

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ХИМИЯ

ДИАНА АТАНАСОВА ДОБРЕВА

**МАСТНОРАЗТВОРИМИ ВИТАМИНИ
В ЧЕРНОМОРСКИ И СЛАДКОВОДНИ РИБИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА
И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”**

**по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества”**

Научни ръководители:

проф. Мона Станчева, дхн
доц. Бистра Галунска, дф

Рецензенти:

акад. Евгени Головински, дбн
проф. Фани Рибарова, дб

ВАРНА, 2015

Дисертационният труд се състои от 179 страници, включващи 46 фигури, 46 таблици. Цитирани са 210 литературни източника, 197 от които на латиница и 13 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Химия при Медицински университет–Варна и насочен за защита пред научно жури.

Дисертантът е главен асистент в Катедрата по Химия, при Медицински университет – Варна.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в научната лаборатория на Катедрата по Химия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на г. от ч. в.....аудитория на Медицински Университет “Проф. Д-р Параскев Стоянов” - Варна.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

FL -	флуоресцентен детектор
FNB –	Food Nutrition Board
HPLC –	високо-ефективна течна хроматография
ИОМ -	Institute Of Medicine
RE -	ретинол еквивалент
SD –	стандартно отклонение
WHO/СЗО –	World Health Organization/Световна Здравна Организация
α -TE -	α -токоферол Еквиваленти
ВНТ -	Butylated hydroxytoluene
КФ -	конвекторна фурна
МВФ -	микровълнова фурна
ПДП/RDI -	препоръчителен дневен прием/relative daily intake
ПНМК –	полиненаситени мастни киселини
ТТЕ -	течно-течна екстракция
ТФЕ -	твърдофазната екстракция

ВЪВЕДЕНИЕ

Витамините обхващат група от разнообразни по химичен състав и структура органични съединения, необходими за растежа и развитието на организма и поддържане на неговото здраве. Те не могат да бъдат синтезирани в човешкия организъм, което определя необходимостта от вноса им с храната. Изключение прави само витамин D, който се синтезира в организма, но в количества, които са недостатъчни за задоволяване на физиологичните потребности.

Витамините се разделят на две главни групи според разтворимостта си - водоразтворими и мастноразтворими. Към мастноразтворимите витамини се отнасят четири групи витамини - А, D, Е и К, които съдържат в структурите си полиизопренови вериги. Мастноразтворимите витамини имат главно структурна и регулаторна функция. Витамин А играе важна роля в процесите фоторецепция и репродукция. Витамин D регулира калциевата хомеостаза – повишава резорбцията и отлагането на калций в костите, стимулира растежа, предпазва от костни фрактури. Витамин Е се вгражда в липидния бислой на мембранните структури и предпазва ПНМК от окисление и автоокисление, повлиява генната експресия, подобрява съдовата дилатация.

В последните години се доказва редица специфични функции на мастноразтворимите витамини, отвъд добре известните. Така, витамин D е важен регулатор на имунитета, има антиканцерогенно действие. Витамин К регулира костното изграждане и резорбцията, има антиатерогенен ефект.

Световната здравна организация проучва рисковете от развитие на дефицит на тези витамини. Тя препоръчва ежедневен прием на витамини А, D₃ и Е в достатъчни количества. Това количество се дефинира като „препоръчителен дневен прием“ от съответния витамин. Министерството на здравеопазването в България е изготвило и публикувало своите препоръки в „Наредба № 23 от 19 юли 2005г. за физиологичните норми за хранене на населението“.

Храните от растителен и животински произход са основен източник на мастноразтворими витамини. Рибните тъкани се считат за особено богати на тези нутриенти. Количествата на мастноразтворимите витамини в тях значително варират в зависимост от водния басейн, вида, различните представители от даден рибен вид, както и сезона на улов. Оценено е, че ядливите рибни части доставят значими количества от препоръчителния дневен прием на мастноразтворими витамини за човека. Изключение прави витамин К, който се открива в много ниски концентрации, само в някои рибни видове.

В България проучванията върху съдържанието на мастноразтворими витамини в черноморски риби са много малко. Не се откриват систематични изследвания за рибни видове от българската акватория на Черно море и сладководните водоеми във вътрешността на страната. Липсват данни за промените, настъпващи с тези витамини в рибната тъкан, при съхранението и термичната обработка на рибите. Това определя и целта на настоящата работа.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ЦЕЛ: Да се проучи съдържанието на *all-trans*-ретинол, холекалциферол и α -токоферол в традиционно консумирани в България черноморски и сладководни видове риба и да се извърши оценка на съдържанието на тези витамини по отношение на препоръчителния им дневен прием.

За постигането на тази цел ще бъдат разработени следните задачи:

1. Оптимизиране и валидиране на течно-хроматографски метод за определяне съдържанието на *all-trans*-ретинол, холекалциферол и α -токоферол в ядивна рибна тъкан.
2. Определяне съдържанието на витамини А, D₃ и Е в ядивната тъкан на традиционно консумирани рибни видове чрез оптимизирания течно-хроматографски метод;
3. Оценка на ефекта на съхранение на рибна тъкан при ниски температури и термична обработка, върху съдържанието на изследваните мастноразтворими витамини;
4. Оценка на качеството на рибите като естествен източник на витамин А, витамин D₃ и витамин Е.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Направен е обстоен обзор на строежа и структурата на мастноразтворимите витамини и значението им за човешкия организъм. Прегледът на научната литература показва, че рибата като храна е добър източник на мастноразтворимите витамини А, D₃ и Е. Съдържанието на тези нутриенти се променя в широки граници и зависи от рибния вид, възрастта и половото развитие, водния басейн и от сезона на улов. Различните авторски колективи представят данни за количества на тези витамини в сурова ядивна тъкан на различни рибни видове от морски/океански и сладководни басейни. Поради факта, че ядивната тъкан на рибата обичайно се подлага на обработка преди консумация, някои изследвания са насочени и върху промените на витамините в етапа на приготвяне и съхранение на храната.

Предмет на някои изследвания е влиянието на температурния фактор, технологията на обработка и/или съхранението върху количествените промени, настъпващи с мастноразтворимите витамин А, D₃ и Е в рибите. От представените резултатите се заключава, че всички методи на термична обработка на ядивна рибна тъкан повлияват значително количествата на витамини А и Е, и в много по-малка степен това на витамин D₃.

Малко са изследванията, проследяващи влиянието на продължителността на съхранение и температурата на замразяване на рибната тъкан. Данните в проучената литература са насочени предимно към промените, настъпващи с количеството на витамин Е. Установено е, че по-дългото съхранение, по-високите температури и филетирането на рибите влияят негативно, като причиняват значителни загуби на витамина.

В литературата липсва систематизирана информация относно съдържанието на мастноразтворими витамини в традиционно консумирани в България рибни видове. Поради това, изследванията в дисертационния труд имат за цел да бъде извършено задълбочено проучване за определяне количествата на витамини А, D₃ и Е в ядивна рибна тъкан.

II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. ИЗСЛЕДВАНИ РИБНИ ВИДОВЕ

Обекти на настоящото изследване бяха десет черноморски и пет сладководни рибни вида от природни популации. Шест от черноморските (кая, трициона, сафрид, карагъоз, чернокоп и калкан) и три от сладководните (шаран, толстолоб и амур) риби са изследвани в два сезона - пролет и есен. Останалите четири черноморски вида (кефал, барбуна, зарган и паламуд) и два сладководни (сом и балканска пъстърва) - през един сезон.

Предпоставки при избора на рибни видове – обекти на настоящото изследване, бяха:

- Традиционно консумирани в България черноморски и сладководни риби;
- Рибни видове с най-голямо икономическо значение за морския и стопански риболов в България, според данните представени в „Национален стратегически план за рибарството и аквакултурите, 2007 – 2013“ на Министерство на земеделието и горите [НСПРА, 2006].

2. ПРОБОНАБИРАНЕ

Рибните проби бяха закупени от търговската мрежа на град Варна и от рибари. Пробонабирането е извършено според изискванията на БДС 3419:1978 “Риба и рибни продукти. Правила за вземане на проби.” [БДС 3419:1978] и Наредба 22/2003 на МЗ за "Условията и реда на вземане на проби от храни" [Наредба 22/2003].

3. АНАЛИТИЧНА ПРОЦЕДУРА

Аналитичната процедура за анализ на мастноразтворими витамини включва следните етапи:

- Приготвяне на средна проба
- Извличане на мастноразтворимите витамини
- Качествен и количествен течно-хроматографски анализ
- Валидиране на метода и контрол на качеството
- Статистическа обработка на получените резултати

3.1. Приготвяне на средна проба

Подготвянето на средната проба от ядивна рибна тъкан е извършено по препоръките на БДС 3419:1978 “Риба и рибни продукти. Правила за вземане на проби.” [БДС 3419:1978]. То

включва: отстраняване на глава, опашка, люспи (ако имат) и вътрешности на рибните екземпляри, и последващо филетиране на рибната тъкан [БДС, 1978].

3.2. Извличане на мастноразтворимите витамини

Избор на метод за анализ на мастноразтворими витамини

В настоящото изследване беше избран метода на Lopez-Cervantes и сътрудници [Lopez-Cervantes J. et al., 2006], тъй като се характеризира с бързина и минимални количества използвани реактиви (табл. 1). Той включва едновременно извличане, качествен и количествен хроматографски анализ на all-trans-ретинол, α -токоферол и холестерол. Качественият и количествен хроматографски анализ на all-trans-ретинол, α -токоферол и холестерол по метода на Lopez-Cervantes J. et al. (2006) се извършва на течен хроматограф с детектор с диодна матрица (табл. 2). Избраният метод беше двукратно променен:

- с цел едновременен анализ на витамини А и Е в ядивна рибна тъкан;
- с цел едновременен анализ на витамини А, D₃ и Е в ядивна рибна тъкан.

Съвместно качествено и количествено определяне на витамини А и Е

Параметрите на етапа на пробоподготовка на оригиналния и модифицирания методи.

