

ФОСФОЛИПИДЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА C1

Ю.Н. Лясковская. Е.Т. Шмидт

В оценке качества мяса немаловажную роль играет вопрос о том, какие фосфолипиды и в каких количествах присутствуют в мышечной ткани.

Широкое внедрение физико-химических методов анализа в практику биохимических исследований, в том числе колоночной и тонкослойной хроматографии, позволило глубоко изучать липиды животного происхождения.

Появление новых методов фракционирования липидов вызвало необходимость разработки более совершенных методов идентификации полученных фракций и количественного определения соединений, содержащихся в них.

Поскольку липиды не имеют характерных спектров в видимой и ультрафиолетовой областях, применение инфракрасной спектроскопии (ИКС) имеет большое значение.

Имеется много литературных данных по использованию ИКС в химии и биохимии липидов и, в частности, фосфолипидов. Шварц и другие /2,3/ изучили липидные фракции мозга и кожи кроликов, облученных рентгеновыми лучами. Фримен /4-7/ исследовал фосфолипидные фракции сыворотки крови и молока. При этом, сочетая колоночную хроматографию и ИКС, он провел не только качественный, но и количественный анализ полученных фракций. Баер /1/ применил ИКС для анализа синтетических фосфолипидов. Роузер и другие /8/ сравнили ИК-спектры синтетических и природных фосфолипидов. Абрамсон и другие /9, 10/ изучили с помощью ИКС ионизированные группы в мо-

лекулах фосфолипидов. Обширный обзор Чапмена /9/ дает представление о различных сторонах применения ИКС для изучения липидов. Дворкин и другие /10/ использовали ИКС для качественной характеристики фракций фосфолипидов мозга крыс.

Указанные исследования установили ряд характерных полос поглощения, соответствующих определенным функциональным группам в молекулах фосфолипидов, что позволило использовать инфракрасную спектрометрию при идентификации отдельных фосфолипидов, установлении степени чистоты фосфолипидных фракций, а также для проведения количественного анализа.

Качмек и Дьюген /11/ проанализировали фосфолипидный состав мышечной ткани свиней. Сочетание колоночной хроматографии и ИКС дало хорошие результаты и совпадение с химическими методами определения фосфолипидов. Однако эта методика рассчитана на большое количество исходного материала, а также трудоемка и длительна.

Нами сделаны попытки отработать сравнительно быстрый метод определения лецитинов, кефалинов и сфингомиелинов на небольшом количестве исходного материала и применить этот метод для исследования фосфолипидного состава мышечной ткани крупного рогатого скота.

Липиды из мышечной ткани выделяли модифицированным методом Блига и Дайера /12/.

Для фракционирования фосфолипидов использовали стеклянную колонку диаметром 1,3 и высотой 15 см. В качестве адсорбента применяли смесь из силикателя КСК (150-200 меш.) и целита 545 в отношении 2:1.

Навеску липидов (50 мг) брали из расчета 10-15 мг фосфатидов на 1 г адсорбента, учитывая, что наилучшей концентрацией при записи спектров является 5-6 мг при конечном объеме 1,5 мл.

Липиды фракционировали по схеме Нельсона и Фримена /7/, несколько измененной нами.

Фосфолипидные фракции, после удаления растворителя при 50°C в токе аргона, высушивали в вакуум-эксикаторе над фосфорным ангидридом. Затем фракции фосфолипидов растворяли в 1,5 мл четыреххлористого углерода или хлороформа и производили запись их ИК-спектров.

Все измерения проводили на инфракрасном спектрометре ИК-20 (фирмы К.Цейс) с призмой NaCl, (в области 900-1800 см⁻¹) в кювете с толщиной слоя 1,00 мм, объемом 1 мл.

Запись спектров проводили при следующем режиме работы прибора:

целевая программа	- 4
время записи	- 16 сек/0...100%
скорость регистрации	- 25 см/мин
постоянная времени	- 2
масштаб регистрации	- 10 мм/100 см ⁻¹
усиление	- 7,8

Тонкослойная хроматография проводилась на силикагеле Г в системе хлороформ-метанол-вода (65:25:4) /13/.

Идентификация фосфолипидных фракций. Все фосфолипиды имеют интенсивные полосы поглощения в областях 8,5-9,8 и 7,4-8,0 мк, соответствующие связям Р-О-С и Р=О. В отличие от сфингомиелинов, лецитины и кефалины имеют интенсивную полосу

поглощения в области 5,7-5,8 мк, обусловленную наличием групп $C=O$; в этой области кефалины и лецитины неразличимы. Спектры поглощения лецитинов отличаются характеристической полосой при 10,3 мк, а спектры кефалинов — при 9,8 мк. В структуре сфингомиелинов содержатся амидные группы ($-CO-NH-$), которые дают полосы поглощения в областях 6,1 и 6,3-6,6 мк.

