نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۵، زمستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۷۱~۸۸

اندازه گیری اسیدهای چرب در نمونه های ماهی، تخم مرغ و شیر: مقایسه روش های مختلف استخراج

- **مرجان برازجانی** (نویسنده مسئول)
محقق، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **محمدحسین بنابازی**
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **حمیدرضا سیدآبادی**
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **اکبر یعقوبفر**
استاد موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **سعید اسماعیل خانیان**
دانشیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۷
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۶۳۹۸۲۴
Email: ana.borazjani@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.122174.1717

چکیده

در تحقیق حاضر، روش متیله کردن مستقیم چربی با دو روش متداول استخراج چربی (استخراج فولش و سوکسیله) از نظر بازده استخراج، ثبات آرایش فضایی ساختار شیمیایی اسیدهای چرب و تاثیر آنها بر پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، مقایسه گردید. همچنین، با ارزیابی و مقایسه روش های استخراج چربی برای نمونه های ماهی، زرده تخم مرغ و شیر، کارایی این روش ها با توجه به بافت نمونه تعیین گردید. پس از فرآیند استخراج و استری نمودن چربی، اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گازی اندازه گیری شدند. از روش آماری ANOVA با رویه GLM برای مقایسه میانگین داده ها استفاده گردید. همچنین، روش تجزیه کلاستر برای بررسی شباهت میان روش‌ها و میزان تاثیر آنها بر پروفایل اسیدهای چرب مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که گرچه روش استخراج سوکسیله کمترین بازده را برای استخراج اسیدهای چرب، به ویژه در نمونه شیر خشک داشت، اما در مقایسه با استخراج فولش و روش استری کردن مستقیم بالاترین دقت را داشت. همچنین، مشخص گردید که روش‌های مورد استفاده توانایی متفاوتی در استخراج اسیدهای چرب با توجه به میزان غیراشباع بودن آن‌ها دارند. به طور کلی، روش‌های استخراج علاوه بر این که بر پروفایل اسیدهای چرب تاثیر می‌گذارند، میزان این تاثیرگذاری با توجه به بافت نمونه متفاوت می‌باشد. بنابراین، برای انتخاب روش موثر جهت استخراج چربی، در نظر گرفتن بافت نمونه ضرورت دارد.

واژه‌های کلیدی: کروماتوگرافی گازی، اسیدهای چرب امگا-۳ و ۹، استخراج فولش، استخراج سوکسیله

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 125 pp: 71-88

Determination of Fatty Acids in Fish, Egg and Milk: A Comparison of Different Extraction Methods

By: M. Borazjani*[1], M.H. Banabazi[2], H.R. Seidabadi[2], A. Yaghoubfar[3], S. Esmaeilkhanian[4]
1. Researcher, Animal Science Research Institute of Iran
2. Associated Professor, Animal Science Research Institute of Iran
3. Professor, Animal Science Research Institute of Iran
4. Professor, Animal Science Research Institute of Iran

Received: June 2018 **Accepted: January 2019**

In this study, direct methylation was compared with two conventional extraction methods (Soxhlet and Folch) in terms of extraction yield, the stability of configuration of fatty acids chemical structures and their effect on saturated and unsaturated fatty acids profile. Also, by evaluating and comparing fat extraction methods for fish, egg yolk and milk samples, the efficiency of these methods was determined according to the sample tissue. After extraction and esterification procedures, fatty acids were determined by gas chromatography method. The statistical method of ANOVA using GLM technique was applied to compare the mean of data. The fatty acid profile was subjected to analysis similarities based on cluster analysis to check how the methods would affect the fatty acid profile and to evaluate how much differences are between the methods. The obtained results indicated that the Soxhlet had the lowest efficiency for the extraction of fatty acids, especially in a sample of dry milk, but it was the highest precision compared with the Folch and direct methylation methods. It was also found that the methods have different ability to extract fatty acids based on their unsaturation degree. In general, extraction methods, in addition to affecting the fatty acid profile, have a different effect rate, depending on the sample tissue. Therefore, in order to select an effective method for extracting fat, it is necessary to consider the sample tissue.

Key words: gas chromatography, omega3 and 9 fatty acids, Soxhlet method, Folch method.

مقدمه

آنالیز اسیدهای چرب به دلیل نقش بیولوژیکی آن‌ها و تاثیری که بر سلامت انسان دارند اهمیت روزافزونی یافته است. در طبیعت اسیدهای چرب به صورت مواد خالص یا بخشی از مولکول‌های پیچیده‌تر تحت عنوان چربی‌ها وجود دارند. این مولکول های بیولوژیکی به صورت اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب غیراشباع بوده که هر کدام نقش بیولوژیکی بسیار متفاوتی دارند (Kris-Etherton, Harris و همکاران، ۲۰۰۲). اگرچه روش‌های زیادی برای تعیین چربی کل مواد غذایی وجود دارد، ولی روش استخراج با حلال از رایج‌ترین روش‌های به کار رفته برای جداسازی چربی از بافت‌های مختلف و تعیین محتوای کل چربی غذاها می باشد. احتمال تخریب چربی ها به دلیل فرآیند اکسایش اسیدهای چرب غیر اشباع وجود دارد، که این احتمال در حرارت های بالاتر از ۱۰۰ °C افزایش می یابد (Cascant و همکاران، ۲۰۱۷). بنابراین لازم است روشی به کار گرفته شود که قادر به استخراج کامل چربی‌ها باشد بدون این که در ساختار آن‌ها تغییری ایجاد نماید و همچنین مناسب برای به کارگیری با دستگاه‌های تجزیه‌ای باشد.

تحقیقات نشان داده که روش های استخراج تاثیر قابل توجهی بر

بازده استخراج دارند، که به طور مقایسه ای، روش های استخراج با حلال بیشترین بازده را دارند(Delfan-Hosseini وهمکاران ۲۰۱۷). بازده روش استخراج به پارامترهای مختلفی همچون ماهیت حل شونده و حلال، گزینشگری حلال و میزان نفوذ آن در محیط بستگی دارد (Caprioli وهمکاران، ۲۰۱۶). بنابراین، انتخاب حلال مناسب نقش مهمی در فرآیند استخراج دارد. هگزان به دلیل نقطه جوش پایین، قطبیت پایین و ثبات شیمیایی از رایج ترین حلال مورد استفاده جهت استخراج فرآورده ای طبیعی در صنایع غذایی می باشد (Cascant و همکاران، ۲۰۱۷). بازده استخراج چربی برای روش هایی که از مخلوط حلال‌ها استفاده می نمایند، به دلیل استخراج چربی‌های درون سلولی، بیشتر از روش های استخراج تک حلالی است (Fiori و همکاران، ۲۰۱۳). چربی‌های خالص با توجه به قدرت نسبی برهمکنش‌های میان حلال و بخش آب گریز یا آب دوست مولکول چربی، در حلال‌های مختلفی قابل حل می‌باشند. چربی‌ها در حلال‌های قطبی مانند الکل‌ها، به ویژه متانول، غیرقابل حل می‌باشند؛ هر چه طول زنجیره اسیدهای چرب موجود در این چربی‌ها کاهش یابد یا طول زنجیره حلال الکلی افزایش یابد، حلالیت این چربی‌ها در حلال قطبی افزایش می‌یابد (Rosenfeld، ۲۰۰۲) مخلوط حلال متانول با دیگر حلال‌ها برای جداسازی چربی‌های قطبی و خنثی موثرتر می‌باشد (Sahasrabudhe & Smallbone، ۱۹۸۳). در سال ۱۹۵۷، فولش و همکارانش از روش اصلاح شده‌ای برای استخراج چربی‌های قطبی و خنثی استفاده نمودند (Folch و همکاران، ۱۹۵۷). دو سال بعد، بلیژ و دایر اصلاحاتی را در روش فولش انجام دادند، به این صورت که از همان حلال‌های روش فولش استفاده نمودند، اما با افزایش آب به حلال‌های آلی بازده استخراج را بهبود بخشیدند (Bligh & Dyer، ۱۹۵۹). گرچه از این روش های کلاسیک، به کرات برای استخراج چربی استفاده شده، اما به دلیل تنوع بافت چربی و تفاوت ضخامت سلولی، کارایی این روش ها با توجه به حلال مورد استفاده متفاوت خواهد بود (Otero ، ۲۰۱۷). در تحقیقاتی، چهار روش فولش، بلیژ- دایر، رز-گوتلیب و ژربر برای استخراج چربی شیر مقایسه شدند (de Morais و همکاران، ۲۰۰۸). این روش های استخراج بر پروفایل اسیدهای چرب شیر تاثیری نداشتند اما بازده روش استخراج ژربر از بقیه بیشتر بود. علی رغم پروفایل اسیدهای چرب مشابه، روش‌های رز-گوتلیب و ژربر در مقایسه با روش‌های استخراج فولش و بلیژ- دایر مواد جانبی بیشتری تولید نمودند. حلال‌هایی که الکل ندارند همچون کلروفرم- استون، هگزان و دی اتیل اتر بایستی در فرآیندهای استخراج مورد استفاده قرار گیرند تا از ایجاد مواد جانبی جلوگیری شود (Rosenfeld، ۲۰۰۲) پراکسیدازها در مایعات استخراج‌کننده‌ای همچون دی اتیل اتر، تتراهیدروفوران و غیره تولید مواد جانبی می‌نمایند (Brondz، ۲۰۰۲).