Таблица 1 Оптимизирани параметри в етапа на пробоподготовка

Параметър	Метод	
	Lopez-Cervantes	Метод витамини А и Е
Аналит	all-trans-ретинол α -токоферол холестерол	all-trans-ретинол α -токоферол
Количество проба	0,400 ± 0,005 g	0,500 ± 0,005 g
Вид антиоксидант	1% Пирокатехол	1% Бутилхидрокси толуен
Хидролиза	5 ml 0.5 М КОН 80 °C, 15 min	5 ml 0.5 М КОН 80 °C, 30 min
ТТЕ	1:5 = H ₂ O:C ₆ H ₁₄ (v/v)	2:4 = H ₂ O:C ₆ H ₁₄ (v/v)

Оптимизирането на процедурата беше извършено с цел максимално извличане на витамини А и Е от пробата. За осъществяването ѝ бяха използвани аналитични стандарти на веществата - all-trans-ретинол и α -токоферол. Претегляни бяха проби рибен хомогенат по 0,500±0,005 g и към тях беше добавен антиоксидант – 1% метанолов разтвор на ВНТ

(Butylated hydroxytoluene). Удължено бе времето на алкалната хидролиза (30 min) с 0,5 М метанолов разтвор на калиева основа, с цел по-пълно освобождаване на all-trans-ретинола и α -токоферола от техните естери в пробата. ТТЕ на хидролизираната проба е извършена с екстрахираща смес вода:н-хексан = 1 : 2, в полза на липофилния компонент.

Съвместно качествено и количествено определяне на витамини А, D и Е

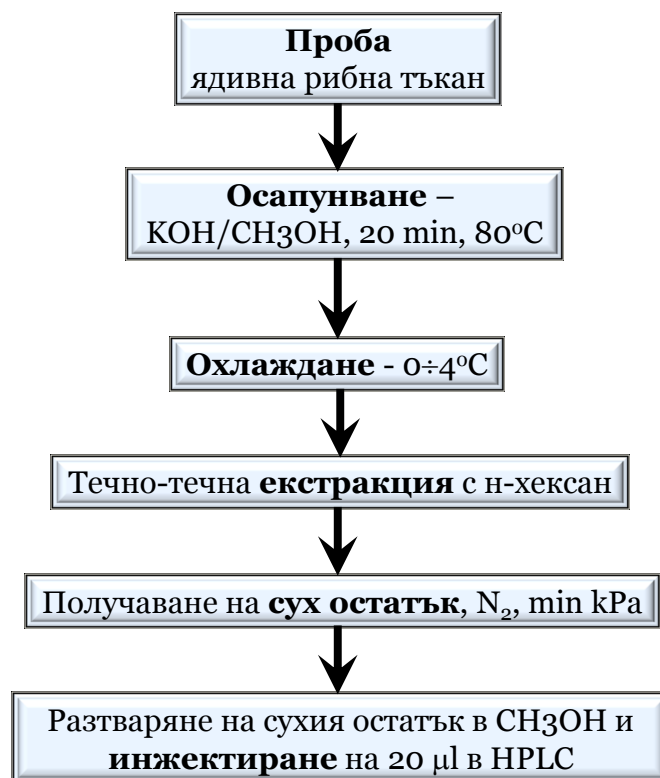
Описаната процедура за едновременното анализиране на витамин А и Е беше модифицирана с цел съвместно качествено и количествено определяне на витамини А, Е, D₂ и D₃. Използвани бяха аналитични стандарти на определяните вещества - съответно all-trans-ретинол, α -токоферол, ергокалциферол и холекалциферол.

При модифицирането на метода в епата на пробоподготовка бяха извършени някои съществени промени като увеличаване количеството на пробата за анализ, смяна на антиоксиданта, повишаване концентрацията на хидролизиращия реактив и промяна на времето на провеждане на хидролизата (табл. 2).

Таблица 2 Параметри на използваните метода в етапа на пробоподготовка

Параметър	Метод	Метод
	витамини А и Е	витамини А, D и Е
Аналит	all-trans-ретинол α -токоферол	all-trans-ретинол α -токоферол ергокалциферол холекалциферол
Претеглена проба	0,500 \pm 0,005 g	1,000 \pm 0,005 g
Антиоксидант	1% Бутилхидрокси толуен	1% L-аскорбинова киселина
Хидролиза	5 ml 0.5 М КОН, 80 °С, 30 min	5 ml 1.0 М КОН, 80 °С, 20 min
ТТЕ	2:4 = H ₂ O:C ₆ H ₁₄ (v/v)	1:1 = H ₂ O:C ₆ H ₁₄ (v/v)

Принципният ход на процедурата за анализ при модифицирания метод е представен на фигура 1. Паралелните проби бяха приготвени като непосредствено след претеглянето на хомогената, към тях се добави антиоксидант, хидролизиращ реагент, а само към половината и стандартна добавка от анализираните вещества. С цел постигане на по-пълна хидролиза, на всеки 5 min пробите се разбъркват за 20 сек на Vortex миксер при 3000 оборота/min.



Фигура 1 Схема на пробоподготовка на проба от ядивна рибна тъкан

Поради склонността към автоокисление на витамини А, D₂, D₃ и Е, и поради фоточувствителността на витамини А и Е, хидролизата е провеждана в безкислородна среда под азот и при отсъствие на светлина. След приключването ѝ пробите са охлаждани на тъмно в ледена водна баня при 0÷4 °С за 20 min.

Поради хидрофобността им, извличането на мастноразтворимите витамини от хидролизата се извършва с неполярен разтворител (фиг. 1). ТТЕ е проведена двукратно в продължение на 1 min при 3000 оборота/min на Vortex миксер. След центрофугиране са отделяни хексановите екстракти и са изпарявани до сухо под струя инертен газ – азот. Полученият сух остатък е разтворен в 200 µl метанол, след което 20 µl от получения разтвор са инжектирани във HPLC за провеждане на качествен и количествен анализ.

3.3. Качествен и количествен течно-хроматографски анализ

Съвместно качествено и количествено определяне на витамини А и Е

Една от основните промени на хроматографския анализ в метода на Lopez-Cervantes J. et al. (2006) е подвижната фаза, чрез която се извършва разделянето на анализите (табл. 3). Използваната трикомпонентна смес (68 : 28 : 4 = MeOH : ACN : H₂O, 1,4 ml/min) е заменена с еднокомпонентна - 100% MeOH; 0,9 ml/min.

Таблица 3 Оптимизирани параметри в етапа на хроматографския анализ

Параметър	Процедура Lopez-Cervantes	Метод витамини А и Е
Хроматографска колона	SS Exil 25x0,46 cm ODS 5 μ m	RP Hypersil, 250x4,6 cm ODS2 5 μ m
Подвижна фаза	68 : 28 : 4 = MeOH : ACN : H ₂ O, 1,4 ml/min	100% MeOH, 0,9 ml/min
Детекция	<u>DAD детектор</u> $\lambda_{\max} = 325$ nm (ретинол) $\lambda = 208$ nm (токоферол и холестерол)	<u>UV/Vis детектор</u> $\lambda_{\max} = 325$ nm (ретинол) $\lambda_{\max} = 295$ nm (α - токоферол)

Променените хроматографски условия осигуриха добро разделяне на анализите от другите компоненти на пробата и позволиха тяхното качествено и количествено определяне.

Съвместно качествено и количествено определяне на витамини А, D и Е

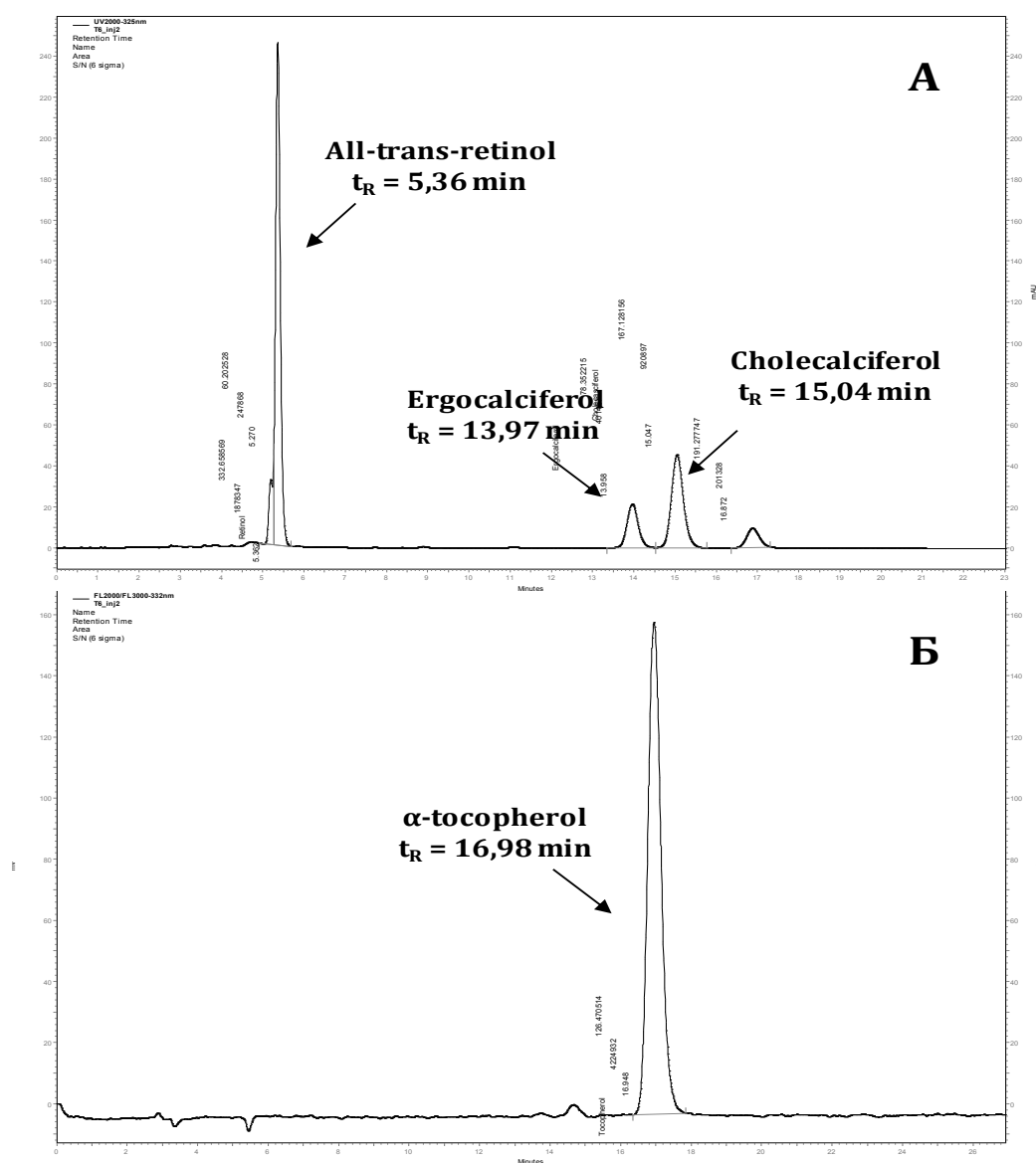
Хроматографският метод за разделяне и качествен и количествен анализ е модифициран с цел едновременно анализиране на четирите анализа – витамини А, D₂, D₃ и Е. За целта е използвана HPLC с UV/Vis и FL детектори, обратнофазова хроматографска колона - ODS2 Hypersil™ C18, 250mm x 4.60 mm, 5 μ m (работна температура 25°C).

