

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

\*\*\*

\*\*\*

\*\*

\*

†



### چکیده:

**زمینه و هدف:** 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 سلول‌های بدن ضروری بوده و ویتامین D در جذب کلسیم و فسفر دخالت دارد و برای رشد استخوان‌ها لازم است. روغن ماهی و کبد کوسه ماهی حاوی اسیدهای چرب ضروری ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید بوده که در کاهش بروز بیماری‌های قلبی - عروقی تأثیر بسزائی دارد. این پژوهش با هدف بررسی روش‌های 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 روش‌های مکانیکی، هضم قلیایی، استخراج با حلال و روش Bligh & Dyer استخراج شد. ویتامین‌های 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 ویتامین‌های 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 نمی‌باشد.

**نتیجه گیری:** با توجه به یافته‌های این تحقیق مشخص گردید، روغن کبد کوسه ماهی دارای مقادیر مناسبی از ویتامین‌های 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:

ضروری ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) که جزء اسیدهای چرب ضروری امگا (ω) محسوب می‌شوند، در روغن کبد و روغن ماهی پی

استفاده از CLO (Cod liver oil) در درمان ناراحتی‌های استخوان و روماتیسم از مدت‌ها قبل مرسوم بود. تقریباً در سال ۱۹۵۰ محققان به وجود اسیدهای چرب

\* استادیار دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران: ساری - بخش ۸ خیابان سلمان فارسی - دانشکده داروسازی،

تلفن: ۰۱۵۱-۳۲۵۹۱۰۲، (مؤلف مسئول).

\*\* فوق لیسانس شیمی - دانشگاه مازندران.

† دکترای داروسازی - دانشکده داروسازی ساری.

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

درمان این عارضه دو روش متفاوت، مصرف روغن کبد ماهی و استفاده از نور آفتاب توصیه می‌گردد است. ویتامین D برای تشکیل استخوان طبیعی لازم است و جذب کلسیم و فسفر را از روده‌ها آسان نموده و قرار گرفتن کلسیم در بافت استخوان در نتیجه عمل این ویتامین می‌باشد. ویتامین D در استحکام، دوام و شکل‌گیری استخوان‌ها و دندان‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کند. نشان داده شده که بین وقوع سرطان کولون با میزان جذب کلسیم رابطه معکوس وجود دارد. به طوری که یون کلسیم در لومن روده با چربی‌ها و اسیدهای صفراوی باند شده و صابون‌های کلسیمی را ایجاد می‌کنند که اپیتلیوم روده را از مواد توکسیک نسبتاً قوی محافظت می‌کند و اینکه احتمالاً کلسیم در تنظیم پروليفراسیون و تمایز سلول‌های روده مؤثر است (۱۰،۶). در بنادر جنوب کشور ما یکی از موارد غیر مصرفی که در نتیجه صید کوسه ماهی حاصل می‌شود کبد کوسه ماهی می‌باشد.

در بعضی از کشورها استخراج روغن کبد ماهی از برخی از انواع کوسه ماهی، بدلیل غنی بودن آن از ویتامین‌های A و D و اسیدهای چرب غیر اشباع از اهمیت بالایی برخوردار است. از طرف دیگر گاهی روغن ماهی به عنوان یک محصول فرعی در هنگام تولید پودر ماهی به دست می‌آید. از ماهی‌هایی که به طور عمده در شمال کشور برای تهیه پودر ماهی استفاده می‌گردد ماهی کیلکا می‌باشد و روغن ماهی کیلکا، ماده جانبی این فرآیند محسوب می‌گردد. در این تحقیق انتخاب هر دو نمونه مذکور، با توجه به اهمیت مصرف روغن ماهی و به منظور استفاده بهینه از منابع طبیعی در دسترس، مد نظر قرار گرفته است.