معمولا پیش از شناسایی و اندازه گیری اسیدهای چرب توسط تکنیک کروماتوگرافی گازی، به منظور متیل دار کردن اسیدهای چرب، چربی استخراج شده تحت فرآیند استری شدن قرار می گیرد. گزارش هایی وجود دارد مبنی بر اینکه جهت اندازه گیری اسیدهای چرب باکتری، مرحله استخراج چربی حذف شده و استری کردن مستقیم نمونه های باکتری جهت بازیافت اسیدهای چرب در یک مرحله انجام شده است (Lewis، ۲۰۰۰). به مرور، این روش به دلیل مزایایی همچون صرفه جویی در زمان و کاهش مصرف حلال، مورد توجه بیشتری قرار گرفت. با وجود اینکه در این روش، افزایش بازده استخراج اسیدهای چرب از نمونه های شیر و باکتری مشاهده شده، اما بازده استخراج از بافت گیاهان تغییری نداشته است. علاوه بر این، اسیدهای چرب غیراشباع تخم مرغ با روش مستقیم (متیل دار کردن بدون پیش استخراج چربی)

با صحت خوبی اندازه گیری شده است (Stibilj و همکاران، ۱۹۹۹). فرآیند استخراج چربی قبل از متیل دار کردن می تواند حذف گردد، بدون این که تاثیری بر بازده اسیدهای چرب بلند زنجیر داشته باشد (Kang & Wang، ۲۰۰۵). حذف کلروفیل از بافت نمونه در اثر مجاورت با اسید، از عوامل موثر بر افزایش کیفیت چربی طی این فرآیند ذکر شده است (Otero و همکاران، ۲۰۱۷).

هدف از این تحقیق، ارزیابی و مقایسه تکنیک های استخراجی رایج، از نظر بازده استخراج همه انواع اسیدهای چرب و بررسی تاثیر آنها بر ثبات و پایداری آرایش فضایی پیوندهای دوگانه در این ساختارهای شیمیایی می باشد. تحقیقات نشان داده که قبل از مقایسه داده های به دست آمده از منابع مختلف، لازم است که روش به کار رفته جهت استخراج و اندازه گیری اسیدهای چرب، مورد توجه قرار گیرد (Lewis و همکاران، ۲۰۰۰). گرچه تا کنون روش‌های زیادی برای استخراج و متیله کردن اسیدهای چرب گزارش شده است، اما این روش‌ها با توجه به بافت نمونه اندازه‌گیری‌شونده بهینه‌سازی و مقایسه نشده‌اند. در این تحقیق، روش های متداول استخراج چربی (فولش و سوکسیله) با روش مستقیم (استخراج - متیل دار کردن تک مرحله ای) از نظر بازده استخراج و تاثیری که بر پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع دارند، در سه بافت مختلف ماهی، زرده تخم مرغ و شیر ارزیابی و مقایسه می شوند. همچنین با توجه به اهمیت و نقش اسیدهای چرب غیراشباع مزدوج، این روش‌ها از نظر حفظ آرایش فضایی پیوندهای دوگانه تحت شرایط اعمال شده جهت استخراج چربی، بررسی می شوند.

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

متانول (GC grade) ، کلروفرم (GC grade) ، کلرید سدیم (۹۹٪)، پترولیم بنزن (GC grade)، اسید سولفوریک (۹۸٪)، تولوئن (GC grade) از شرکت Merck آلمان خریداری شد و استانداردهای اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع (استئاریک اسید، پالمتیک اسید، لینولئیک اسید، لینولنیک اسید، γ- لینولنیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید[1]) از شرکت Fluka خریداری گردید. پودر ماهی (خوراک دام) از شرکت فرآورده‌های دریایی پارس کیلکا تهیه گردید. نمونه شیر خشک (Nestle) نیز از داروخانه تهیه گردید.

دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل 6890 N Agilent مجهز به ستون کاپیلاری SGE-70 با طول ۱۲۰ متر، سیستم تزریق Split-Splitless و دتکتور FID ، دستگاه SOXTEC ساخت شرکت Foss Tecator آلمان

استخراج چربی از نمونه‌ها

استخراج به روش فولش

پس از جدا نمودن زرده تخم مرغ، ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد آون حرارت داده و خشک شد و سپس آسیاب گردید تا به صورت پودری شکل در آید. چربی کل توسط روش اصلاح شده فولش استخراج گردید (Folch و همکاران، ۱۹۵۷). به این صورت که یک گرم از نمونه مورد نظر (پودر زرده تخم مرغ ، پودر ماهی و یا شیر خشک) را در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم- متانول با نسبت دو به یک حجمی/حجمی به ارلن اضافه شد و سپس به مدت دو ساعت در دمای محیط با همزن مغناطیسی همزده شد. سپس نمونه توسط یک صافی سلولزی (واتمن شماره ۴) صاف شد و به یک قیف

1. Docosahexaenoic acid (DHA)

جداکننده ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. ۳۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به قیف جداکننده اضافه و پس از جداسازی دو فاز، فاز آبی دور ریخته شد. فاز کلروفرمی توسط سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شده و عصاره به منظور حلال‌زدایی در آون قرار داده شد. پس از خشک شدن کامل نمونه، وزن چربی به دست آمده با ترازوی دیجیتال با دقت ده هزارم میلی‌گرم تعیین شد. برای به دست آوردن درصد چربی استخراج شده به روش وزن‌سنجی، نسبت وزنی چربی به دست آمده به وزن نمونه اولیه با توجه به فرمول مقابل محاسبه گردید:

$$\% \text{ چربی} = (a-b)/w \times 100 .$$

که در این فرمول a وزن ظرف به علاوه چربی استخراج شده می‌باشد و b وزن ظرف و w وزن نمونه اولیه می‌باشد. اندازه‌گیری محتوای چربی با استفاده از دستگاه GC انجام شد و به این صورت پنج بار تکرار شد و از نتایج به دست آمده میانگین‌گیری شد.

استخراج به روش سوکسیله

به منظور استخراج چربی نمونه‌های پودر ماهی و زرده تخم مرغ و شیر خشک به روش سوکسیله، از دستگاه سوکس‌تک استفاده گردید (طبق دستور کار ارائه شده در کاتالوگ دستگاه). به این صورت که پس از توزین، دو گرم از پودر هر یک از نمونه‌ها، در ظرف مخصوصی در دستگاه سوکس‌تک به مدت دو ساعت در دمای ۱۳۵ درجه سانتیگراد با ۷۰ میلی‌لیتر حلال پترولیم اتر قرار داده شد. سپس چربی استخراج شده به منظور حلال‌زدایی در آون قرار داده شد. برای به دست آوردن درصد چربی استخراج شده به روش وزن‌سنجی، نسبت وزنی چربی به دست آمده به وزن نمونه اولیه با توجه به فرمول مقابل محاسبه گردید:

$$\% \text{ چربی} = (a-b)/w \times 100 .$$

که در این فرمول a وزن ظرف به علاوه چربی استخراج شده می‌باشد و b وزن ظرف و w وزن نمونه اولیه می‌باشد. اندازه‌گیری محتوای چربی با استفاده از دستگاه GC انجام شد و به این صورت پنج بار تکرار شد و از نتایج به دست آمده میانگین‌گیری شد.

اندازه‌گیری به روش مستقیم

برای اندازه‌گیری مستقیم، بدون این که مرحله استخراج انجام شود، مقدار ۵۰ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌ها (پودر زرده تخم‌مرغ، پودر ماهی و شیر خشک) در یک لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شد و با استفاده از معرف اسید سولفوریک – متانول (مطابق با روش ذکر شده در بند بعدی) استری گردید Christie(، ۱۹۸۹). اندازه‌گیری محتوای چربی با استفاده از دستگاه GC انجام شد و به این صورت پنج بار تکرار شد و از نتایج به دست آمده میانگین‌گیری شد.