Таблица 4 Параметри в етапа на хроматографския анализ на двата използвани метода

Параметър	Метод витамини А и Е	Метод витамини А, D и Е
Хроматографска колона	RP Hypersil, 250x4,6 cm ODS2 5 μ m	RP Hypersil, 250x4,6 cm ODS2 5 μ m
Подвижна фаза	100% MeOH, 0,9 ml/min	97:3=MeOH:H ₂ O, 1,0 ml/min
Детекция	<u>UV/Vis детектор</u> $\lambda_{\max} = 325$ nm (ретинол) $\lambda_{\max} = 295$ nm (α - токоферол)	<u>UV/Vis детектор</u> $\lambda_{\max} = 325$ nm (ретинол) $\lambda_{\max} = 265$ nm (ергокалциферол и холекалциферол) <u>FL-детектор</u> $\lambda_{\text{ex}} = 288$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 332$ nm (α -токоферол)

Като подвижна фаза е използвана двукомпонентна смес метанол и вода в обемно съотношение 97% към 3% с поток 1 ml/min. Тази промяна се наложи от необходимостта за добро разделяне на хроматографските пикове на витамини D₂ и D₃. Витамин Е бе детектиран с FL-детектор, с цел повишаване чувствителността на анализа (фиг. 2).

На фигура 2 е представена хроматограма на работен стандартен разтвор на изследваните мастноразтворими витамини съдържащ съответно 0,8 µg ретинол, 0,8 µg ергокалциферол, 0,8 µg холекалциферол и 8,0 µg α-токоферол. Тези количества на анализите попадат в средната област на концентрационния диапазон, в който е построена калибрационната графика.



Фигура 2 HPLC хроматограми на комбиниран стандартен разтвор, съдържащ ретинол (8.0 µg/ml), ергокалциферол (8.0 µg/ml), холекалциферол (8.0 µg/ml) и α-токоферол (80.0 µg/ml) (А)

Канал 1, UV/Vis детекция на ретинол при λ_{\max} 325 nm и на холекалциферол при λ_{\max} 265 nm;

(В) Канал 2, FL детекция на α-токоферол при λ_{ex} = 288 nm and λ_{em} = 332 nm

Идентификацията на анализите бе извършена по техните времена на задържане, които са: $t_R=5,36 \pm 0,7$ min за витамин А, $t_R=13,97 \pm 0,6$ min за витамин D₂, $t_R=15,04 \pm 0,6$ min за витамин D₃ и $t_R=16,98 \pm 0,8$ min за витамин Е. Витамин А, витамин D₂ и витамин D₃ са детектирани с UV-детектор (фиг. 2А), при дължини на вълната - при $\lambda_{max} = 325$ nm за витамин А и при $\lambda_{max} = 265$ nm за витамини D₂ и D₃. Витамин Е е детектиран при дължини на вълната на възбуждане $\lambda_{ex} = 288$ nm и емисия $\lambda_{em} = 332$ nm (фиг. 2 Б).

Хроматографските условия на метода са модифицирани така, че да се постигне добро разделяне на анализите и продължителност на хроматографския анализ не по-дълга от 30 минути.

Количественият хроматографски анализ е извършен по метода на външния стандарт. За целта са приготвени серия метанолови стандартни разтвори на анализите. Използваните аналитични стандарти на мастноразтворимите витамини А, D₂ и D₃ и Е бяха съответно: all-trans ретинол (Fluka), ергокалциферол (Sigma Aldrich), холекалциферол (Sigma Aldrich) и α -токоферол (Sigma Aldrich).

Смесените работни стандартни разтвори бяха приготвени с концентрационни нива в следния концентрационен диапазон на четирите анализа:

- **all-trans ретинол** - $0,5 \div 16$ $\mu\text{g/ml}$;
- **холекалциферол** - $0,5 \div 16$ $\mu\text{g/ml}$;
- **ергокалциферол** - $0,5 \div 16$ $\mu\text{g/ml}$;
- **α -токоферол** - $5 \div 160$ $\mu\text{g/ml}$.

За всеки стандартен разтвор бяха приготвени по три паралелни проби, които бяха анализирани хроматографски. На базата на получените резултати бяха построени калибрационни графики за всяко от анализирани вещества.

Модифицираният метод за едновременно количествено определяне на витамини А, D₂, D₃ и Е, беше използван при анализа на витаминното съдържание на ядивната тъкан на черноморските и сладководни рибни видове, предмет на настоящата работа.

3.4. Валидиране на метода и контрол на качеството

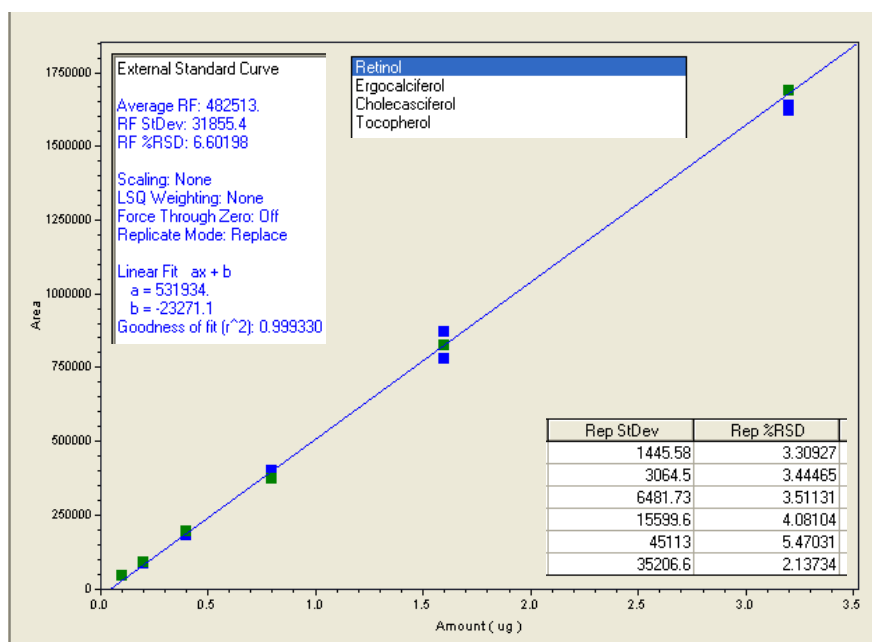
Оценяването на аналитичната надеждност (валидиране) на модифицирания метод за едновременно количествено определяне на витамини А, D₂, D₃ и Е беше извършено съобразно процедура (БДС EN ISO/IEC 17025:2005). Чрез валидирането се гарантира качеството и достоверността на получените резултати. Параметрите, които е необходимо да бъдат

определени са възпроизводимост (систематична грешка), аналитичен добив, линейност, граница на откриване и граница на количествено определяне.

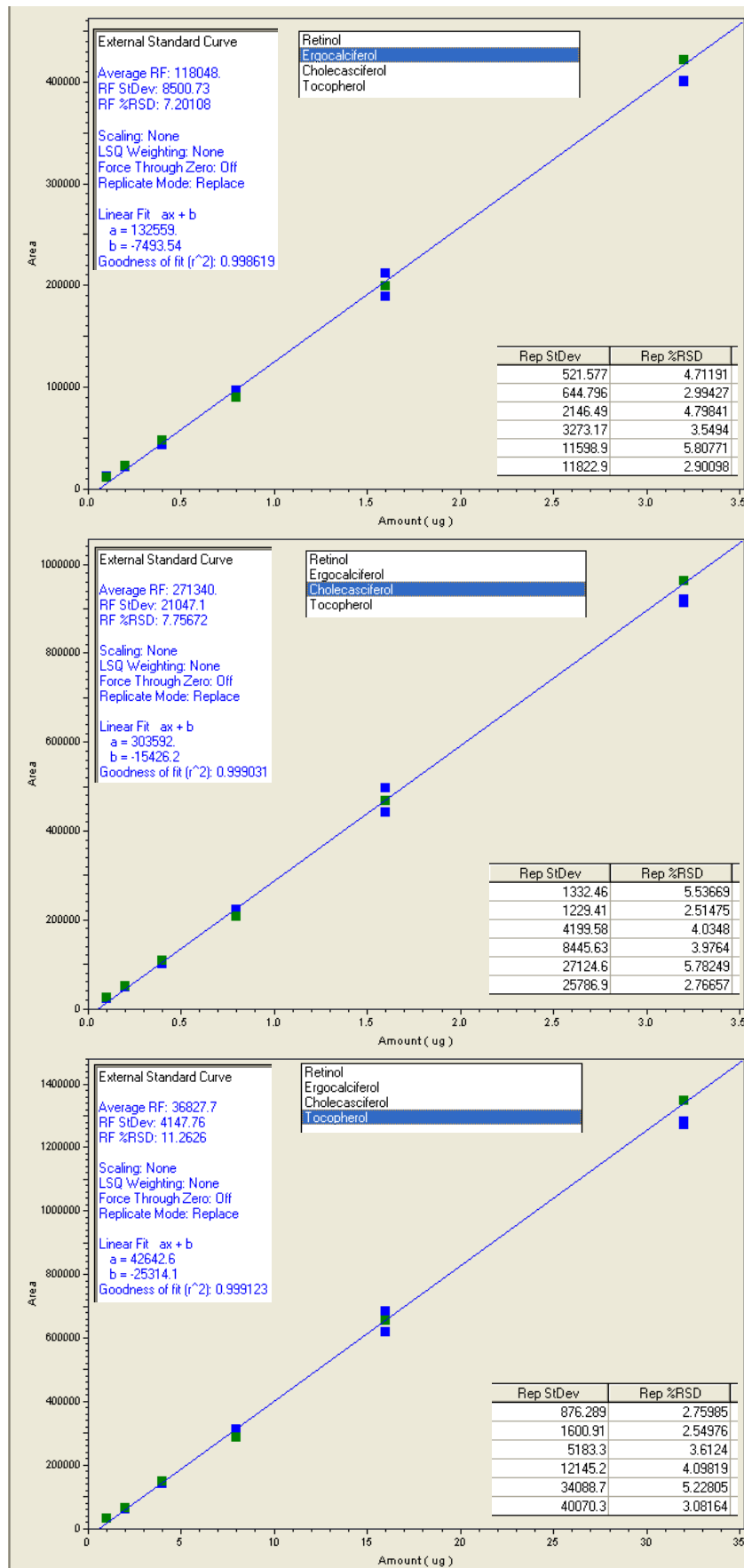
Апробирането на метода беше извършено чрез неколkokратно анализиране на серия от 10 паралелни проби рибна тъкан. От получените резултати са определени параметрите на аналитичната процедура.