На рисунке приведены ИК-спектры фосфолипидных фракций, выделенных из липидов мышечной ткани крупного рогатого скота. Лецитиновая фракция включает сфингомиелины, о чем свидетельствует появление полосы поглощения при 6,3 мк в спектре этой фракции, записанном в хлороформе. Отсутствие в кефалиновой фракции такой полосы при 10,3 мк говорит о том, что в эту фракцию не попали лецитины и сфингомиелины. Присутствие в лецитиновой фракции кефалинов обнаружить по ИК-спектрам трудно, так как характерная для кефалинов полоса при 9,8 мк появляется лишь при большом процентном содержании кефалинов во фракции. Отсутствие кефалинов в лецитиновой фракции подтверждено методом тонкослойной хроматографии.

Количественное определение индивидуальных фосфолипидов.

Качмек и Дьюген /II/ и Фримен /4/ обращают внимание на то, что стандартные кривые зависимости оптической плотности от концентрации зависят от того, из какого биологического объекта выделены фосфолипиды. Учитывая это, для построения калибровочных графиков использовали лецитиновую и кефалиновую фракции, выделенные из липидов мышечной ткани крупного рогатого скота. Проверка показала, что при концентрациях 2-5 мг/мл выполняется закон Бера-Ламберта-Бугера; график линеен.

В табл. I дано сравнение коэффициентов абсорбции α индивидуальных фосфолипидов, полученных нами, с данными Нельса и Фримена /7/ для фосфолипидов крови.

Т а б л и ц а I

Фосфолипиды	Длины волн, мк	Данные коэффициентов абсорбции α х)	
		литературные	наши
Лецитины	10,3	0,049	0,050
Сфинголипиды	5,8	0,089	0,084
Кефалины	5,8	0,085	0,093

$$\alpha = \frac{\text{абсорбция}}{\text{мг/мл}}$$

Такое близкое совпадение позволило нам воспользоваться другими данными указанной работы, в частности коэффициентом абсорбции для сфингомиелина, выделить который для построения графика трудно, ввиду его небольшого содержания в фосфолипидах.

$$\alpha_{\text{сфинг.}}^{6,1} = 0,052$$

Определение фосфолипидов мышечной ткани крупного рогатого скота. Для исследования фосфолипидного состава мышечной ткани крупного рогатого скота брали *M. longissimus dorsi* на участке 8-12 грудного позвонка через 48 час. после убоя животного.

Быки и кастраты (по 4) в возрасте 18 мес. предварительно содержались в одинаковых условиях и откорме.

В табл. 2 дано содержание фосфолипидов в липидах мышечной ткани.

Из этих данных следует, что общее содержание липидов варьирует как в одной, так и в другой группе животных, оставаясь в целом выше в мышечной ткани кастратов. В то же время содержание кефалинов, лецитинов и сфингомиелинов, а следовательно и сумма фосфолипидов выше в липидах мышечной ткани быков.

Т а б л и ц а 2

Образ- цы	Липиды мышечной ткани, %	Фосфолипиды, %			
		лецитины	кефалины	сфингомиелины	фосфолипиды (сумма)
<u>Кастраты</u>					
I	2,90	II,20	6,50	I,29	19,00
2	2,40	7,85	5,85	0,20	13,90
3	3,16	8,17	5,70	0,69	14,56
4	2,54	8,70	6,40	0,22	15,32
Среднее	2,75	8,98	6,11	0,60	15,69
<u>Быки</u>					
5	I,83	15,90	II,60	2,32	29,82
6	I,07	25,00	20,40	2,20	47,60
7	I,18	22,50	14,70	2,50	39,60
8	I,97	16,00	9,35	I,82	27,17
Среднее	I,5I	19,90	14,0I	2,19	36,06

В табл. 3 представлены данные по содержанию фосфолипидов в расчете на мышечную ткань, а в табл. 4 - статистическая обработка этих данных.

Т а б л и ц а 3

Образцы	Фосфолипиды, %			
	лецитины	кефалины	сфингомиелины	фосфолипид: (сумма)
<u>Кастраты</u>				
1	0,284	0,165	0,033	0,482
2	0,248	0,185	0,008	0,441
3	0,237	0,166	0,020	0,423
4	0,210	0,154	0,056	0,420
Среднее	0,243	0,168	0,028	0,441
<u>Быки</u>				
5	0,292	0,212	0,049	0,553
6	0,268	0,216	0,024	0,508
7	0,267	0,174	0,029	0,470
8	0,315	0,185	0,036	0,536
Среднее	0,285	0,197	0,034	0,516

Т а б л и ц а 4

Статистические характеристики (х)	Лецитины		Кефалины		Сфингомиелины		Сумма фосфолипидов	
	Быки	Кастраты	Быки	Кастраты	Быки	Кастраты	Быки	Кастраты
$\bar{x}$	0,285	0,243	0,197	0,168	0,034	0,028	0,516	0,441
s	0,023	0,031	0,020	0,014	0,011	0,020	0,035	0,028
$s_{\bar{x}}$	0,012	0,016	0,010	0,007	0,006	0,010	0,018	0,014
v	8,1	14,0	11,0	8,1	15,1	11,5	6,8	6,3

- х) $\bar{x}$ - среднее значение
 s - стандартное отклонение
 $s_{\bar{x}}$ - средняя ошибка среднего значения
 v - коэффициент вариации.