متیله کردن اسیدهای چرب

مقدار ۱۰ میلی‌گرم از چربی نمونه مورد نظر (پودر زرده تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک) را برداشته و یا مخلوط استانداردهای اسیدهای چرب (استئاریک اسید، پالمتیک اسید، لینولئیک اسید، لینولنیک اسید، γ- لینولنیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید) با غلظت ppm ۲۰۰ با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم از هر اسید چرب در ۵۰ میلی‌لیتر متانول تهیه شد و سپس یک میلی لیتر از آن برداشته شد و در یک لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری درپوش‌دار ریخته شد و یک میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. سپس یک میلی‌لیتر از معرف اسید سولفوریک – متانولی (۲٪ حجمی- حجمی) به مخلوط اضافه و همراه با تکان دادن مخلوط گردید. درب ظرف را بسته و این مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه در حمام بخار ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا عمل استری شدن اسیدهای چرب صورت پذیرد. در مرحله بعدی، به منظور استخراج اسیدهای چرب، پنج میلی‌لیتر

محلول نمکی کلرید سدیم (۵٪ وزنی- حجمی) به مخلوط اضافه نموده و در دو مرحله هر بار با پنج میلی‌لیتر هگزان، اسیدهای چرب به درون فاز آلی هگزان استخراج شد. در نهایت به منظور خنثی نمودن اسید باقیمانده و جلوگیری از تخریب ستون کروماتوگرافی گازی، چهار میلی‌لیتر محلول قلیایی بیکربنات سدیم (۲٪ وزنی – حجمی) اضافه گردید (Christie، ۱۹۸۹). اندازه‌گیری متیل‌استر اسیدهای چرب به این صورت سه بار تکرار شد و از نتایج به دست آمده میانگین گیری شد.

آنالیز پروفایل اسیدهای چرب توسط کروماتوگرافی گازی

پس از آماده سازی نمونه‌ها و استری نمودن آن‌ها به روش‌های ذکر شده در فوق، یک میکرولیتر از محلول اسیدهای چرب آماده‌سازی شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. در اینجا از روش کالیبراسیون استاندارد خارجی استفاده گردید. دمای سیستم تزریق ۲۳۰ درجه سانتیگراد و دمای دتکتور ۲۶۰ درجه سانتیگراد بود و برنامه دمایی ستون به صورت دمای اولیه ۱۸۰ درجه سانتیگراد و با سرعت پنج درجه بر دقیقه به دمای ۲۳۰ درجه سانتیگراد رسید. از گاز حامل نیتروژن و با سرعت جریان[2] میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده گردید.

محاسبات آماری

برای مقایسه میانگین روش‌ها و اسیدهای چرب از روش آماری ANOVA با رویه GLM و با به کارگیری نرم افزار SAS 9.1 استفاده گردید. در این آنالیز، سه روش استخراج به عنوان سه فاکتور و ۱۳ نوع اسید چرب به عنوان ۱۳ صفت در نظر گرفته شد و تفاوت معنی‌دار بودن آن‌ها با لحاظ نمودن عدم اطمینان ۵٪ ارزیابی گردید.

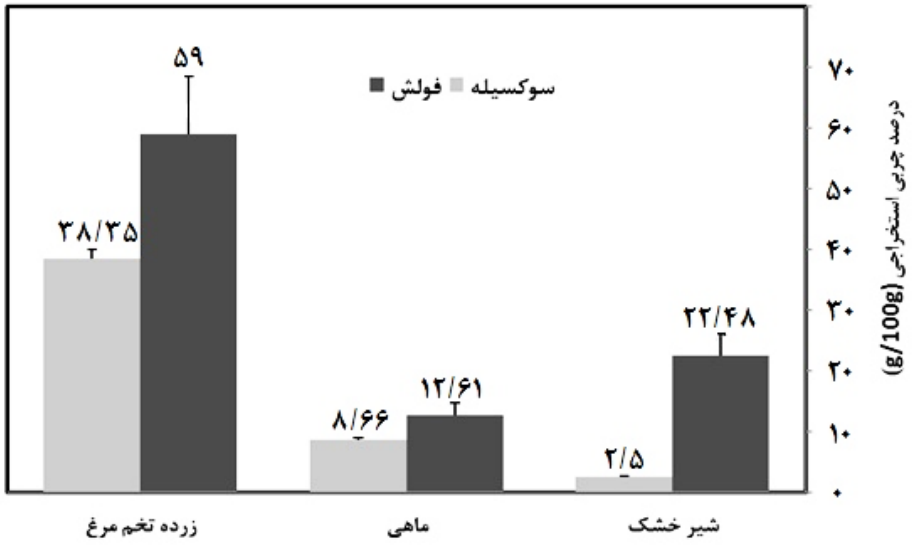
برای گروه بندی روش‌ها و اسیدهای چرب در نمونه های آزمایشی مختلف از تجزیه کلاستر[3] با به کارگیری نرم افزار SPSS استفاده شد. با در نظر گرفتن سه روش استخراج به عنوان سه جزء و ۱۳ اسید چرب مربوط به سه نمونه (۳۹ متغیر) به عنوان متغیر، آنالیز آماری تجزیه کلاستر صورت پذیرفت. به منظور انجام آنالیز واریانس و سپس مقایسه میان میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن[4]، پروفایل اسیدهای چرب با توجه به نوع نمونه و اشباع یا اشباع نبودن اسیدهای چرب به نه دسته تقسیم بندی شد و آزمون دانکن با سطح عدم اطمینان ۵٪ توسط نرم افزار SPSS بر روی داده‌ها صورت پذیرفت.

نتیجه ها و بحث

مقایسه روش‌های استخراج بر اساس آزمون وزن‌سنجی محتوای چربی

مقایسه وزن‌سنجی میان محتوای چربی سه نمونه آزمایشی با دو روش استخراج فولش و سوکسیله در نمودار (۱) نشان داده شده است. مشاهده می‌گردد که میزان چربی محاسبه شده به طریق وزن‌سنجی از روش استخراج سوکسیله کمترین مقدار را داراست (P<۰/۰۵). در مطالعات قبلی نشان داده شده بود که روش‌های استخراجی که از مخلوط چند حلال با قطبیت‌های متفاوت استفاده می‌شود (مثل روش فولش و فولش اصلاح شده) توانایی استخراج چربی‌های درون بافتی بیشتری نسبت به روش‌های استخراج با تک حلال دارند (Panavaitė، ۲۰۰۶). علاوه بر این، نتایج به دست آمده از سنجش وزن‌سنجی محتوای چربی با دو روش استخراج فولش و سوکسیله، با توجه به بافت نمونه متفاوت است، به طوری که در نمونه تخم مرغ و پودر ماهی پاسخ استخراج فولش تقریبا ۱/۵ برابر سوکسیله و در نمونه شیر خشک این نسبت ۹ برابر می‌باشد (P<۰/۰۵). بنابراین سنجش وزن‌سنجی چربی استخراج شده به روش سوکسیله، روش مناسبی برای تخمین انرژی مواد نمی‌باشد و بایستی نوع بافت نمونه هم در این نوع سنجش‌ها در نظر گرفته شود.

2. Flow rate
3. Cluster Analysis
4. Duncan test



نمودار ۱- مقایسه وزن‌سنجی محتوای چربی سه بافت مختلف (زرده تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک)

تاثیر روش‌های استخراج بر روی پروفایل اسیدهای چرب

تاثیر سه روش استخراج بر پروفایل اسیدهای چرب موجود در بافت نمونه های مختلف (زرده تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک) در جداول (۱، ۲ و ۳) ارزیابی و مقایسه شده است. با توجه به مقایسه آماری مقادیر میانگین اسیدهای چرب اینگونه استنباط می گردد که نوع روش استخراج مورد استفاده، بر برخی از اسیدهای چرب تاثیر معنی دار ($P<۰/۰۵$) داشته است. همچنین، نحوه این تاثیرگذاری با نوع بافت نمونه نیز در ارتباط است.