- **Възпроизводимост** (прецизност, повтаряемост) – получени са следните стойности на относителните стандартни отклонения на възпроизводимостта, които са в граници от 2,1 до 5,7 %RSD. Получените стойности на относителните стандартни отклонения на повтаряемостта за четирите анализа са в граници от 1,2 до 2,8 %RSD (фиг. 3 и 4). Възпроизводимостта беше определена като в продължение на пет дни бяха анализирани по три паралелни проби рибен екстракт. Получените относителни стандартни отклонения за четирите определени анализа са: при ретинол – 10,43 %RSD, при ергокалциферол – 9,59 %RSD, при холекалциферол – 9,80 %RSD и при α -токоферол 10,43 %RSD.

- **Аналитичен добив** – определянето му беше извършено по метода на „стандартната добавка“. За целта бяха приготвени десет паралелни проби от хомогенизирана рибна тъкан. Към пет от тях, в качеството си на „стандартна добавка“, беше добавен комбиниран метанолов разтвор с познати аналитични концентрации на стандартните вещества. След провеждане на пълната процедура по извличане на анализите бяха сравнени получените резултати от двете групи проби (без и с добавка от анализите). При сравняването им беше изчислен аналитичния добив на четирите анализа както следва: 82% за витамин А, 90% за витамин D₂, 86% за витамин D₃ и 94% за витамин Е.



Фигура 3 Калибрационна права за витамин А



Фигура 4 Калибрационни прави за витамини D₂, D₃ и E

• **Линейност** – определен е диапазонът, в който сигналът на анализите е в линейна зависимост от концентрацията им. За установяването ѝ беше извършен хроматографски анализ на шест смесени стандартни разтвора с нарастващи концентрации на анализирани вещества. Линейността на метода беше доказана в концентрационни граници: 0,5 µg - 8,0 µg за ретинол, ергокалциферол и холекалциферол, и 5 µg - 160 µg за α-токоферол. Получени са коефициенти на корелация - съответно 0,99933; 0,99861; 0,99903 и 0,99912. Получените корелационни уравнения за анализите са както следва: $y=5,3x - 0,2$ за витамин А, $y=1,3x - 0,07$ за витамин D₂, $y=3,0x - 0,1$ за витамин D₃ и $y = 0,4x - 0,2$ за витамин Е (фиг. 3, 4).

• **Границите на откриване (LoD)** за четирите анализирани витамини са:

- 4 ng за витамин А;
- 15 ng за витамин D₂;
- 15 ng за витамин D₃;
- 10 ng за витамин Е

• **Границите на количествено определяне (LoQ)**, на четирите анализирани витамини са:

- 6 ng за витамин А;
- 30 ng за витамин D₂;
- 30 ng за витамин D₃;
- 20 ng за витамин Е.

Контрол на качеството на получаваните резултати беше извършван чрез проверка на точността на калибрационната крива. Тя беше провеждана с всяка серия проби. При установяване на отклонения в получаваните данни, както и на всеки шест месеца беше извършвано обновяване на калибрационната крива.

3.5. Статистически анализ на резултатите

Статистическият анализ на резултатите е осъществен с помощта на статистически софтуер Graph Pad Prism 5 [GraphPad Software, 2014, www.graphpad.com].

За всяка от анализирани проби са изчислявани средните стойности за количествата на изследваните витамини, стандартните отклонения и относителната (процентна) грешка на анализа. Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение, в микрограми за сто грама мокро тегло ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$) ядивна рибна тъкан.

За графичното представяне на резултатите е използвана същата статистическа програма.

Статистическа значимост е отчитана при $p < 0,05$. Проследени са:

- разлики в съдържанието на витамините в зависимост от сезона на изследване;
- промени, настъпващи след различна обработка на ядивната рибна тъкан;
- промени, настъпващи вследствие продължителността на съхранение на рибните проби.

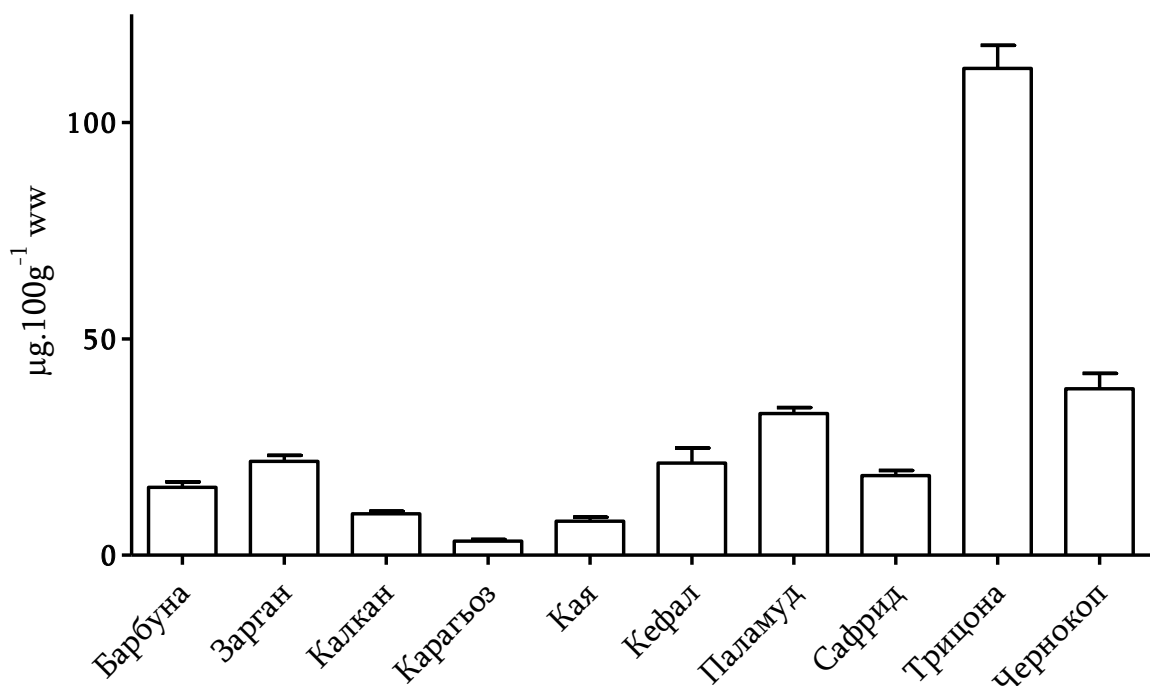
III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Количеството на мастноразтворимите витамини А, D₃ и Е е определено в свежа ядивна тъкан на десет черноморски и на пет сладководни рибни вида.

1. СЪДЪРЖАНИЕ НА ВИТАМИНИ А, D₃ И Е В ЧЕРНОМОРСКИ РИБНИ ВИДОВЕ

1.1. Съдържание на витамин А в свежа ядивна тъкан на черноморски риби

Количеството на витамин А варира в много широки граници в изследваните рибни видове – от 0,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ до 192,3 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (фиг. 5). Подобни различия в резултатите са докладвани и от други научни колективи – 141 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (сафрид) [Erkan N. et al., 2009]; 37 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (сафрид) и 64 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (скумрия) [Dias M. et al., 2003]; 11,7 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (калкан), 7,0 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (зарган), 50,6 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (скумрия) и 150 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (трицона) [Danish Food Composition Databank, 2009].



Фигура 5 Съдържание на витамин А в ядивна тъкан на черноморски рибни видове

Сред анализираните риби пролетната кая се отличава с най-ниско съдържание на витамин А. Възможно обяснение е ниското липидно съдържание ($2,1\text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$) в ядивната тъкан на

тази риба [Stancheva M., 2013]. С близко до това на каята съдържание на витамин А, се характеризират също пролетната и есенна проба карагъоз – 2,2 и 4,4 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (фиг. 6). Останалите анализирани риби – калкан, сафрид и барбуна са със значително по-високи стойности от гореспоменатите и са в граници от 10,7 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (при пролетен сафрид) до 38,5 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ (при чернокоп). Пробата пролетна трициона се характеризира със значително по-високо съдържание на витамин А в сравнение с останалите анализирани риби (192,3 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$). Възможно обяснение за това повишено съдържание е, че за разлика от другите рибни видове, при трициона ядивната тъкан включва цялото тяло с вътрешни органи (вкл. черния дроб, който е основно депо на ретинол), като са отстранени единствено глава и опашка. Друг фактор, който е от значение за високото съдържание на витамин А е целогодишния репродуктивния цикъл на този рибен вид [Kołakowska A., 2000; Stancheva M., 2013]. Като трети фактор се явява сравнително високото липидно съдържание на трициона [Мерджанова А., 2014].