بردند (۱). اسیدهای چرب مذکور با ایجاد آراشیدونیک اسید قادر به اعمال اثرات ضد التهابی، ضد تجمع پلاکتی و وازودیلاتاسیون عروق خونی می‌باشند (۵). از طرفی اسیدهای چرب  $\omega 3$  سبب کاهش تری‌گلیسریدهای بدن از طریق کاهش نشر VLDL در کبد و افزایش سطح HDL پلاسما می‌گردند (۱۳،۹). روغن ماهی همچنین ممکن است در درمان درماتیت‌های غیر تیپیک، پسوریازیس، روماتوئید آرتریت بسیار مؤثر باشد. اثرات جانبی مصرف زیاد روغن ماهی به صورت چاقی، کاهش تعداد پلاکت، افزایش زمان خونریزی و مسمومیت ناشی از هایپرویتامینوز با ویتامین‌های A و D می‌تواند بروز کند (۱۱). کمبود ویتامین از رایج‌ترین انواع سوء جذب محسوب می‌شود. یک منبع غنی از ویتامین A و D کبد ماهی‌های غضروفی از جمله کوسه ماهی‌ها می‌باشد (۱۲). نقش‌های اساسی ویتامین A در بدن، علاوه بر ساخت رنگدانه‌های بینائی و در نتیجه جلوگیری از شب‌کورگی بوسیله رشد طبیعی بیشتر سلول‌های بدن به ویژه رشد و تکثیر طبیعی انواع مختلف سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد. در فقدان ویتامین A تمایل به شاخی و کراتینیزه شدن سلول‌های اپیتلیال افزایش می‌یابد. تظاهرات کمبود ویتامین A در بدن بصورت پوسته پوسته شدن پوست و گاهی آکنه، نارسائی رشد حیوانات جوان از جمله توقف رشد اسکلتی، ناتوانی در تولید مثل، کراتینیزه شدن و کدورت قرنیه و عفونی شدن ساختمان‌های آسیب دیده اپیتلیال و کوری بروز می‌نماید به همین دلیل ویتامین A، ویتامین ضد عفونت نامیده شده است (۷،۴).

از گذشته کمبود ویتامین D و رابطه آن با بیماری راشیتیس مورد توجه پزشکان بوده و برای

## مواد و روشها:

### مواد و دستگاهها:

اتانول، ایزوپروپیل الکل، پتاس،  
دی اتیل اتر، متانول (۱)، کلروفرم سدیم

سولفادکاهیدرات، متانول (۲) (Merck, Germany)

کبد کوسه ماهی Carcharhinus macloiti

ماهی کیلکا Clupeonolla grimi

استاندارد ویتامین D<sub>3</sub> Roch, Switzerland

سانتریفوژ Hettich, Zentrifugen D-7200

اسپکتروفتومتر Spectronic® Gmesys2 USA

روتاری مجهز به پمپ خلاء Heidolph, Germany

دستگاه HPLC با ستون HPLC Waters 2487 USA  
250\*4.6 mm.Vydac.silica

### روش کار:

تهیه نمونه: ماهی کیلکا، از بازارهای محلی در فصل بهار و کبد کوسه ماهی از بنادر جنوب در فصل پائیز تهیه شد و انتقال آنها به آزمایشگاه بصورت زده صورت گرفت. سپس هر دو نمونه در فریزر منجمد و نگهداری شد. مقدار نمونه مورد نیاز برای هر آزمایش، بعد از رسیدن به دمای محیط بوسیله آسیاب برقی خرد گردید. لازم به ذکر است جهت آماده سازی نمونه، باید کیسه صفر را از کبد جدا می گردید.

### روشهای مورد استفاده:

۱- استفاده از سیستم مکانیکی: ۱۰۰ گرم از نمونه با آسیاب برقی کاملاً خرد شده و به یک بشر ۲۵۰ ml، به

همراه ۵۰ ml آب انتقال یافت و به مدت ۲ ساعت داخل بن ماری در حرارت ۷۰-۶۰°C پخته شد. سپس نمونه به یک کیسه پارچه‌ای انتقال یافت و با فشار مکانیکی و با استفاده از آب میوه‌گیری دستی عصاره گیری شد. عصاره بدست آمده با قیف بوختر حاوی کاغذ صافی با مکش صاف شد. جداسازی فاز مائی از روغن با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه صورت گرفت و حجم روغن در پایان بر حسب میلی لیتر گزارش شد (۸).