Статистическая обработка результатов показала, что различия в содержании лецитинов, кефалинов и суммы фосфолипидов в мышечной ткани быков и кастратов достоверны ($P < 0,05$).

ВЫВОДЫ

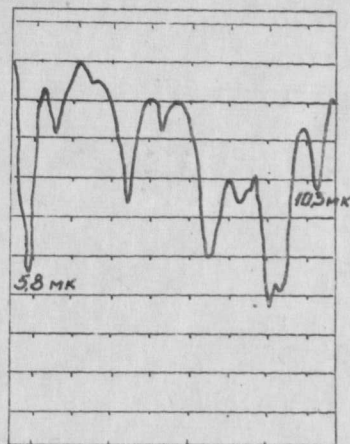
1. Предложен метод быстрого определения лецитинов, кефалинов и сфингомиелинов в мышечной ткани убойных животных, включающий экстракцию липидов из ткани, фракционирование на колонке и инфракрасную спектрометрию.

2. Определены коэффициенты абсорбции для количественного анализа лецитинов и кефалинов мышечной ткани крупного рогатого скота методом инфракрасной спектрометрии.

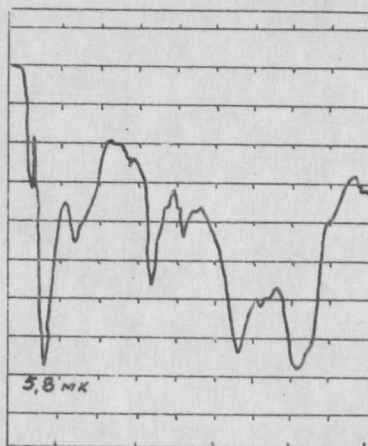
3. Определено содержание лецитинов, кефалинов и сфингомиелинов в мышечной ткани крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

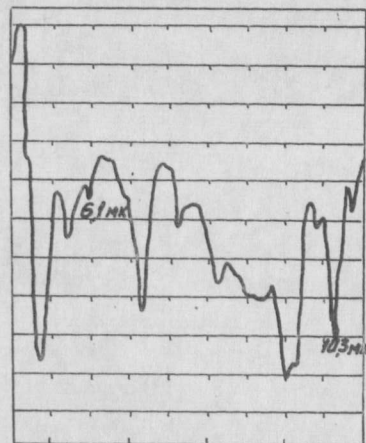
1. Baer E.J. J.Amer. Oil Chem.Soc., 42, 1960, 105.
2. Schwarz H.P., Dreisbach L., Childs R., Mastangelo S.V. Ann. N.Y.Acad. Sci., 69, 1957, 116.
3. Schwarz H.P., Dreisbach L., Childs R., Mastangelo S.V. Arch.Biochem.and Biophys., 87, 1960, 171.
4. Freeman N.K. Ann.N.Y.Acad.Sci., 69, 1957, 131.
5. Freeman N.K., Lindgren F.T., Yock C.N., Nichol A.V. J.Biol.Chem., 227, 1957, 449.
6. Smith L.M., Freeman N.K. J.Dairy Sci., 42, 1959, 1450.
7. Nelson H., Freeman N.K. J.Biol.Chem. 234, 1959, 1375.
8. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D.J. Amer.Oil Chem.Soc., 40, 1963, 425.
9. Шарман D.J. J.Amer.Oil Chem.Soc., 42, 1965, 353.
10. Дворкин В.Я., Молчанова Р.Т., Четвериков Д.А. "Биохимия", 32, 1967, 683.
11. Кущмак M. and Dugan L.R. J.Amer. Oil Chem.Soc., 40, 12, 1963, 683.
12. Кельман Л.Ф., Ляковская Ю.Н., "Мясн.индустрия СССР", I, 1965, 52.
13. Wagner H., Norhammer L., Wolff P. Biochem. Z., 334, 1961, 175.



A



B



B

Рис. ИК-спектры фосфолипидных фракций:

а-спектор	записан	при	концентрации	3,12 мг/мл	в	четырёххлористом	углероде
б	"	"	"	3,67 мг/мл	"	"	"
в	"	"	"	3,81 мг/мл	в	хлороформе	