На фигура 5 е представено сравнение на средните стойности на витамин А, за анализирани през двата сезона риби, и количествата на другите, анализирани през един сезон. От нея се вижда, че изследваните видове условно могат да се разделят в три групи: над 30 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$, около 20 ÷ 10 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ и под 10 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$.

В първата група попадат трициона, чернокоп и паламуд. Най-голям е броят на рибите от втората група - зарган, кефал, сафрид, барбуна и калкан. Две са пробите – кая и карагъоз, в които са установени количества на витамин А значително под 10 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$. Подобни ниски количества тези риби показват и по отношението на съдържанието си на ПНМК [Мерджанова А., 2014].

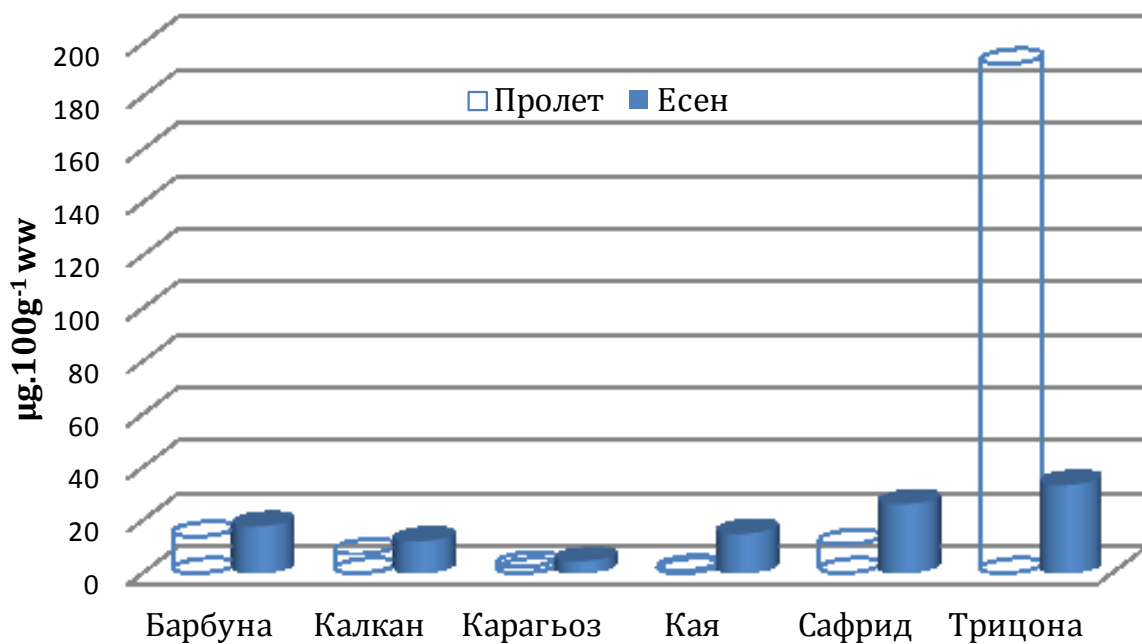
Датската база данни представят резултати за съдържание на витамин А в трициона и калкан [Danish Food Composition Databank, 2009]. Установеното от нас съдържание за този витамин и в двата случая е изключително близко по стойност. В ядивната тъкан на трициона те показват количество от 190,0 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ витамин А, докато ние установяваме 192,3 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ за есенната проба. Подобно е съотношението на данните и по отношение на калкан. Датската База Данни представя 11,7 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ витамин А, а резултатът в настоящата работа за ядивна тъкан на калкан/есен е 11,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$.

Карагъозът е рибен вид с високо липидно съдържание – по класификацията на Кьосев и Драгоев (2009) - над 10 гр. на 100 гр. сурово тегло [Мерджанова А., 2014]. Пробите през двата сезона обаче показват сравнително ниско съдържание на п6 ПНМК, което вероятно обяснява и ниското съдържание на витамин А на карагъоза – 2,2 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ в пролетната и 4,4 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ в есенната проби.

Съдържанието на витамин А в сафрид е изследвано от множество научни колективи. Техните резултати - $10,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Whole Food Catalog, 2009]; $37,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Dias M. et al., 2003] са близки с данните, получени от нас за пролетна и есенна проби – съответно $10,7 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ и $26,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$.

Ahmadnia и колектив са изследвали рибни филета на кефал и посочената от тях стойност за съдържание на витамин А в ядивна тъкан е $140 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Ahmadnia et al., 2008]. Тази стойност шесткратно превишава стойностите, получени от нашето изследване за този рибен вид ($21,3 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$). От друга страна, в калифорнийската база данни е цитирана стойност за витамин А $36,8 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$, която е много близка до получения от нас резултат [SELFNutritionData, 2014]. Този резултат корелира с данните за ниското съдържание на общи липиди и ПНМК [Мерджанова А., 2014].

Американската База Данни представя резултати за съдържание на витамин А във филета на чернокоп [USDA National Nutrient Database, 2012]. Докладваната от тях стойност ($120 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) е трикратно по-висока от установената от нас ($38,5 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$). Установената в нашето изследване стойност на витамин А в ядивна тъкан на зарган ($21,7 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) е трикратно по-висока от тази посочена в Датската База Данни ($7,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) [Dan. Food Comp. Databank, 2009]. Вероятното обяснение за наблюдаваните различия е различното местообитание, което е от съществено значение и за спецификата на приеманата храна, която е в пряка връзка с витаминното съдържание на рибите [Lu Z. et al., 2010].



Фигура 6 Съдържание на витамин А ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) в черноморски рибни видове анализирани през два сезона

На фигура 6 е представено сравнение на количествата на витамин А, установени в шест вида риби, изследвани през сезоните пролет и есен. При пет от тях съдържанието на този витамин е по-високо през есента. Изключение прави трифона, при която се установява обратна тенденция на разпределение – по-високо съдържание на витамин А се отчита в пролетната проба - $192,3 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ спрямо $33,2 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ за есенната. Установеното разпределение между двата сезона съответства на съдържанието на ПНМК [Мерджанова А., 2014]. Сумата ПНМК за пролетната трифона значително надвишава тази в есенната проба.

При всички рибни видове се забелязват статистически значими разлики в съдържанието на витамина между двата сезона ($p < 0.001$; $p < 0.05$).

Изследването на сезонни промени в съдържанието на мастноразтворими витамини е слабо застъпено в литературата. Chakraborty и колектив представят изследване върху витаминното съдържание на морска змиъорка (*Trichiurus lepturus*) през три различни годишни периода, съобразени с цикъла на мусоните в Индия. Те съобщават за промени в съдържанието на витамин А в зависимост от сезона, възрастта на екземплярите и наличната храна в средата на местообитание [Chakraborty K. et al., 2014].

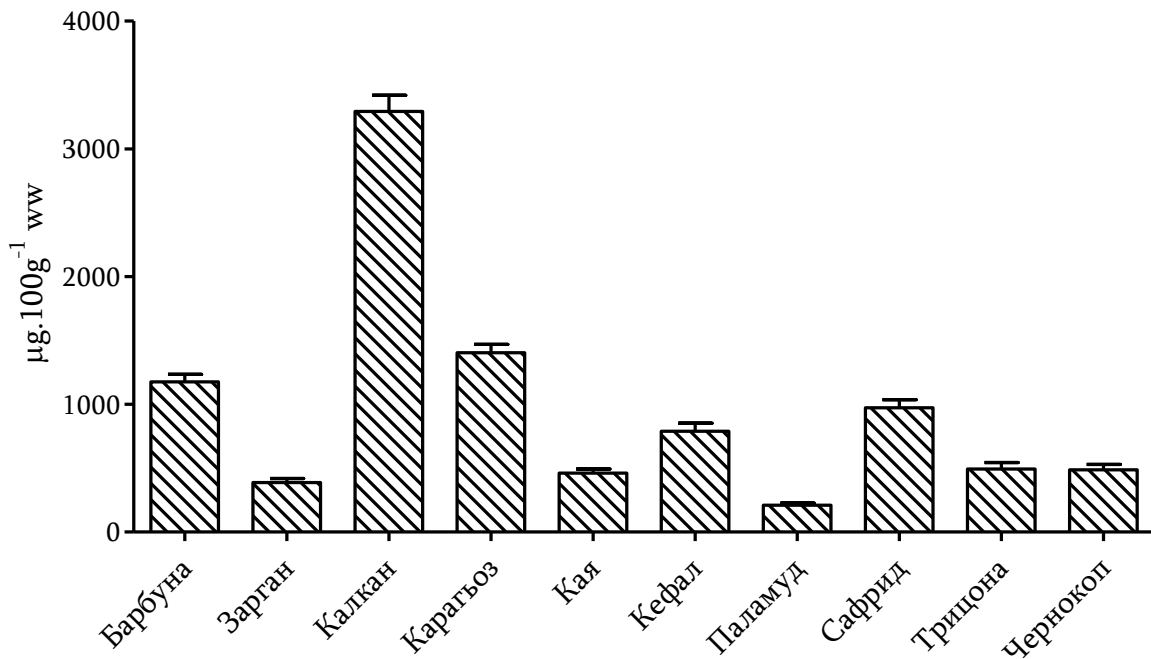
За съдържанието на витамин А в ядивна тъкан на карагъоз и барбуна не са открити данни в прегледаната от нас литература.

1.2. Съдържание на витамин Е в в свежа ядивна тъкан на черноморски риби

Установените количества витамин Е в сурова ядивна тъкан на изследваните рибни видове са много различни и попадат в граници – от $210,4 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ в паламуд до $3293,7 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ в калкан.

