱]	٤۲۲۰٤۲٤	۱۳٦۷۸/۲۵±۱۱۲۰/٤۰	۰/۰۲۷٤٦۳	۱۱۰
استخراج با حلال[۱]	۳۹۸٤۰۰۱/۵	٦۲۷۵/۵ ± ۵٦۷/۲	۰/۰۱۳۳٦۲	۵۳/۵
روش مکانیکی[۱]	٤۰۹۸۲٤٤/۵	٦۲٦۲/۵ ± ۱۰/۵	۰/۰۱۲۹۳	۵۲
Bligh & Dyer[۲]	٤۳۵۱٦۸۰	۷۹٦۰±٤۰٤	۰/۰۱۵۵۱۷	٦۲

** مقادیر A_u به صورت میانگین±انحراف معیار می باشند.*

A_st= جذب استاندارد *A_u= جذب نمونه* *USP = فارماکوپه آمریکا*

در این روش نیز همانند روش مکانیکی عصاره حاصل از هضم قلیایی بعد از پرس کردن کاملاً غلیظ و به رنگ قهوه‌ای می‌باشد و مشکلاتی که در مرحله صاف کردن و بعد از مرحله سانتریفوژ در روش مکانیکی مطرح گردید. در این روش نیز صادق است.

در روش استخراج با حلال روغن حاصله تیره رنگ، متمایل به قرمز و با بوی نافذ می‌باشد. صاف کردن آن آسان بوده و روغن بدست آمده فاقد ناخالصی می‌باشد. بازده روغن در این روش نیز مطلوب نیست (۳/۹٪ در مورد نمونه کیلکا و ۱۱/۵٪ از نمونه کبد کوسه ماهی).

استخراج به روش Bligh & Dyer سریع و آسان بوده و بازده روغن در این روش نسبت به سایر روش ها بالاتر می‌باشد. (۶/۹٪ در نمونه کیلکا و ۴۶/۴٪ در مورد نمونه کبد کوسه ماهی). روغن استخراج شده از نمونه کیلکا به رنگ تیره، متمایل به قرمز و با ویسکوزیته کم می‌باشد. در حالی که روغن حاصله از نمونه کبد کوسه ماهی روشن و به رنگ کرم و دارای ویسکوزیته بالا می‌باشد.

بررسی نتایج بدست آمده از مقادیر ویتامین A و D در روش های مختلف استخراج:

محدودهٔ ویتامین A در روغن کبد کوسه ماهی از ۵۴ و ۶۷ میلی‌گرم در هر گرم روغن متغیر بوده و با توجه به اینکه هر یک واحد بین‌المللی تقریباً معادل با ۰/۳ µgr رتینول می‌باشد. محدودهٔ ویتامین A از ۱۶۰/۰۰۰ تا ۳۶۰/۰۰۰ واحد بین‌المللی به ازاء هر گرم گزارش شده است (۸).

میزان ویتامین A، در روش Bligh & Dyer نسبت به سایر روش ها بالاتر بوده که این مسئله به فاکتور حلالیت ویتامین A در هر یک از روش های نامبرده بستگی دارد چرا که ویتامین A در حلال های غیر پلار از حلالیت بالاتری برخوردار می‌باشد. همچنین وجود حرارت در طی عملیات استخراج ممکن است سرعت روند تخریب ویتامین A را بیشتر می‌کند. احتمالاً این موضوع در مورد ویتامین D_3 نیز صادق بوده، بدین معنا که حلالیت بالاتر ویتامین D در کلروفرم نسبت به ایزوپروپیل الکل و آب سبب بالاتر بودن آن در روغن استخراج شده به روش Bligh & Dyer می‌باشد. از طرفی احتمالاً مقداری از ویتامین D در روش مکانیکی و استخراج با حلال، بدلیل استفاده از حرارت از بین می‌رود.

تعیین مقدار ویتامین A و D در نمونه روغن کبد استخراج شده به روش هضم قلیایی نمونه روغن ماهی کیلکا که از روش هضم قلیایی و روش مکانیکی بدست می‌آید بدلیل مشکلات ذکر شده و امکان آسیب رساندن به دستگاه HPLC قابل انجام نبود.

یکی از روش های بسیار مهم که امروزه در کارخانجات تولید پودر ماهی کاربرد دارد استفاده از روش مکانیکی است. روغن حاصله در این روش به عنوان محصول فرعی این کارخانجات محسوب می‌شود. محصول اصلی این روش پودر ماهی است که برای خوراک مرغداری‌ها استفاده می‌گردد. ثابت شده روغن حاصله در این روش به علت ویژگی های خاص اسیدهای چرب آن دارای بوی شدید بوده و آمادگی کافی برای اکسید شدن و تشدید بو را دارد. در حال حاضر از روغن حاصله برای چرب کردن بدنه قایق ها استفاده شده و در واقع کاربرد صنعتی دارد. در صورت استفاده از این روغن برای مصرف خوراکی و دارویی پروسهٔ پالایش آن باید به سرعت انجام شده و یا بعد از تهیه شدن تا مرحله پروسهٔ پالایش به آن آنتی‌اکسیدان اضافه شود.

در روش هضم قلیایی، افزودن قلیا باعث تشکیل

صابون و تشکیل امولسیون می‌شود. بالا بودن دما در این پروسه باعث کاهش مقدار ویتامین D که به حرارت بالا حساس می‌باشد را بدنبال خواهد داشت. از طرفی تشکیل امولسیون نیز سبب مشکلاتی در مرحله صاف کردن روغن می‌شود. در نتیجه بنظر می‌رسد استفاده از این روش در این کار تحقیقاتی به دلایل فوق و عدم سرعت مناسب چندان جایگاهی ندارد.