۲- روش هضم قلیایی: ۱۰۰ گرم از نمونه مورد نظر همانند روش قبل کاملاً خرد گردید و به یک بشر ۲۵۰ ml، به همراه ۵۰ ml آب انتقال یافت و به مدت ۳۰ دقیقه داخل بن ماری با حرارت ۷۰-۶۰°C قرار گرفت. سپس ۱-۲ درصد وزن ماهی، قلیایی قوی (سود) با غلظت ۱ درصد اضافه گردید. به طوری که pH در محدوده ۸-۹ حفظ گردد. در طی فرآیند عملیات هم زدن بدون وقفه، برای هضم کامل نمونه صورت گرفت. بعد از مدت ۴۰ دقیقه نمونه به یک کپسول پارچه‌ای انتقال یافت و همانند روش قبل عمل گردید (۸).

۳- روش استخراج با حلال ایزوپروپیل الکل: ۱۰۰ گرم نمونه با آسیاب برقی کاملاً خرد شده و به یک بشر ۶۰ ml ایزوپروپیل الکل به یک بشر ۲۵۰ میلی لیتری انتقال یافت. حجم حلال به گونه‌ای استفاده شد که نمونه را به خوبی مرطوب نموده و کمی بالای نمونه قرار گیرد. برای جلوگیری از تبخیر حلال، درب بشر با استفاده از فویل آلومینیومی مسدود گردید. بشر در بن ماری در دمای ۷۰-۶۰°C به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه با تکان‌های مکرر حرارت داده شد. نمونه سپس در کیسه پارچه‌ای با فشار آب میوه‌گیری دستی عصاره گیری شد و بوسیله قیف بوختر حاوی صافی با مکش صاف گردید. عملیات فوق بر روی تفاله ماهی با ۵۰ میلی لیتر ایزوپروپیل الکل تکرار

شد. حاصل صاف شده با مواد جاذب الرطوبه (۳ گرم سولفات سدیم) آب گیری و سپس با کیف شیشه‌ای حاوی کاغذ صافی، صاف گردید. سپس حلال آن با کمک دستگاه روتاری مجهز به پمپ خلاء تحت حرارت  $40^{\circ}\text{C}$  تبخیر گردید و حجم روغن بدست آمده در پایان اندازه گیری شد (۸).

۴- روش Bligh & Dyer ۱۰۰ گرم از نمونه با استفاده از آسیاب برقی کاملاً خرد گردید و با ۱۰ ml کلروفرم و ۲۰۰ ml متانول (۱) به یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری انتقال یافت و برای ۴-۲ دقیقه بخوبی مخلوط گردید، به مخلوط ۱۰۰ ml کلروفرم اضافه و حدود ۳۰ ثانیه مخلوط شد. سپس ۱۰۰ ml آب مقطر به آن افزوده و اختلاط تا ۳۰ ثانیه دیگر صورت گرفت. سپس با کیف بوختر حاوی کاغذ صافی با مکش صاف گردید. حاصل صافی به یک دکانتور ۵۰۰ میلی لیتری انتقال یافت. جدا سازی بعد از جدا شدن کامل دو فاز از یکدیگر صورت گرفت. لایه بالائی حاوی آب و متانول و لایه زیرین حاوی کلروفرم بوده که حجم کلروفرم حداقل ۱۵۰ ml می باشد و حاوی چربی خالص شده است. لایه کلروفرمی به بالن ته گرد ۲۵۰ ml انتقال یافت و با استفاده از روتاری در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  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 کمتر از یک گرم نبوده و نمونه یک گرمی حداقل ۰/۱۵ رتینول داشته باشد. (۰/۵g) روغن کبد کوسه ماهی و ۰/۳g روغن ماهی کیلکا) به دقت وزن شد و به یک بالن ته گرد تیره ۱۰۰ میلی لیتری به همراه ۱۰ ml آب مقطر انتقال یافت و برای مدت ۱۰ دقیقه رفلاکس گردید در مرحله بعد ۳۰ ml الکل  $96^{\circ}$  و ۳ ml محلول پتاس ۹/۱۰ به آن اضافه گردید و مرحله رفلاکس تا ۳۰ دقیقه دیگر ادامه یافت. بعد از سرد