Данните, открити в научната литература потвърждават голямата вариабилност на получените от нас резултати за съдържание на витамин Е в ядивна тъкан на различните черноморски рибни видове. Те обхващат още по-широки граници - от $310 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ при сафрид [Aubourg et al., 2004] до $8100 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ при трифона [Ahmadnia et al., 2008].

На фигура 7 са представени осреднените стойности на съдържанието на витамин Е, в ядивната тъкан на шестте анализирани през два сезона, и количествата на четирите анализирани през един сезон, черноморски риби. Най-високо ниво на витамин Е е установено в калкан, а най-ниско - в паламуд. При няколко от анализираните рибни видове се открива съдържание на витамин Е близо до $1000 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$ витамин Е. Това са рибните видове карагъоз, барбуна и сафрид.



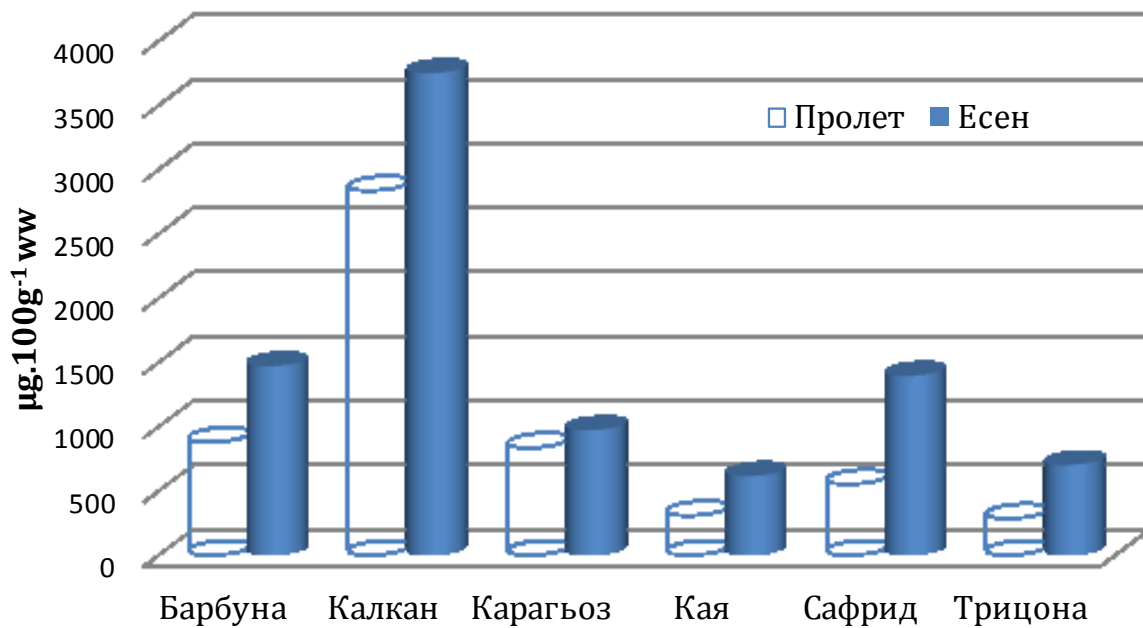
Фигура 7 Съдържание на витамин Е в ядивна тъкан на черноморски риби

Останалите изследвани риби, показват стойности двукратно по-ниски от 1000 µg.100g⁻¹ ww витамин Е – трицона, чернокоп, кая, зарган и паламуд. Много близки са стойностите открити в пробите трицона, чернокоп и кая, чието съдържание е близко 500 µg.100g⁻¹ ww. Двукратно по-ниско от тяхното е съдържанието на витамин Е в паламуд (210,4 µg.100g⁻¹ ww).

Тъй като една от функциите на витамин Е е да предпазва тъканните липиди от окисление, може да се допусне, че по-ниското съдържанието на този витамин в изброените риби се дължи и на по-ниското им липидно съдържание [Ribarova F. et al., 2003; Tømmerås S., 2011; Мерджанова А., 2014].

Фигура 8 представя резултатите от количествения анализ на витамин Е на шестте черноморски риби, изследвани през сезоните пролет и есен.

При всички видове, освен карагъоз, се установява статистическа значимост ($p < 0.001$) на установените различия между нивата за двата сезона (фиг. 8). При всички риби се отчита повишение на съдържанието на витамин Е през есента. Това се подкрепя от данните за липидното съдържание на тези риби през двата сезона. При всички от тях то е по-високо през есенния сезон, като изключение прави единствено карагъоз, при който не се наблюдава статистически значима разлика [Мерджанова А., 2014].



Фигура 8 Съдържание на витамин Е ($\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) в черноморски рибни видове анализирани през два сезона

При рибите сафрид и кая, повишението на количеството на витамин Е на есенните проби е над 50% спрямо това на пролетните. Изключение правят карагъоз и трицона, при които се установява двукратно понижение на съдържанието в есенните проби (фиг. 8).

Прави впечатление изключително високото съдържание на витамин Е в пробите калкан и за двата сезона (фиг. 8), в сравнение с това на другите изследвани рибни видове. То е тринадесет пъти по-високо от установените нива в пробите пролетна кая и есенна трицона. Това се потвърждава от мастнокиселинния състав на тази риба. В калкан са установени най-високите нива и на двете групи n_3 и n_6 ПНМК [Мерджанова А., 2014].

Обект на най-интензивни изследвания е съдържанието на витамин Е в трицона и сафрид. По-слабо проучени са нивата на този витамин в кефал и зарган.

Големи различия в съдържанието на витамин Е в трицона са установени от различни научни колективи. Ribarova и съавтори откриват съдържание на витамин Е $350 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$, което е близко до установеното от нас при есенна трицона ($284,9 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$), докато Датската база данни представя трикратно по-високи резултати ($2500 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$), а Ahmadnia и колектив – в пъти по-високи стойности ($8100 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) [Ribarova F. et al., 2003; Ahmadnia A. et al., 2008; Danish Food Composition Databank, 2009].

Съдържанието на витамин Е в ядивна тъкан на сафрид е изследвано от множество автори [Dias M. et al., 2003; Aubourg S. et al., 2004; Erkan N. et al., 2009; Whole Food Catalog, 2009; Orban E. et al., 2011]. Цитираните автори установяват близки стойности в граници от 310

$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww до $740 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww. Техните данни съответстват на установеното от нас количество на витамин Е в пролетната проба сафрид ($552,3 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww, фиг. 8).

Ahmadnia и колектив изследват съдържанието на витамин Е в ядивна тъкан на кефал [Ahmadnia A. et al., 2008]. Техните резултати ($1250 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) са двукратно по-високи от установените от нас ($788,2 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww).

Съдържанието на витамин Е при зарган, докладвано от Датската База Данни (1700 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww), е четири пъти и половина по-високо в сравнение с установеното от нас количество ($387,5 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) [Danish Food Composition Databank, 2009]. Тези различия вероятно се дължат на различния воден басейн.

Данните в научната литература за съдържанието на витамин Е в останалите шест черноморски вида са твърде оскъдни.

1.3. Съдържание на витамин D₃ в свежа ядивна тъкан на черноморски риби

Количествата на витамин D₃ в свежа тъкан на изследваните рибни видове са в много по-тесни граници ($2,5 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww до $46,5 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) от тези, наблюдавани за другите два изследвани мастноразтворими витамина.

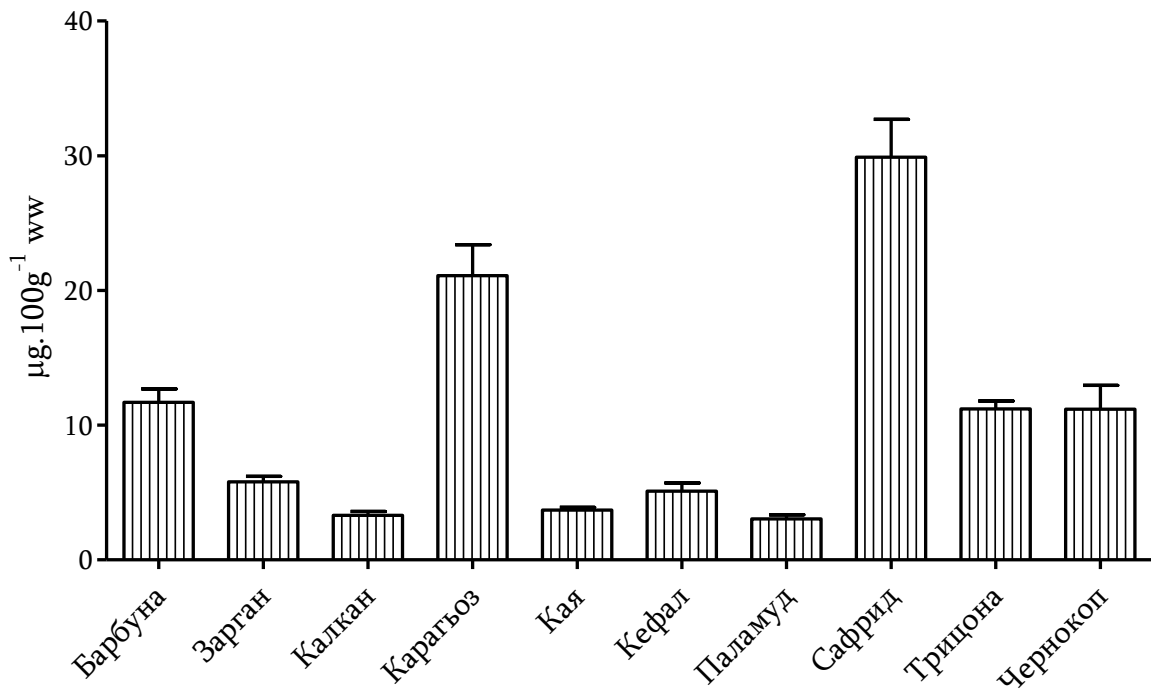
Както при витамин А и тук най-ниската установена стойност е в ядивната тъкан на кая ($2,5 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww).