از روش استخراج با حلال برای تهیه کنسانتره پروتئین ماهی (Fish protein concentrate = FPC) که بیشتر مصرف انسانی دارد استفاده می‌شود. چون پودر فوق بایستی از نظر طعم و بو تا حد ممکن مناسب باشد در نتیجه توسط حلال حداکثر روغن موجود در ماهی و مقدار زیادی بو، طعم و رنگ نامناسب پودر آن استخراج می‌شود. هر چند این روش می‌تواند برای بازیابی روغن از کبد ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد اما وجود پراکسید و ناخالصی در حلال های باعث تسریع در اکسیداسیون روغن و کاهش کیفیت آن می‌شود و در نتیجه اکسیداسیون روغن، از دست دادن ویتامین A را نیز به همراه خواهد داشت. در صورتی که منظور تهیه پودر ماهی مناسب بدون استفاده از روغن باشد می‌توان این روش را مورد استفاده قرار داد.

روش Bligh & Dyer در واقع روش تغییر یافته‌ای از روش استخراج با حلال می‌باشد که در این روش از سه حلال ، متانول ، کلروفرم و آب با نسبت‌های مختلف استفاده شده است.

مقدار روغن استخراج شده از کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا و مقدار ویتامین های A و D در مقایسه با سایر روش های بکار رفته بالاتر بوده و در مورد نمونه کبد کوسه ماهی با توجه به نتایج مذکور با استانداردهای موجود در بازار دارویی از جمله روغن کبد کد، از لحاظ کیفیت ظاهری (رنگ) و مقادیر ویتامین های A و D (۲۲۵ میکروگرم ویتامین A و ۲/۱۲۵ میکروگرم ویتامین D در هر گرم روغن کبد کد) که در فارماکوپه آمریکا ذکر شده قابل مقایسه می‌باشد.

طبق مطالب ذکر شده، از بین روش های استخراج انجام شده در این تحقیق، بهترین روش، روش Bligh & Dyer می‌باشد. در ضمن این روش آسان بوده، وقت‌گیر نبوده و مشکلاتی که در مرحله صاف کردن و استخراج نمونه در روش مکانیکی و هضم قلیایی مشاهده گردید در این روش وجود ندارد. بازده روغن در این نسبت به سایر روش ها بالاتر می‌باشد. از لحاظ ظاهری رنگ روغن زرد شفاف بوده و مشابه با رنگ روغن ماهی در فرآورده‌های موجود در بازار می‌باشد و نیز از لحاظ مقادیر ویتامین های A و D نیز نسبت به سایر روش ها از میزان بالاتری برخوردار است اما به نسبت روش ها هزینهٔ بیشتری را در بر دارد.

به هر صورت انتخاب روش استخراج در نهایت بستگی به عوامل مختلف از جمله: کاربرد بعدی روغن، وجود تجهیزات لازم، میزان هزینهٔ مصرفی و غیره دارد که با مشخص کردن این عوامل می‌توان راجع به بهترین روش استخراج برای هر یک از محصولات تصمیم نهایی را اتخاذ نمود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور که پشتیبانی مالی این تحقیق را بعهده داشته تقدیر و تشکر می‌شود.

Reference:

1. Anon S. 300 years of cod liver oil. J Pharm Hist London, 18:6–7, 1988.

2. Branjome ED.; Henney JE. Official monograph for vit A and D USP 24. In: Branjome ED. Henney JE. The united states pharmacopoeia. USP (onvention INC). Rockville: USA, 461: 1890, 1891.

3. Charlona T.; King J.; Lennary M. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. J Chromatogr, 936(1): 215–37, 2001.

4. De Souza J.; De olinera A.; Mijasak CK. Changesin the activities of 21–day pregnant rats due to administration of fish oil by garage. Gen Pharmacol, 29(4): 551-5, 1997.

5. Hellsten G.; Boman K.; Cool S. Effects on fibrinolytic activity of corn oil and a fish oil preparation enriched with omega-3 poly unsaturated fatty acids in a long-term study. Curr Med Res Opin, 13: 133–9, 1993.

6. Hivon K.; Hagan S.; Preparation and analysis of some food fat and oils for fatty acid content by gas–liquid chromatography. J Am Oil Chemists Society, 12: 362–3, 1964.

7. Hole S.; Hole M.; Taylor A. Methods of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dog fish liver oil. J Food Chemistry, 55(3): 215–20, 1996.

8. Hole S.; Hole M.; Taylor KD. Method of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dog fish (aqualus acanthias) liver oil. Food Chemistry, 55(3): 215–20, 1990.

9. Nardini M.; D'Aquino M.; Gentili V.; Di Felice M. Dietary fish oil enhances plasma and LDL oxidation modification in rats. J Nutr Biochemistry, 69: 474–80, 1995.

10. Orada M.; Furukawa H.; Majima T.; Miyazawa T. Fish oil diet affects an oxidative senescence of red blood cells linked to degeneration of spleen cells in mice. Biochemi Biophys Acta, 1487(1): 1-4, 2000.

11. Saders T.; Naismith D.; Cod liver oil platelet fatty acids and bleeding time. Lancet 1: 1189, 1980.

12. Schmidt NS. Der Genalt der Knorpel fish an anti-rachiteschem vitamin. Physiol Chem, 189: 238, 1930.

13. Suzakawa M.; Abbey M.; Clifton PN.; Nestel P.; Enhanced capacity of ω–3 fatty acid enriched mocrophages to oxidize low density lipoprotein mechanisms and effects of antioxidant vitamin. Atherosclerosis, 124(2): 157-69, 1996.