تاثیر سه روش استخراج بر هر یک از اسیدهای چرب بافت زرده تخم مرغ در جدول (۱) بررسی و مقایسه شده است. محاسبات آماری نشان داد که با در نظر گرفتن استئاریک اسید (C18:0)، هر سه روش استخراج با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P<۰/۰۵$) و مقدار استئاریک اسید (C18:0) استخراج شده از روش اندازه‌گیری مستقیم بیشتر از فولش و فولش بیشتر از سوکسیله می‌باشد. برای اسیدهای چرب پالمیتیک (C16:0)، لینولئیک (امگا-۶) (C18:2) و اولئیک (امگا-۹) (C18:0)، روش فولش و اندازه‌گیری مستقیم تفاوت معنی‌داری ندارند، در حالی که با روش سوکسیله این اختلاف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). برای استخراج اسیدهای چرب پالمیتولئیک (امگا-۷) (C16:1) و C20:1، تفاوت روش‌های فولش و سوکسیله معنی‌دار بود، با این وجود، روش اندازه‌گیری مستقیم تفاوتی با دو روش دیگر نداشت. سه روش استخراج مذکور برای اسیدهای چرب α- لینولنیک (امگا-۳) (C18:3)، γ-لینولنیک (امگا-۶) (C18:3)، میریستیک (C14:0)، لوریک (C12:0) و دوکوزاهگزانوئیک اسید(امگا-۳) (C22:6) تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- مقایسه درصد هر یک از اسید چرب‌های استخراج شده از نمونه زرده تخم مرغ به سه روش استخراج فولش، سوکسیله و مستقیم

	استخراج فولش	استخراج سوکسیله	روش مستقیم
C10:0	۰/۰	۰/۰	۰/۰
C12:0	۰/۰	۰/۰۱۳±۰/۰۱۳	۰/۰
C14:0	۰/۰ ^{b}	۰/۰۳±۰/۰۰۱ ^{a}	۰/۰۲۵±۰/۰۱۱ ^{a}
C16:0	۲/۳۴۴±۰/۰۶۱ ^{a}	۱/۳۲۸±۰/۰۲۲ ^{b}	۲/۴۰۷±۰/۰۸۵ ^{a}
C16:1	۰/۲۳۷±۰/۰۰۷ ^{a}	۰/۱۵۳±۰/۰۰۲ ^{b}	۰/۱۹۲±۰/۰۲۶ ^{ab}
C18:0	۰/۹۹۳±۰/۰۲۷ ^{b}	۰/۵۰۸±۰/۰۱۰ ^{c}	۱/۰۸۹±۰/۰۳۶ ^{a}
C18:1	۲/۷۴۹±۰/۰۷۹ ^{a}	۱/۷۶۸±۰/۰۲۷ ^{b}	۲/۶۳۴±۰/۱۵۳ ^{a}
C18:2	۰/۹۰۷±۰/۰۲۷ ^{a}	۰/۴۹۶±۰/۰۱۴ ^{b}	۰/۹۱۹±۰/۰۳۲ ^{a}
γ-C18:3	۰/۰	۰/۰۳۲±۰/۰۲۴	۰/۰۴۹±۰/۰۲۱
α-C18:3	۰/۰	۰/۰۴۶±۰/۰۱۸	۰/۰۵۷±۰/۰۳۰
C20:1	۰/۰ ^{b}	۰/۰۴±۰/۰۱۶ ^{a}	۰/۰۲±۰/۰۱۲ ^{ab}
C22:1	۰/۰	۰/۰	۰/۰
C22:6	۰/۰۱۵±۰/۰۱۵	۰/۰	۰/۰۱۷±۰/۰۱۷

حروف غیرمشابه a و bو c در یک سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ میان میانگین اسیدهای چرب به دست آمده از سه روش استخراج (تیمارها) می باشد

تاثیر سه روش استخراج بر بازیافت هر یک از اسیدهای چرب بافت نمونه ماهی در جدول (۲) نشان داده شده است. با توجه به جدول، برای برخی از اسیدهای چرب نحوه این تاثیرگذاری با بافت نمونه تخم مرغ فرق دارد. در این بافت، سه روش استخراج مذکور برای اسیدهای چرب α- لینولنیک (امگا-۳) (C18:3)، γ-لینولنیک (امگا-۶) (C18:3)، لوریک (C12:0)، دوکوزاهگزانوئیک (C22:6)، اروسیک اسید (C22:1)، C20:1 تفاوت معنی‌داری نداشتند (P<۰/۰۵).

در حالی که، هر سه روش استخراج برای اسیدهای چرب استئاریک(C18:0)، اولئیک (C18:1) و پالمیتیک (C16:0) با هم تفاوت معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵)، به طوری که مقدار این اسیدهای چرب استخراج شده از روش اندازه‌گیری مستقیم بیشتر از فولش و فولش بیشتر از سوکسیله می‌باشد. همچنین، برای اسیدهای چرب پالمیتولئیک (C16:1) و لینولئیک، روش‌های استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم مشابه، اما روش سوکسیله با دو روش مذکور متفاوت بود و بازدهی کمتری داشت.

جدول ۲- مقایسه درصد هر یک از اسید چرب‌های استخراج شده از نمونه پودر ماهی به سه روش استخراج فولش، سوکسیله و مستقیم

	استخراج فولش	استخراج سوکسیله	روش مستقیم
C10:0	۰/۰	۰/۰	۰/۰
C12:0	۰/۰۳۲±۰/۰۰۱	۰/۰۲۷±۰/۰۰۱	۰/۰۲۵±۰/۰۰۴
C14:0	۰/۰۷۶±۰/۰۰۳^{a}	۰/۰۴۸±۰/۰۰۱^{b}	۰/۰۵۸±۰/۰۰۵^{b}
C16:0	۱/۰۵۴±۰/۰۵۶^{b}	۰/۸۴±۰/۰۱۹^{c}	۱/۴۵۴±۰/۰۳۴^{a}
C16:1	۰/۰۷۲±۰/۰۰۴^{a}	۰/۰۴۳±۰/۰۰۳^{b}	۰/۰۷۳±۰/۰۰۷^{a}
C18:0	۰/۳۰۸±۰/۰۲۱^{b}	۰/۲۲۲±۰/۰۰۶^{c}	۰/۳۹۶±۰/۰۱۴^{a}
C18:1	۰/۸۲۲±۰/۰۴۷^{b}	۰/۴۱۴±۰/۰۳۲^{c}	۱/۰۰۹±۰/۰۳۳^{a}
C18:2	۰/۱۶۳±۰/۰۱۶^{a}	۰/۰۰۱±۰/۰۰۱^{b}	۰/۱۴۷±۰/۰۳۹^{a}
γ-C18:3	۰/۰۱۹±۰/۰۱۴	۰/۰	۰/۰۰۶±۰/۰۰۵
α-C18:3	۰/۰۳۹±۰/۰۲۱	۰/۰۰۸±۰/۰۰۵	۰/۰۱۸±۰/۰۰۸
C20:1	۰/۰۰۷±۰/۰۰۴	۰/۰۰۴±۰/۰۰۲	۰/۰
C22:1	۰/۰	۰/۰	۰/۰
C22:6	۰/۰۱۶±۰/۰۱۶	۰/۰	۰/۰

حروف غیرمشابه a و bو c در یک سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ میان میانگین اسیدهای چرب به دست آمده از سه روش استخراج (تیمارها) می باشد

به دلیل وجود امولسیفایرها در بافت شیر خشک و در نتیجه امتزاج فاز آبی و آلی، شیر خشک به روش مستقیم قابل اندازه‌گیری نبود، بنابراین فقط روش های فولش و سوکسیله جهت استخراج اسیدهای چرب از بافت نمونه شیر خشک مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به جدول(۵)، تاثیر روش استخراج بر اغلب اسیدهای چرب نمونه شیر خشک معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). برای اسیدهای چرب لوریک، میریستیک، استئاریک، اولئیک (C18:1)، پالمیتیک، α- لینولنیک و لینولئیک، روش‌های استخراج فولش و سوکسیله تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، به طوری که میزان این اسید چرب‌های استخراج شده توسط روش فولش بسیار بیشتر از روش سوکسیله بود. دو روش استخراج مذکور برای اسیدهای چرب پالمیتولئیک (C16:1)، γ- لینولنیک، اروسیک اسید(C22:1)، C20:1 و دوکوزاهگزانوئیک تفاوت معنی‌داری نداشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه درصد هر یک از اسید چرب‌های استخراج شده از شیر خشک به دو روش استخراج فولش و سوکسیله