На фигура 9 са представени осреднените стойности на витамин D₃ за черноморските риби анализирани през два сезона и останалите четири, анализирани през един. Подобно на другите два витамина и тук условно рибните проби могат да се разделят според съдържанието на витамин D₃ в три групи:

- над $20 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww витамин D₃ са установени в пробите карагьоз и сафрид;
- около $10 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww е съдържанието на витамин D₃ в рибите барбуна, трициона и чернокоп;
- около и под $5 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww витамин D₃ показват останалите пет проби от зарган, кефал, кая, калкан и паламуд.

Редица научни изследвания представят данни за съдържанието на витамин D₃ в ядивна тъкан на сафрид, трициона, чернокоп, калкан, кефал и зарган.

Най-високи нива на витамин D₃ са установени в сафрид. За разлика от него, в пробите калкан бе установено едно от най-ниските съдържания на витамин D₃ - $3,3 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww (фиг. 9). Тази стойност е изключително близка до представената от Ostermeyer и Schmidt – $2,3 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww за проба калкан от Северно море [Ostermeyer and Schmidt, 2005].



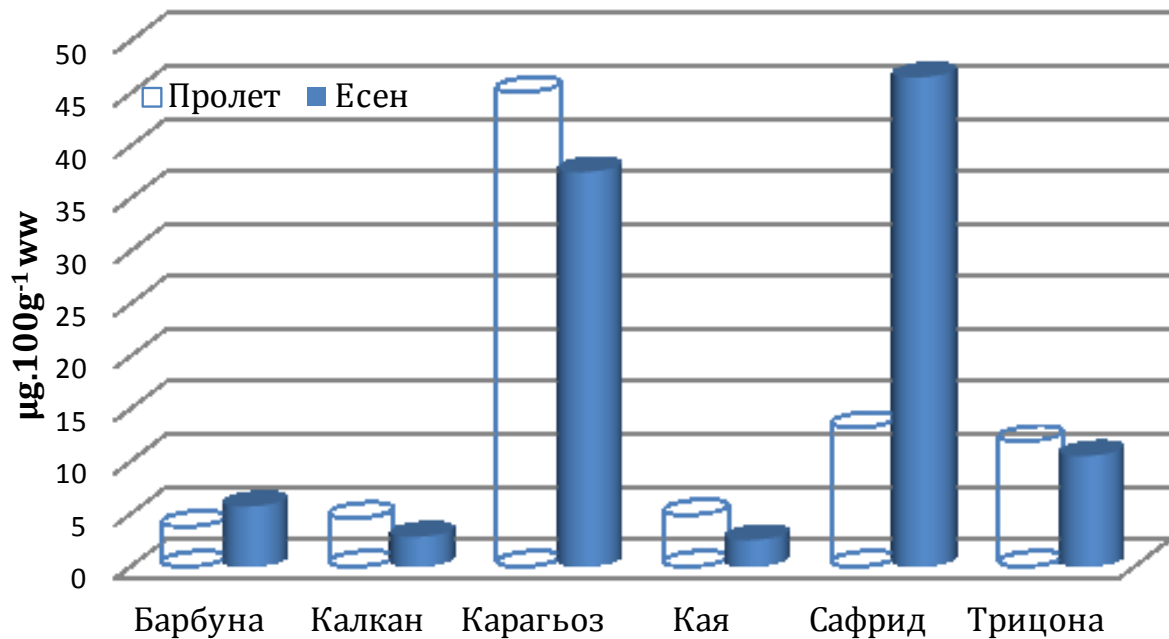
Фигура 9 Съдържание на витамин D₃ в ядивна тъкан на черноморски рибни видове

Ahmadnia и колектив докладват съдържание на витамин D₃ в трицона 650 µg.100g⁻¹ ww и в кефал 147 µg.100g⁻¹ ww [Ahmadnia A. et al., 2008]. За тези две риби, установените от нас резултати са значително по-ниски – съответно 11,2 µg.100g⁻¹ ww и 5,1 µg.100g⁻¹ ww. Тези различия вероятно се дължат на местообитанието (Каспийско море), което предполага специфично хранене (вкл. флора и фауна).

Lu и колектив представят резултати от анализ на витамин D₃ в ядивна тъкан на чернокоп (7,0 µg.100g⁻¹ ww) [Lu Z. et al., 2007]. Показаната стойност е близка до установеното от нас количество (11,2 µg.100g⁻¹ ww).

В унисон с тези данни, при изследване на ядивна тъкан на зарган (5,8 µg.100g⁻¹ ww), нивата на витамин D₃ са много близки с тези цитирани от Датската база данни - 5,0 µg.100g⁻¹ ww [Danish Food Composition Databank, 2009].

На фигура 9 са сравнени количествата на витамин D₃ в черноморски риби, анализирани в сезоните пролет и есен. При всички рибни видове се забелязват статистически значими разлики (p<0.001; p<0.05) в съдържанието определено за двата сезона на анализ. За разлика от наблюдаваната закономерност за повишаване количествата на витамини А и Е през есента, то тук такава не се открива.



Фигура 10 Съдържание на витамин D₃ (µg.100g⁻¹ ww) в черноморски рибни видове

В четири от изследваните риби се наблюдава по-високо съдържание на витамин D₃ за пролетни проби - кая, карагъоз, калкан и триçона. По-високо съдържание на есенните проби се открива при сафрид и барбуна (фиг. 10). Тези различия вероятно са породени от специфичен метаболизъм на всеки рибен вид, както и от консумираната храна (богата на витамин D прекурсор) в съответния сезон [Huss H., 1995].

Най-високо съдържание на витамин D₃ се наблюдава в пробите на пролетен карагъоз и есенен сафрид, последвани от есенен карагъоз (фиг. 10). Същите проби показват високо съдържание и на витамин E (фиг. 8), а сафридът и на витамин A (фиг. 6). При всички останали рибни видове, установените количества са значително по-ниски – четирикратно при триçона (пролет и есен), пролетен сафрид и чернокоп, а при барбуна, калкан, кая, зарган, кефал и паламуд понижението е над седем пъти. Спецификата на този витамин не предполага търсене на зависимост между неговото съдържание и това на тъканните липиди (наситени и ненаситени мастни киселини).

Най-широко изследван е сафридът, като посочените за него данни са: от 2,0 µg.100g⁻¹ ww [Whole Food Catalog, 2009]; 6,2 µg.100g⁻¹ ww [Ostermeyer and Schmidt, 2005] до 8,7 µg.100g⁻¹ ww [Dias M. et al., 2003] (табл. 7, стр. 32). Тези резултати са близки до установените в нашето изследване количества на витамин D₃ в пролетната проба сафрид (10,7 µg.100g⁻¹ ww). Резултатът, получен за сезон есен е многократно по-висок - 26,0 µg.100g⁻¹ ww (фиг. 24).

*ОБОБЩЕНИЕ ЗА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВИТАМИНИ А, D₃ и Е
В ЧЕРНОМОРСКИ РИБИ*

Получените резултати за количеството на изследваните мастноразтворими витамини в различните рибни видове, показват:

- Наблюдава се зависимост между съдържанието на витамини А и Е и сезона на улов на рибите. Количеството на витамин Е е с по-висока стойност през есента при всички изследвани през два сезона проби.
- За витамин А такова повишение е установено при пет от изследваните рибни видове. Изключение прави трикона, при която по-високи нива на витамин А се наблюдават в пролетната проба.
- Резултатите за съдържанието на витамин D₃ в изследваните рибни видове не показват подобна сезонна зависимост.
- С най-високо съдържание на витамин А се характеризират рибите трикона (112,5 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww), чернокоп (38,5 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) и паламуд (32,8 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww), а с най-ниско карагъоз (3,3 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww). Най-големи количества витамин Е са открити в ядивна тъкан на калкан (3293,7 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww), следван от карагъоз (1403,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww), барбуна (1175,0 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) и сафрид (973,4 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww). Най-богати на витамин D₃ са сафрид (29,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) и карагъоз (21,1 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww).
- Сред всички анализирани черноморски рибни видове ядивната тъкан на паламуд и кая се характеризира с много ниско съдържание и на трите мастноразтворими витамина, което корелира с ниското им липидно съдържание.

2. СЪДЪРЖАНИЕ НА ВИТАМИНИ А, D₃ И Е В СЛАДКОВОДНИ РИБНИ ВИДОВЕ

Съдържанието на витамини А, D₃ и Е е установено в сурова ядивна тъкан на пет сладководни рибни вида от природни популации – шаран, толстолоб и амур (яз. Пясъчник); сом (р. Дунав) и балканска пъстърва (яз. Беглика). Пробите от шаран, толстолоб и амур са вземани през два сезона – пролет и есен, а балканска пъстърва и сом през един сезон - пролет.

2.1. Съдържание на витамин А в свежа ядивна тъкан на сладководни риби

Резултатите от проведените анализи на сладководни риби, показват различия в съдържанието на витамин А в граници от 1,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww за сом до 29,6 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww за балканска пъстърва. Стойностите на витамин А при изследваните сладководни риби обхващат значително по-тесен диапазон, отколкото тези при изследваните от нас черноморските риби.