شدن محلول به همراه ۳۰ ml آب مقطر به دکانتور ۲۵۰ ml تیره انتقال یافت و ۴ g پودر نرم سدیم سولفا دکاهیدرات و ۱۵۰ ml دی اتیل اتر به آن اضافه گردید و اختلاط آن به آرامی به مدت ۲ دقیقه انجام شد تا از ایجاد امولسیون جلوگیری شود. بعد از اینکه محلول به دو فاز تقسیم شد فاز مائی از فاز اتری جدا گردید و به دکانتور دیگر انتقال یافت. عمل استخراج از فاز مائی دوبار دیگر و هر بار با ۲۵ ml اتر انجام گرفت و عصاره اتری به دکانتور اول انتقال یافت. در مرحله بعد شستشوی عصاره اتری هر بار با ۵۰ ml آب مقطر انجام گرفت تا جائیکه فاز مائی جدا شده با افزودن معرف فنل فتالین تغییر رنگ نداده و قلیایی نباشد. برای جلوگیری از ایجاد امولسیون، در مرحله اول شستشو اختلاط باید به آرامی صورت گیرد. سپس عصاره اتری به بالن ۲۵۰ میلی لیتری تیره انتقال یافت و با اتر به حجم رسانده شد. در مرحله بعد نمونه با استفاده از حرارت تا حجم ۳ ml تغلیظ گردید. سپس به بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری انتقال یافت و باقیمانده اتر تحت جریان بسیار آرام گاز  $\text{N}_2$  برطرف گردید و در مقدار کافی ایزوپروپیل الکل حل گردید به طوری که غلظت ویتامین A به ۳-۵ میکروگرم در میلی لیتر برسد و با جذب ویتامین A در ۳۲۵ نانومتر در محدوده ۰/۸-۰/۵ قرار گیرد. لازم به ذکر است جذب نمونه روغن کبد کوسه ماهی و نمونه روغن کیلکا حاصل از روش Bligh & Dyer در ۲۵ ml ایزوپروپیل الکل و نمونه کیلکا حاصل از روش حلال در ۲۵ ml ایزوپروپیل الکل نهایی در سر طول موج ۳۱۰ و ۳۲۵ و ۳۳۴ نانومتر خوانده شد. از ایزوپروپیل الکل به عنوان نمونه بلانک استفاده گردید. برای محاسبه میزان ویتامین A از رابطه زیر استفاده می گردد.

L- عرض سل بر حسب  $\frac{A_{325}}{LC} = 0.549$  مقدار ویتامین A  
C- غلظت نمونه بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی لیتر (g/100ml) ایزوپروپیل نهائی

### آماده سازی نمونه:

۱ ml نمونه روغن مورد نظر در یک بالن ژوژه ۱۰۰ ml با اتانول (۲) به حجم رسانده شد و سپس به کمک Vortex خوب تکان داده و ۱۰ ml آن به بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری انتقال یافت و با اتانول (HPLC) به حجم رسانده شد برای اختلاط بهتر نمونه مجدداً از دستگاه Vortex به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید و نمونه با ضریب رقت ۲۵۰ تهیه شد (۳).

با استفاده از سیستم HPLC با مشخصات سرعت جریان فاز متحرک: ۲ میلی لیتر در دقیقه، رد یاب ماوراء بنفش با طول موج ۲۶۵ نانومتر، سرعت کاغذ ثابت: ۰/۵ سانتیمتر در دقیقه، حجم تزریق: ۱۰۰ میکرو لیتر، فاز متحرک: متانول (HPLC) آنالیز انجام گرفت.

### محاسبه میزان ویتامین D<sub>3</sub>

برای محاسبه میزان ویتامین D<sub>3</sub> بر حسب میلی گرم در یک میلی لیتر از نمونه روغن از فرمول زیر استفاده گردید.

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

A<sub>u</sub>: میانگین Area نمونه مورد آزمایش، A<sub>s</sub>t: میانگین Area نمونه استاندارد، V: حجم برداشتی از نمونه، C<sub>s</sub>T: غلظت استاندارد، ۲۵۰: ضریب رقت نمونه.

چنانچه جذب نمونه در ۳۲۵ نانومتر بین  $\frac{A_{325}}{0.97}$  و  $\frac{A_{325}}{1.03}$  نباشد از رابطه زیر در تعیین مقدار ویتامین A استفاده می گردد.

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

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

در ضمن هر یک واحد بین المللی ویتامین A برابر با ۰/۳ میکروگرم ویتامین A می باشد (۱۳).

### تعیین مقدار ویتامین D<sub>3</sub>

برای تعیین مقدار ویتامین D<sub>3</sub> از روش HPLC استفاده گردید.