	استخراج فولش	استخراج سوکسیله
C10:0	۰/۰۵۸±۰/۰۰۳[a]	۰/۰[b]
C12:0	۰/۰۲۸۲±۰/۰۱۶[a]	۰/۰۲۷±۰/۰۰۱[b]
C14:0	۰/۱۴۹±۰/۰۰۸[a]	۰/۰۱۴±۰/۰۰۱[b]
C16:0	۰/۶۶۳±۰/۰۴۹[a]	۰/۰۶۶±۰/۰۰۲[b]
C16:1	۰/۰	۰/۰
C18:0	۰/۱۳۶±۰/۰۱۱[a]	۰/۰۱۴±۰/۰۰۲[b]
C18:1	۰/۸۳۵±۰/۰۶۷[a]	۰/۰۷۸±۰/۰۰۲[b]
C18:2	۰/۴۰۸±۰/۰۲۸[a]	۰/۰۳۷±۰/۰۰۲[b]
γ-C18:3	۰/۰۱۷±۰/۰۱۱	۰/۰
α-C18:3	۰/۰۷۷±۰/۰۰۷[a]	۰/۰۰۵±۰/۰۰۳[b]
C20:1	۰/۰	۰/۰
C22:1	۰/۰	۰/۰
C22:6	۰/۰	۰/۰

حروف غیرمشابه a و b و c در یک سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0/05$ میان میانگین اسیدهای چرب به دست آمده از سه روش استخراج (تیمارها) می باشد

تاثیر روش استخراج بر اسیدهای چرب کل، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع به طور تفکیک شده با توجه به بافت نمونه در جداول (۴، ۵ و ۶) نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که اسید چرب کل استخراج شده توسط سه روش با توجه به بافت نمونه با هم تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) دارند. با مقایسه آماری مقادیر میانگین اسید چرب کل حاصل از سه روش استخراج مشخص می شود که در بافت ماهی، کارایی روش اندازه‌گیری مستقیم بیش از فولش و فولش بیشتر از سوکسیله می‌باشد. مقایسه مقادیر میانگین SFA استخراج شده توسط سه روش فولش، سوکسیله و مستقیم در بافت های مختلف نشان می‌دهد که مقادیر SFA استخراج شده توسط روش فولش و مستقیم، بسیار بیشتر از روش سوکسیله است؛ که این اختلاف با توجه به بافت نمونه تخم مرغ مشهودتر است. بنابراین، با مقایسه کارایی هر یک از روش‌های استخراج با توجه به بافت نمونه، این نتیجه حاصل می‌شود که کارایی هر یک از این روش‌ها برای استخراج SFA با توجه به بافت نمونه نیز تفاوت معنی دار دارند ($P<0/05$)، به طوری که کارایی استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم در بافت زرده تخم مرغ با هم برابر است، اما در بافت پودر ماهی، روش اندازه‌گیری مستقیم کارایی بیشتری نسبت به فولش دارد. در مجموع می‌توان گفت به جز نمونه شیر خشک که به دلیل امتزاج فاز آبی و آلی و تشکیل امولسیون، به روش اندازه‌گیری مستقیم غیرقابل اندازه‌گیری بود، کارایی روش اندازه‌گیری مستقیم برای استخراج SFA بیشتر از دیگر روش هاست. هچنین، مقایسه مقادیر میانگین MUFA را در بافت های مختلف نشان می دهد که روش سوکسیله نسبت به دو روش دیگر، توان کمتری برای استخراج MUFA دارد و این اختلاف در نمونه‌های پودر ماهی و شیر خشک مشهودتر است. همچنین نتیجه می‌شود که کارایی روش فولش و اندازه‌گیری مستقیم برای استخراج MUFA از بافت تخم مرغ و پودر ماهی یکسان است. بر اساس داده های به دست آمده این نکته قابل توجه می‌باشد که روش سوکسیله قابلیت کمی برای استخراج PUFA دارد، در حالی که روش‌های فولش و اندازه‌گیری مستقیم برای استخراج این دسته از اسیدهای چرب مناسب‌تر می‌باشند. در نمونه ماهی، استخراج PUFA به روش فولش نتیجه بیشتری می‌دهد، این در حالی است که برای نمونه تخم مرغ اندازه‌گیری مستقیم پاسخ بیشتری می‌دهد.

جدول ٤- مقایسه تفکیکی درصد اسید چرب‌های کل، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع استخراج شده از نمونه زرده تخم مرغ به سه روش استخراج فولش، سوکسیله و مستقیم

	استخراج فولش	استخراج سوکسیله	روش مستقیم
SFA۵	۳/۳۳۸±۰/۰۸۷[a]	۱/۸۷۹±۰/۰۲۸[b]	۳/۵۲۱±۰/۱۱۳[a]
MUFA۶	۲/۹۸۶±۰/۰۸۶[a]	۱/۹۶۲±۰/۰۴۰[b]	۲/۸۴۵±۰/۱۹۰[a]
PUFA۷	۰/۹۲۲±۰/۰۳۶[a]	۰/۵۷۵±۰/۰۵۳[b]	۱/۰۴۲±۰/۰۷۵[a]
total FA۸	۷/۷۲۸±۰/۲۱۹[a]	۴/۵۸۸±۰/۰۸۸[b]	۷/۴۶۷±۰/۲۸۶[a]

حروف غیرمشابه a و bو c در یک سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ میان میانگین اسیدهای چرب به دست آمده از سه روش استخراج (تیمارها) می باشد

جدول ٥- مقایسه تفکیکی درصد اسید چرب‌های کل، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع استخراج شده از پودر ماهی به سه روش استخراج فولش، سوکسیله و مستقیم

	استخراج فولش	استخراج سوکسیله	روش مستقیم
SFA	۱/۴۷۱±۰/۰۷۷[b]	۱/۱۳۶±۰/۰۲۸[c]	۱/۹۳۵±۰/۰۴۶[a]
MUFA	۰/۹۰۱±۰/۰۵۲[b]	۰/۴۶۲±۰/۰۳۴[c]	۱/۰۸۲±۰/۰۳۷[a]
PUFA	۰/۲۳۸±۰/۰۶۳[a]	۰/۰۰۹±۰/۰۴۶[b]	۰/۱۷۱±۰/۰۴۹[a]
total FA	۲/۶۰۹±۰/۱۴۸[b]	۱/۶۱۳±۰/۰۲۸[c]	۳/۲۱۹±۰/۱۱۱[a]

حروف غیرمشابه a و bو c در یک سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ میان میانگین اسیدهای چرب به دست آمده از سه روش استخراج (تیمارها) می باشد

جدول٦- مقایسه تفکیکی درصد اسید چرب‌های کل، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع استخراج شده از شیر خشک به دو روش استخراج فولش و سوکسیله

	استخراج فولش	استخراج سوکسیله
SFA	۱/۲۸۸±۰/۰۸۶[a]	۰/۱۲۲±۰/۰۰۵[b]
MUFA	۰/۸۳۵±۰/۰۶۷[a]	۰/۰۷۸±۰/۰۰۲[b]
PUFA	۰/۵۰۱±۰/۰۴۲[a]	۰/۰۴۳±۰/۰۰۳[b]
total FA	۲/۶۲۴±۰/۱۹۵[a]	۰/۲۵۳±۰/۰۰۸[b]

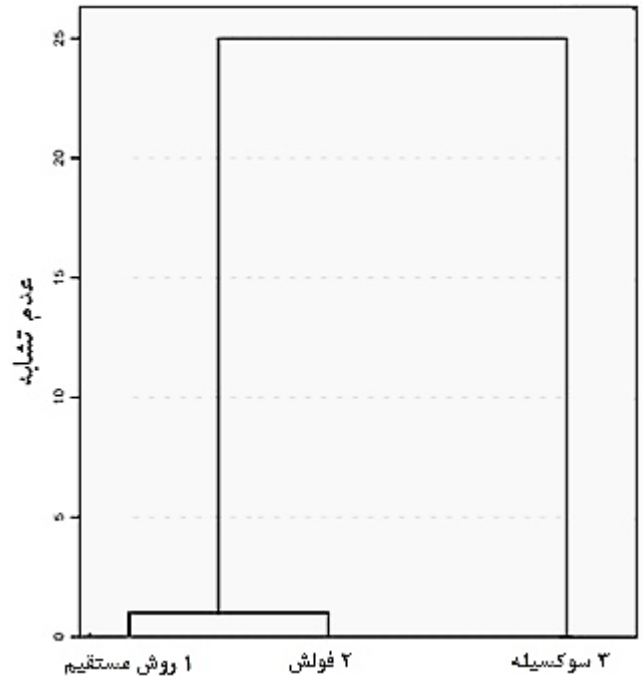
حروف غیرمشابه a و bو c در یک سطر نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ میان میانگین اسیدهای چرب به دست آمده از سه روش استخراج (تیمارها) می باشد

5. Saturated Fatty Acids (SFA)
6. Monounsaturated Fatty Acids (MUFA)
7. Polyunsaturated Fatty acids (PUFA)
8. Total Fatty Acids

به طور کلی، روش‌های استخراج علاوه بر این که بر پروفایل اسیدهای چرب تاثیر می‌گذارند، میزان این تاثیرگذاری با توجه به بافت نمونه‌ها متفاوت می‌باشد و همان گونه که از این مشاهدات قابل استنباط می‌باشد تاثیر روش‌های استخراج بر پروفایل اسیدهای چرب در نمونه شیرخشک مشهودتر می‌باشد. بنابراین بایستی در هنگام انتخاب روش مورد نظر برای استخراج چربی، بافت نمونه هم در نظر گرفته شود.

مقایسه روش‌های استخراج با روش تجزیه کلاستر

اختلاف میان روش‌های استخراج می‌تواند با استفاده از روش‌های آنالیز چند متغیره همچون روش تجزیه کلاستر به روشنی نشان داده شود. نمودار درختی اقلیدسی[9] (نمودار ۵)، اختلاف میان روش‌های استخراج را نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر، با توجه به نمودار درختی اقلیدسی، عمده‌ترین اختلاف میان روش سوکسیله با دیگر روش‌های استخراج (استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم) وجود دارد. نمودار درختی و همچنین فواصل اقلیدسی[10] نشان می‌دهند که دو روش فولش و اندازه‌گیری مستقیم به هم شباهت زیادی دارند. همچنین، با استفاده از این نمودار مشخص شد که پروفایل اسیدهای چرب به دست آمده به روش سوکسیله بسیار متفاوت از روش‌های دیگر استخراج (روش اندازه‌گیری مستقیم و روش هیدرولیز اسیدی) می‌باشد، که ناشی از استخراج ناقص اسیدهای چرب است و انتخاب روش استخراج برای چربی‌های خنثی بسیار مهم‌تر از چربی‌های قطبی می‌باشد (Xiao، ۲۰۱۰).



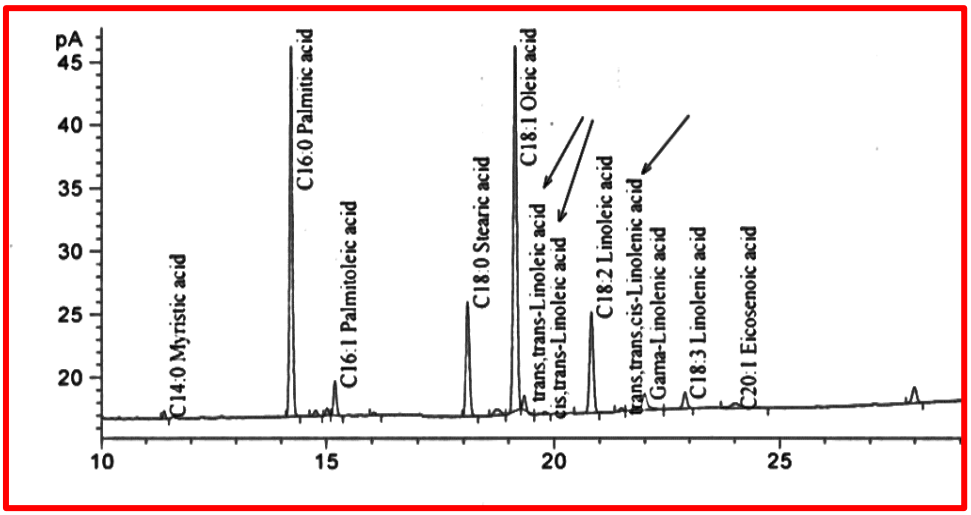
شکل ۱نمودار درختی اقلیدسی نشان دهنده اختلاف میان روش‌های استخراج

[9]. Euclidian dendrogram

[10]. Euclidian distance

تاثیر روش‌های استخراج بر ایزومری شدن اسیدهای چرب

با توجه به مشاهدات به دست آمده از این تحقیق، روش اندازه‌گیری مستقیم و استخراج فولش تاثیری بر ایزومریزاسیون اسیدهای چرب نداشتند، اما در پروفایل اسیدهای چرب به دست آمده از روش استخراج سوکسیله ایزومرهای ترانس مربوط به اسیدهای چرب لینولئیک و لینولنیک قابل مشاهده بود. بر اساس تحقیقات فرانکل (Frankel، ۲۰۱۴) مشخص شد که اسید لینولنیک، به دلیل داشتن سه پیوند دوگانه ناپایدارترین اسید چرب می‌باشد و لینولئیک اسید نیز به دلیل داشتن دو پیوند دوگانه در اثر حرارت دچار تغییر و تخریب می‌شود. همان گونه که در پروفایل اسیدهای چرب تخم مرغ استخراج شده به روش سوکسیله مشاهده می‌گردد (نمودار ۶)، ایزومرهای ترانس-ترانس و سیس-ترانس لینولئیک اسید و همچنین ترانس-ترانس-سیس لینولنیک اسید به وجود آمده‌اند که این ایزومرها در پروفایل‌های به دست آمده از استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم مشاهده نمی‌گردند. تحقیقات بلومنتال و استیر (Blumenthal & Stier، ۱۹۹۱) نشان می دهد که تغییرات شیمیایی به وجود آمده در چربی‌ها در اثر حرارت ناشی از دو دسته از واکنش‌ها می‌باشد: واکنش‌های تجزیه حرارتی و واکنش‌های اکسیداسیون. واکنش‌های تجزیه حرارتی بدون نیاز به حضور اکسیژن پیشروی می‌کنند و در خلال این واکنش‌ها، پلیمری شدن، ایزومری شدن، حلقوی شدن و هیدرولیز اجزای چربی رخ می‌دهد. در خلال واکنش اکسیداسیون، پراکسید هیدروژن و رادیکال آزاد پروکسید اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل می‌شوند و موجب کاهش مقدار مواد مغذی و همچنین بدبو شدن چربی می‌شوند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ایجاد ایزومرهای ترانس در روش استخراج سوکسیله ناشی از به کاربردن حرارت برای استخراج اسیدهای چرب برخلاف دیگر روش‌های استخراج می‌باشد.

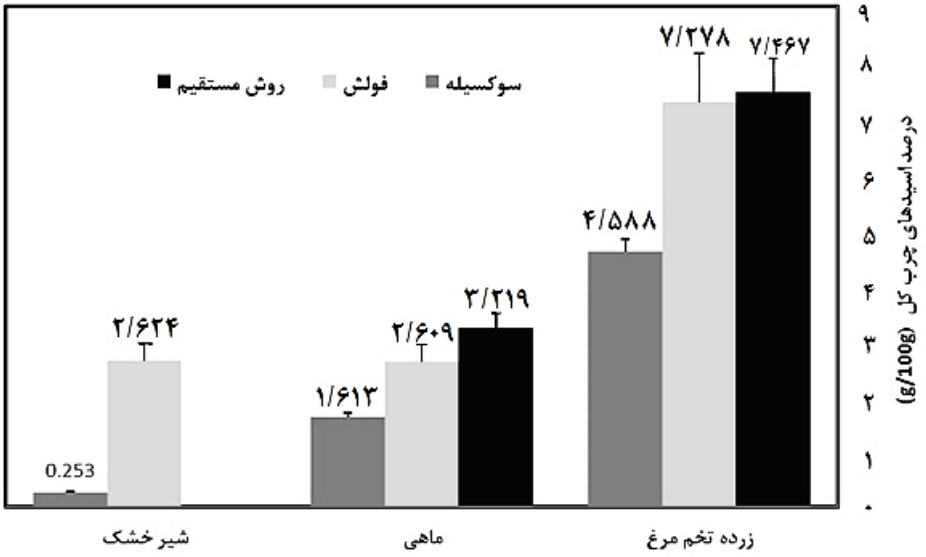


نمودار ۶- پروفایل اسیدهای چرب نمونه تخم مرغ، استخراج به روش سوکسیله

تاثیر روش استخراج بر بازیافت اسیدهای چرب

روش اندازه‌گیری مستقیم که روش تک مرحله‌ای استخراج/استری کردن هم نامیده می‌شود بر اساس ترکیب دو فرآیند استخراج و متیل‌دار کردن در یک مرحله می‌باشد. این روش بسیاری از معایب روش‌های چند مرحله‌ای را مانند مصرف حلال زیاد و کارایی پایین استخراج را برطرف می‌نماید. تحقیقات نشان داده است که پروفایل اسیدهای چرب به دست آمده از بافت ماهی به روش اندازه‌گیری مستقیم مشابه روش متداول فولش است اما بازیافت اسیدهای چرب به روش اندازه‌گیری مستقیم بیشتر است (Meier و همکاران، ۲۰۰۶). در بررسی حاضر، با مقایسه کل اسیدهای چرب استخراج شده توسط سه روش فولش،