### آماده سازی استاندارد ویتامین D<sub>3</sub> برای انجام HPLC

۸/۵ میلی گرم از استاندارد ویتامین D<sub>3</sub> با درصد خلوص ۹/۸ درصد (بر اساس مقدار قید شده بر روی برچسب ظرف) با ترازوی آنالیتیک به دقت وزن شد و در یک بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری با اتانول (۲) به حجم رسانده شد. در مرحله بعد ۲ ml از این محلول به ۱۸ ml اتانول (HPLC) افزوده شده و محلول استاندارد با غلظت ۰/۰۳۳۹۲mg/ml حاصل گردید (۳).

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

روش استخراج نمونه	روش مکانیکی	هضم قلبایی	استخراج با حلال	Bilgh & Dyer
کبد کوسه ماهی	۲۰/۵۳±۱/۲۸	۲۲/۰۶±۰/۹*	۱۰/۱±۰/۵۳	۴۵/۳±۳/۰۵
ماهی کپلکا	۳/۲±۰/۲۵*	۴/۴۶±۰/۳۰*	۳/۹±۰/۲	۶/۶۳±۰/۵۱

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) *	۳۱۰	۳۲۵	۳۲۴
روش استخراج			
<b>Bligh &amp; Dyer</b>	۰/۷±۰/۰۱۵	۰/۷۸۴±۰/۰۰۸۵	۰/۶۵±۰/۰۱۲
استخراج با حلال	۰/۵۱۴±۰/۰۰۷۲	۰/۵۷۲±۰/۰۱۲	۰/۴۸۱±۰/۰۱۱
روش مکانیکی	۰/۵۰۸±۰/۰۰۵۳	۰/۵۶۵±۰/۰۰۶۲	۰/۴۷۲±۰/۰۰۹

\* مقادیر مربوطه میانگین ± انحراف معیار می باشند.

به ترتیب در جداول شماره های ۴ و ۵ مشاهده می گردد.

هر میکروگرم ویتامین D معادل با ۴۰ واحد بین المللی می باشد (۱۴).

### بحث:

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

### نتایج:

به منظور کاهش خطاهای تصادفی و به دست آوردن جواب صحیح تر، 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

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

طول موج (nm) *	۳۱۰	۳۲۵	۳۲۴
روش استخراج			
<b>Bligh &amp; Dyer</b>	۰/۶۰۴±۰/۰۰۲	۰/۵۵۳±۰/۰۱۵	۰/۳۹۵±۰/۰۰۲
استخراج با حلال	۰/۵۵۶±۰/۰۰۲	۰/۵۱۸±۰/۰۱۲	۰/۳۷۷±۰/۰۱۶

\* مقادیر مربوطه میانگین ± انحراف معیار می باشد.

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

میزان جذب و مقادیر ویتامین A					روش استخراج
Vit A (I.U)	Vit A (mg)	{A <sub>۳۲۵</sub> }	A <sub>۳۲۵/۱۰۳</sub>	A <sub>۳۲۵</sub>	
۷۱۷۲۹	۲۱/۵۲	۰/۷۶	۰/۷۵۸	۰/۷۸۴	Bligh & Dyer <sup>(۱)</sup>
۵۰۳۲۸/۳۳	۱۵/۱۰	۰/۵۵۰	۰/۵۵۵	۰/۵۷۲	استخراج با حلال <sup>(۱)</sup>
۴۹۵۸۸	۱۴/۸۸	۰/۵۴۲	۰/۵۴۸	۰/۵۶۵	روش مکانیکی <sup>(۱)</sup>
۱۴۴۵۵۵	۴۳/۳۷	۰/۵۴۲	۰/۵۳۷	۰/۵۵۳	Bligh & Dyer <sup>(۲)</sup>
۸۹۷۵۶	۲۶/۹۲	۰/۵۰۴	۰/۵۰۳	۰/۵۱۸	استخراج با حلال <sup>(۲)</sup>

A<sub>۳۲۵</sub> = جذب در طول موج ۳۲۵ نانومتر {A<sub>۳۲۵</sub>} = جذب استاندارد A<sub>۳۲۵/۱۰۳</sub> = نسبت جذب ۳۲۵ به ۱۰۳ (I.U) = واحد بین المللی

تخریب سلول های کبدی در اثر حرارت دادن مقداری از روغن بوسیله 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 امولسیون را می دهد که مقدار آن در ۱۰۰ گرم نمونه کبد کوسه ماهی و ماهی کیلکا به ترتیب ۲۳/۵ml و ۳/۵ml می باشد.