سوکسیله و مستقیم مشخص گردید که بازده استخراج سوکسیله کمتر از روش استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم می‌باشد، همچنین این کاهش میزان استخراج سوکسیله در نمونه شیر خشک مشهودتر از نمونه‌های دیگر است (نمودار ۷). در مقابل، اسید چرب کل بیشتری از روش اندازه‌گیری مستقیم در مقایسه با دیگر روش‌های استخراج حاصل شده است، که نشان‌دهنده کارایی پایین استخراج دو روش دیگر به ویژه استخراج سوکسیله است. بازده بیشتر روش مستقیم شاید به این دلیل باشد که هیدرولیز اسیدی موجب آزاد شدن چربی از اتصالات آن با بافت نمونه می‌گردد. با این وجود، به دلیل امتزاج دو فاز آبی و آلی ناشی از وجود امولسیفایرها در بافت شیر خشک، نمونه شیر خشک توسط روش مستقیم قابل اندازه‌گیری نبود. همچنین، مقایسه SFA استخراج شده توسط سه روش فولش، سوکسیله و مستقیم نشان می‌دهد که میزان SFA استخراج شده توسط روش فولش و مستقیم بسیار بیشتر از روش سوکسیله می‌باشد؛ که این نتیجه در نمونه تخم مرغ قابل توجه‌تر می‌باشد. SFA به دست آمده از روش اندازه‌گیری مستقیم کمی بیشتر از روش فولش و تا حد زیادی بیشتر از روش سوکسیله است؛ این اختلاف به دلیل تاثیر ضریب کارایی استخراج و همچنین راحت‌تر جدا شدن چربی از بافت نمونه به دلیل هیدرولیز اسیدی در روش اندازه‌گیری مستقیم می‌باشد. در مجموع می‌توان گفت به جز نمونه شیر خشک که به دلیل امتزاج فاز آبی و آلی، به روش اندازه‌گیری مستقیم غیرقابل اندازه‌گیری نبود، روش اندازه‌گیری مستقیم نسبت به روش‌های دیگر SFA بیشتری را استخراج می‌نماید. روش اندازه‌گیری مستقیم و فولش برای استخراج MUFA مناسب‌تر از روش سوکسیله می‌باشند و تا حدودی روش فولش بهتر از روش اندازه‌گیری مستقیم برای این دسته از اسیدهای چرب پاسخ می‌دهد. همچنین، استخراج PUFA به روش فولش و اندازه‌گیری مستقیم کارایی بالاتری دارد و کارایی این دو روش استخراج با توجه به نوع نمونه اندکی متفاوت است؛ به طوری که برای نمونه تخم مرغ اندازه‌گیری مستقیم و برای نمونه پودر ماهی روش فولش بهتر پاسخ داده است. روش سوکسیله روش نامناسبی برای استخراج PUFA از نمونه‌های پودر ماهی و شیر خشک می‌باشد، هر چند به طور نسبی برای نمونه‌های تخم مرغ پاسخ بهتری داده است. به طور کلی می‌توان گفت که برای استخراج اسیدهای چرب، روش اندازه‌گیری مستقیم و فولش بازده بالاتری دارند.



نمودار ۷- مقایسه اسید چرب کل استخراج شده از سه نمونه زرده تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک

مقایسه تکرارپذیری روش‌های استخراج

تکرارپذیری سه روش استخراج سوکسیله، فولش و اندازه‌گیری مستقیم با پنج بار تکرار هر یک از روش‌های استخراج در سه بافت مختلف (زرده تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک) ارزیابی گردید. نتایج گزارش شده در جدول (۷)، دقت متفاوت روش‌های استخراج را برای بافت های مختلف نشان می‌دهد. همچنین، تکرارپذیری روش های استخراج اسیدهای چرب با در نظر گرفتن سه دسته اسیدهای چرب اشباع (SFA)، غیراشباع با یک پیوند دوگانه (MUFA)، غیر اشباع با چند پیوند دوگانه (PUFA)، بررسی گردید. نتایج نشان می دهد که دقت سه روش استخراجی، با توجه به درجه اشباعیت اسیدهای چرب و همچنین بافت نمونه، متفاوت است. با توجه به جدول (۷)، روش سوکسیله دارای بالاترین دقت در استخراج اسیدهای چرب کل و فولش پایین‌ترین دقت را دارد. درصد ضریب تغییرات برای روش سوکسیله برای هر سه نمونه تخم مرغ، ماهی و شیر در حدود چهار درصد است، این در حالی است که درصد ضریب تغییرات برای روش فولش به دلیل موثر بودن بافت نمونه در استخراج، در نمونه‌های مختلف متفاوت و از ۶/۷۴٪ برای نمونه تخم مرغ تا ۱۶/۶۱٪ برای نمونه شیر خشک می‌باشد. دلیل دقت بالای روش استخراج سوکسیله در مقایسه با دیگر روش‌های استخراج این است که این استخراج به صورت اتوماتیک توسط دستگاه صورت می‌گیرد، این در حالی است که روش فولش به طور غیراتوماتیک و توسط شخص صورت می‌گیرد که خطای آزمایشگر در اینجا بسیار تعیین‌کننده می‌باشد. از معایب روش استخراج فولش تکرارپذیری پایین روش است؛ به طوری که برای انجام این روش استخراج، مهارت تکنسین بسیار اهمیت دارد. همچنین میزان آب در بافت نمونه نیز در کارایی استخراج تاثیر دارد. با این وجود به دلیل کارایی بالای این روش در استخراج چربی‌های قطبی و غیرقطبی این روش کاربرد زیادی دارد (Roose & Smedes، ۱۹۹۶). به طور کلی، با در نظر گرفتن تکرارپذیری روش‌های استخراج برای انواع اسیدهای چرب، این نتیجه حاصل می‌شود که برای استخراج SFA، هر سه روش دقت بالایی دارند؛ اما برای استخراج PUFA، این دقت کاهش می‌یابد. شاید به دلیل ماهیت غیرقطبی حلال در روش‌های استخراج و همچنین مقادیر ناچیز PUFA، روش‌های استخراج توانایی و دقت پایینی برای استخراج این دسته از اسیدهای چرب دارند. در مجموع می‌توان گفت که دقت روش سوکسیله از دیگر روش‌های استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم بیشتر می‌باشد.

جدول ۷- مقایسه تکرارپذیری سه روش استخراج فولش، سوکسیله و مستقیم در بافت های مختلف (تخم مرغ، شیر خشک و ماهی)

	زرده تخم مرغ			ماهی			شیر	
	فولش (R.S.D. %)	مستقیم (R.S.D. %)	سوکسیله (R.S.D. %)	فولش (R.S.D. %)	مستقیم (R.S.D. %)	سوکسیله (R.S.D. %)	فولش (R.S.D. %)	سوکسیله (R.S.D. %)
SFA	۵/۸۵	۷/۲۳	۳/۳۱	۱۱/۸۰	۵/۳۵	۵/۴۴	۱۵/۰۱	۶/۳۴
MUF	۶/۴۸	۱۴/۹۷	۴/۵۸	۱۲/۹۶	۷/۷۴	۱۶/۶۵	۱۷/۹۶	۳/۷۱
PUF	۸/۷۰	۱۶/۱۱	۲۰/۷۲	۱۹/۴۱	۳۲/۴۱	۱۶/۳۰	۱۸/۹۱	۹/۶۲
total FA	۶/۷۴	۸/۵۸	۴/۳۱	۱۲/۶۸	۷/۷۵	۳/۹۷	۱۶/۶۱	۴/۷۱

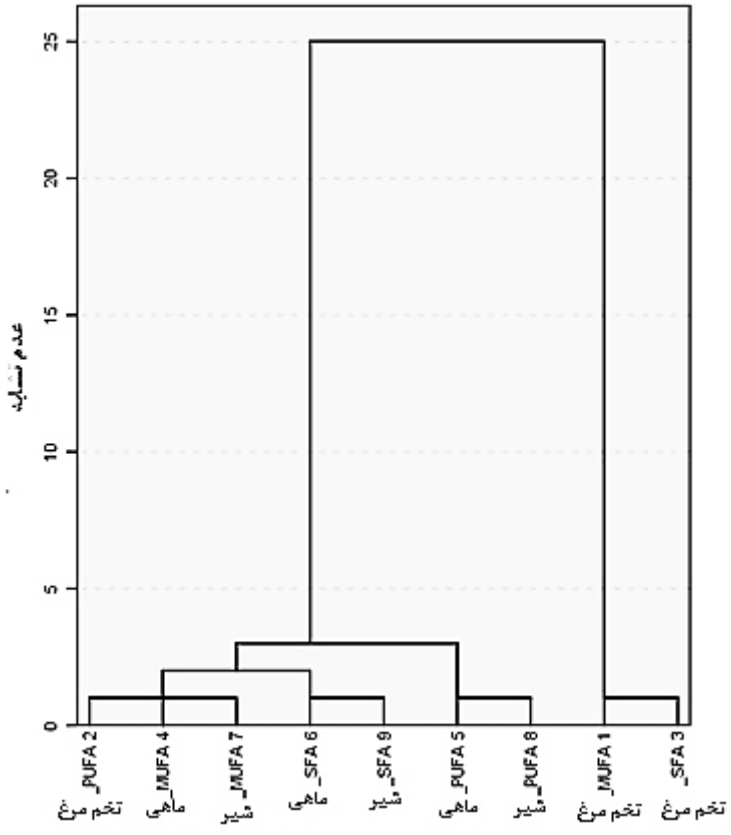
مقایسه ارزش غذایی نمونه ها از نظر پروفایل اسیدهای چرب توسط آزمون دانکن

جدول (۸) نتایج حاصل از مقایسه پروفایل اسیدهای چرب سه نمونه تخم مرغ، شیر خشک و ماهی با استفاده ازآزمون دانکن را نشان می‌دهد. در این آزمون، اسیدهای چرب با توجه به تفاوت‌های معنی‌دار، در شش زیرمجموعه قرار می‌گیرند. به طوری که بر اساس این آزمون، شیر خشک و ماهی بیشترین شباهت را از نظر پروفایل اسیدهای چرب دارند. پروفایل اسیدهای چرب نمونه تخم مرغ بالاخص از نظر SFA و MUFA بسیار

متفاوت از شیر خشک و ماهی می باشد. این مقایسه با روش تجزیه کلاستر نیز صورت گرفت و نتیجه آن در نمودار درختی اقلیدسی (نمودار ۸) نشان داده شده است. با توجه به دیاگرام درختی و فواصل اقلیدسی مشخص می‌شود که SFA وMUFA نمونه تخم‌مرغ دارای بیشترین عدم شباهت با دیگر اسیدهای چرب نمونه‌های پودر ماهی و شیر خشک می‌باشد، به طوری که در یک شاخه جداگانه قرار گرفته‌اند.

جدول ۸- مقایسه پروفایل اسیدهای چرب سه نمونه تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک با آزمون دانکن

اسیدهای چرب- نمونه	N	زیر مجموعه					
		۱	۲	۳	۴	۵	۶
PUFA_ماهی	۵	۰/۲۳۷۸۱۴۰۳۶۰					
PUFA_شیر	۵		۰/۵۰۱۲۹۱۳۱۴۰				
MUFA_شیر	۵			۰/۵۳۵۲۴۷۵۴۶۰			
MUFA_ماهی	۵			۰/۹۰۱۰۷۷۶۵۰۰			
PUFA_تخم مرغ	۵			۰/۹۲۱۷۹۳۷۰۴۰			
SFA_شیر	۵				۱/۲۸۷۹۳۴۰۴۰۰		
SFA_ماهی	۵				۱/۴۷۰۸۸۲۹۴۰۰		
MUFA_تخم مرغ	۵					۲/۹۸۶۰۴۵۸۲۰۰	
SFA_تخم مرغ	۵						۳/۳۳۷۸۴۶۴۲۰۰



نمودار ۸- نمودار درختی اقلیدسی نشان دهنده شباهت میان اسیدهای چرب نمونه‌های تخم مرغ، پودر ماهی و شیر خشک

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر کارایی سه روش فولش، سوکسیله و مستقیم جهت استخراج چربی از بافت نمونه هایی همچون ماهی، زرده تخم مرغ و شیر و تاثیر آنها بر پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع ارزیابی و مقایسه شد. مشخص شد بازده استخراج سوکسیله کمتر از روش استخراج فولش و اندازه‌گیری مستقیم می‌باشد. همچنین، روش‌های استخراج بر پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع تاثیر می‌گذارند؛ که میزان این تاثیرگذاری با توجه به نوع اسید چرب و بافت نمونه متفاوت است. با توجه به مزایایی همچون بازده استخراج بیشتر، حلال مصرفی کمتر، کم هزینه بودن، صرفه جویی در زمان، سادگی و همچنین صحت اندازه گیری، روش مستقیم (متیل دار کردن – استخراج تک مرحله ای) روش کارآمدتری برای استخراج و آماده سازی نمونه‌ها جهت آنالیز اسیدهای چرب می باشد. پیشنهاد می‌گردد برای انتخاب روش موثر جهت استخراج چربی، بافت نمونه هم در نظر گرفته شود. به طوری که در این تحقیق مشخص گردید، برای استخراج چربی شیر خشک، روش فولش مناسب‌تر از روش سوکسیله و مستقیم می‌باشد.

منابع

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology, 37*(8), 911-917.

Blumenthal, M. M., & Stier, R. F. (1991). Optimization of deep-fat frying operations. *Trends in Food Science & Technology, 2*, 144-148.

Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta, 465*(1-2), 1-37.

Caprioli, G., Giusti, F., Ballini, R., Sagratini, G., Vila-Donat, P., Vittori, S., & Fiorini, D. (2016). Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. *Food chemistry, 192*, 965-971.

Cascant, M. M., Breil, C., Garrigues, S., de la Guardia, M., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2017). A green analytical chemistry approach for lipid extraction: computation methods in the selection of green solvents as alternative to hexane. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409*(14), 3527-3539.

Christie, W.W., Gas chromatography and lipids, Scotland, *The Oily Press Ltd*.

de Morais, D., dos Santos, L., Perini, J. d. L., de Aguiar, A., de Souza, N., Matsushita, M., & Visentainer, J. (2008). Comparison of diferents lipids extraction methods and fatty acids composition in goat milk. In *Central theme, technology for all: sharing the knowledge for development. Proceedings of the International Conference of Agricultural Engineering, XXXVII Brazilian Congress of Agricultural Engineering, International Livestock Environment Symposium-ILES VIII, Iguassu Falls City, Brazil, 31st August to 4th September, 2008*): International Commission of Agricultural Engineering (CIGR), Institut fur Landtechnik.

Delfan-Hosseini, S., Nayebzadeh, K., Mirmoghtadaie, L., Kavosi, M., & Hosseini, S. M. (2017). Effect of extraction process on composition, oxidative stability and rheological properties of purslane seed oil. *Food chemistry, 222*, 61-66.

Fiori, M., Scintu, M. F., & Addis, M. (2013). Characterization of the lipid fraction in lamb meat: comparison of different lipid extraction methods. *Food Analytical Methods, 6*(6), 1648-1656.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol Chem, 226*(1), 497-509.

Panavaitė, D., Adomavičiūtė, E., & Vičkačkaitė, V. (2006). Anovel SPME fibre for fatty acid determination. *Chemija*, *17*(4), 61-66.

Roose, P., & Smedes, F. (1996). Evaluation of the results of the QUASIMEME lipid intercomparison: the Bligh & Dyer total lipid extraction method. *Marine pollution bulletin*, *32*(8-9), 674-680.

Rosenfeld, J. (2002). Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta*, *465*(1-2), 93-100.

Sahasrabudhe, M., & Smallbone, B. (1983). Comparative evaluation of solvent extraction methods for the determination of neutral and polar lipids in beef. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *60*(4), 801-805.

Stibilj, V., Rajsp, M. K., & Holcman, A., (1999), Fatty acid composition of eggs enriched with omega-3 fatty acids on the market, *Zootehnika*, 74(2), 27-36.

Xiao, L. (2010). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from marine products. *Masters Dissertion, University of Bergen*.

Frankel, E. N. (2014). *Lipid oxidation*: Elsevier.

Kang, J. X., & Wang, J. (2005). A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC biochemistry*, *6*(1), 5.

Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *circulation*, *106*(21), 2747-2757.

Lewis, T., Nichols, P. D., & McMeekin, T. A. (2000). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, *43*(2), 107-116.

Meier, S., Mjøs, S. A., Joensen, H., & Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, *1104*(1-2), 291-298.

Otero, P., Saha, S. K., Mc Gushin, J., Moane, S., Barron, J., & Murray, P. (2017). Identification of optimum fatty acid extraction methods for two different microalgae Phaeodactylum tricornutum and Haematococcus pluvialis for food and biodiesel applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(19), 4659-4667.