معایب این روش عبارتست از: کند و سخت بودن مرحله صاف کردن: به طوری که عصاره حاصل از مرحله پرس، به صورت سوپ یکنواخت و هموزن 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

**جدول شماره ۵:** میانگین نتایج بدست آمده از تعیین مقدار ویتامین D<sub>3</sub> در ۱ ml روغن کبد کوسه ماهی<sup>(۱)</sup> و روغن کیلکا<sup>(۲)</sup>

Vit D <sub>3</sub> (USP)	Vit D <sub>3</sub> (mg)	*A <sub>u</sub>	A <sub>s</sub> t	روش استخراج
۱۱۰	۰/۰۲۷۴۶۳	۱۳۶۷۸/۲۵ ± ۱۱۲۰/۴۰	۴۲۲۰۴۲۴	Bligh & Dyer <sup>(۱)</sup>
۵۳/۵	۰/۰۱۳۳۶۲	۶۲۷۵/۵ ± ۵۶۷/۲	۳۹۸۴۰۰۱/۵	استخراج با حلال <sup>(۱)</sup>
۵۲	۰/۰۱۲۹۳	۶۲۶۲/۵ ± ۱۰/۵	۴۰۹۸۲۴۴/۵	روش مکانیکی <sup>(۱)</sup>
۶۲	۰/۰۱۵۵۱۷	۷۹۶۰ ± ۴۰۴	۴۳۵۱۶۸۰	Bligh & Dyer <sup>(۲)</sup>

\* مقادیر A<sub>u</sub> به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشند.

USP = فارماکوپه آمریکا

A<sub>s</sub>t = جذب استاندارد A<sub>u</sub> = جذب نمونه

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 روش‌ها 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 روش‌های مختلف استخراج:

محدوده 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. محدوده 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 روش‌ها بالاتر بوده که این مسئله به فاکتور حلالیت ویتامین A در هر یک از روش‌های نامبرده بستگی دارد چرا که ویتامین A در حلال‌های 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<sub>3</sub> 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 روش‌های 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 ویژگی‌های 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 قایق‌ها استفاده شده و در واقع کاربرد صنعتی دارد. در صورت استفاده از این روغن برای مصرف خوراکی و دارویی پروسه پالایش آن باید به سرعت انجام شده و یا بعد از تهیه شدن تا مرحله پروسه پالایش به آن آنتی‌اکسیدان اضافه شود.

در روش هضم قلیایی، افزودن قلیا باعث تشکیل



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 می باشد.

طبق مطالب ذکر شده، از بین روش های استخراج انجام شده در این تحقیق، بهترین روش، روش Bligh & Dyer می باشد. در ضمن این روش آسان بوده، وقت گیر 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 می باشد. از لحاظ ظاهری رنگ روغن زرد شفاف بوده و مشابه با رنگ روغن ماهی در فرآورده های موجود در بازار می باشد 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 هزینه 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 هزینه مصرفی و غیره دارد که با مشخص کردن این عوامل می توان 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 می شود.

صابون و تشکیل امولسیون می شود. بالا بودن دما در این پروسه باعث کاهش مقدار ویتامین D که به حرارت بالا حساس می باشد را بدنال خواهد داشت. از طرفی تشکیل امولسیون نیز سبب مشکلاتی در مرحله صاف کردن روغن می شود. در نتیجه بنظر می رسد 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 می شود. 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 می شود. هر چند این روش می تواند برای بازیابی روغن از کبد ماهی مورد استفاده قرار می گیرد اما وجود پراکسید و ناخالصی در حلال های باعث تسریع در اکسیداسیون روغن و کاهش کیفیت آن می شود 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 می توان این روش را مورد استفاده قرار داد.

روش Bligh & Dyer در واقع روش تغییر یافته ای از روش استخراج با حلال می باشد که در این روش از سه حلال، متانول، کلروفرم و آب با نسبت های 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

### 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. Changes in 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  $\omega$ -3 fatty acid enriched mocrphages to oxidize low density lipoprotein mechanisms and effects of antioxidant vitamin. Atherosclerosis, 124(2): 157-69, 1996.