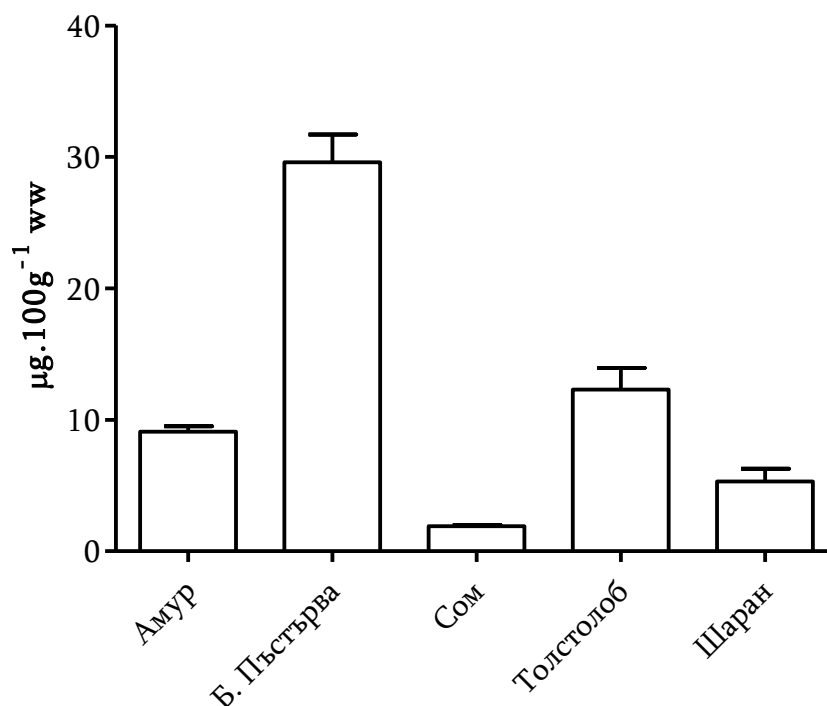
На фигура 11 са представени осреднените стойности на витамин А за сезони пролет и есен в анализирани проби от петте сладководни рибни вида. Ясно се вижда, че пробите от семейство шаранови показват близко съдържание на витамин А, докато това на пъстърва е с около три пъти по-високо.

Сомът и Балканската пъстърва, които са анализирани през сезон пролет, показват съществено отличаващи се по между им стойности за съдържание на витамин А – съответно 1,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww и 29,6 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww (фиг. 11). Тези резултати се потвърждават и от други автори.

Откритите данни в литературата за съдържание на витамин А в ядивна тъкан на сом са оскъдни. Представените от Датската база данни количества са деветократно по-високи от резултатите, установени в нашето изследване - 18,0 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww спрямо 1,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww [Danish Food Composition Databank, 2009].

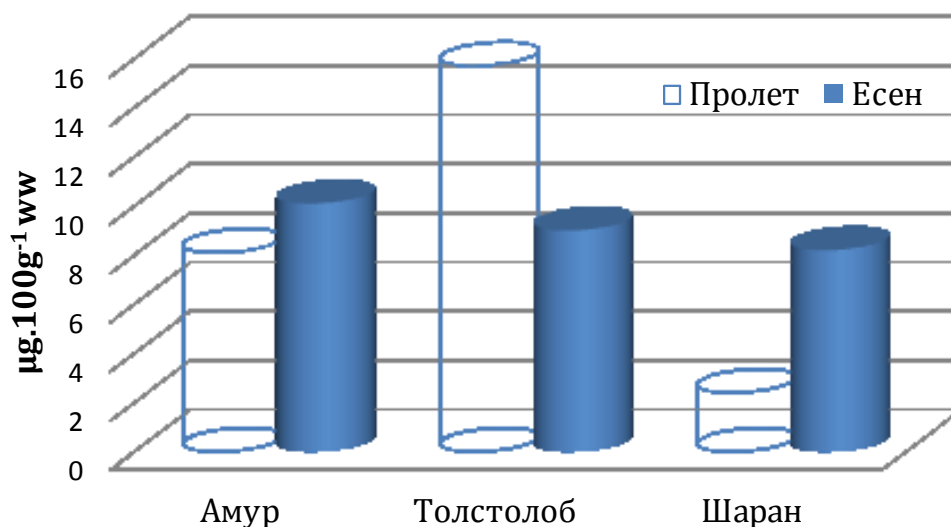
Ozyurt и съавтори са изследвали съдържанието на витамин А в екземпляри сом, предмет на аквакултура [Ozyurt et al., 2009]. Получените от тях резултати - 6,30 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ww са трикратно по-високи от установените в настоящата работа (фиг. 11). Вероятна причина за това е храната, която е използвана при отглеждането на аквакултурата.

Дъговата пъстърва е сладководен рибен вид, който е широко проучван, поради голямото му стопанско значение [Dias M. et al., 2003; Kuhnlein H. et al., 2007; Атанасов А. et al., 2009; Danish Food Composition Databank, 2009; Szlinder-Richert J. et al., 2011]. Тя е в едно семейство с балканската пъстърва и може да се очаква, че данните за нивата на витамините в ядивните тъкани на тези два вида са съпоставими.



Фигура 11 Съдържание на витамин А в ядивна тъкан на сладководни риби

Szlinder-Richert и съавтори са анализирали съдържанието на витамин А в дъгова пъстърва, предмет на аквакултура. Представените от тях резултати (43,1 µg.100g⁻¹ ww) са по-високи от получените при нашето изследване на балканска пъстърва (29,6 µg.100g⁻¹ ww). Други научни групи са изследвали витаминното съдържание на дъгова пъстърва от природна популация. Данните за количествата витамин А, посочени от тях са от един и същ порядък с нашите.



Фигура 12 Съдържание на витамин А (µg.100g⁻¹ ww) в сладководни рибни видове анализирани през два сезона

Атанасов и съавтори и Kuhnlein и колектив представят малко по-високи резултати (съответно $84,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ и $61,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$), докато тези на Dias и съавтори и на Датската база данни са по-ниски - $8,8 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ и $18,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$.

На фигура 12 са представени по сезони нивата на витамин А в сурова ядивна тъкан на шаран, толстолоб и амур, представители на семейство шаранови. При шарана през пролетния сезон се отчита най-ниското съдържание на витамин А ($2,4 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$), а при толстолоб – най-високото ($15,7 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$). Подобно на двусезонните черноморски риби, и тук се наблюдава сезонна динамика в нивата на витамин А. При шаран и амур статистически значимо по-високи стойности ($p < 0.001$) са установени през есента, докато при толстолоб зависимостта е обратна – статистически значимо по-високи са стойностите в пролетната проба ($p < 0.001$).

В научната литература открихме данни за нива на витамин А в ядивна тъкан главно на шаран, от природни популации [Ahmadnia A. et al., 2008; Атанасов А. et al., 2009] и аквакултури [Szlinder-Richert J. et al., 2011]. Посочените от Szlinder-Richert и съавтори ($7,69 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) и Атанасов и колектив ($9,0 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) стойности са в съответствие с полученият от нас резултат за есенна проба шаран $8,2 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$.

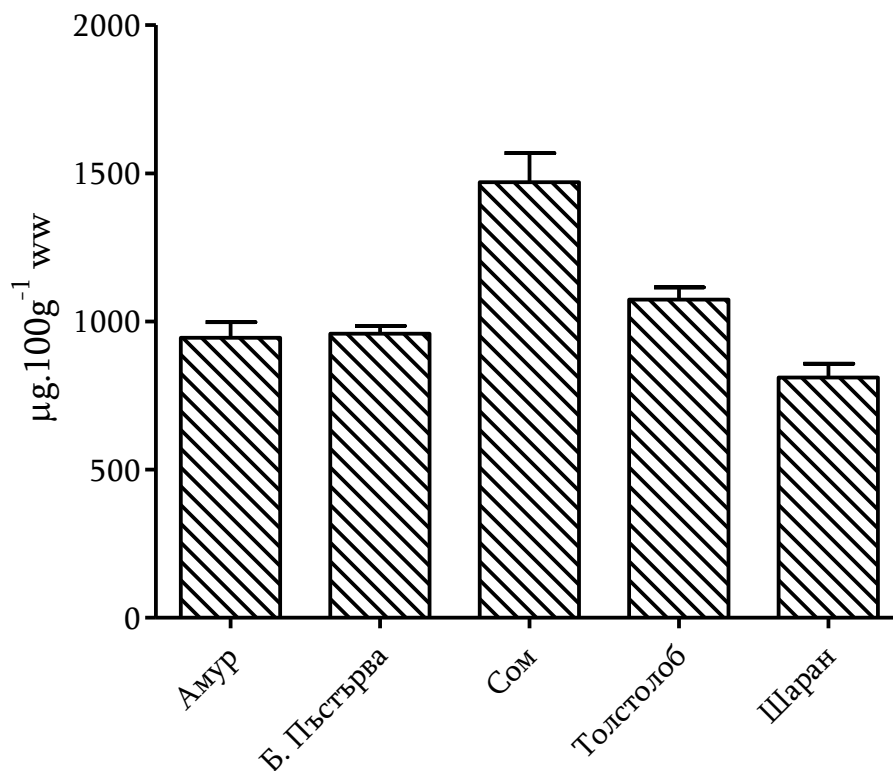
В прегледаните от нас литературни източници, не бяха открити данни за съдържание на витамин А при толстолоб и амур.

2.2. Съдържание на витамин Е в свежа ядивна тъкан на сладководни риби

Количествата витамин Е, установени в свежа ядивна тъкан на изследваните сладководни рибни видове, са в интервала от $698,1 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ до $1470,6 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$. Данните, открити в научната литература за дъгова пъстърва, сом и шаран варират в значително по-широк диапазон – от $130 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ до $2400 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$.

На фигура 13 са сравнени количествата (осреднени за трите анализирани през сезони пролет и есен проби) на витамин Е в изследваните сладководни риби. Получените стойности на витамин Е обхващат много тесен интервал – $811,4 \div 1470,6 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$. Три от изследваните рибни вида имат много близко съдържание на витамин Е със стойности около $1000 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$.

Данните от проучената литература сочат, че голям интерес представлява изследването на съдържанието на витамин Е в рибите със стопанско значение - шаран, сом и дъгова пъстърва.



Фигура 13 Съдържание на витамин Е в ядивна тъкан на сладководни риби

Ahmadnia A. и съавтори и Ribarova F. и колектив представят резултати за съдържание на витамин Е в ядивна тъкан на шаран от природни популации (съответно 190 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww и 480 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) [Ribarova F. et al., 2003; Ahmadnia A. et al., 2008]. Тези стойности са значително по-ниски от установените в нашето изследване - 811,4 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww.

Други автори са изследвали съдържание на витамин Е в ядивна тъкан на аквакултура шаран [Ozyurt et al., 2009; Szlinder-Richert J. et al., 2011]. Посочените от тях данни - съответно 280 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww и 460 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww, са по-ниски от нашите резултати за същия рибен вид от природна популация. Тези различия най-вероятно се дължат на липсата на информация за сезона на улов на анализираниите от различните колективи рибни видове.

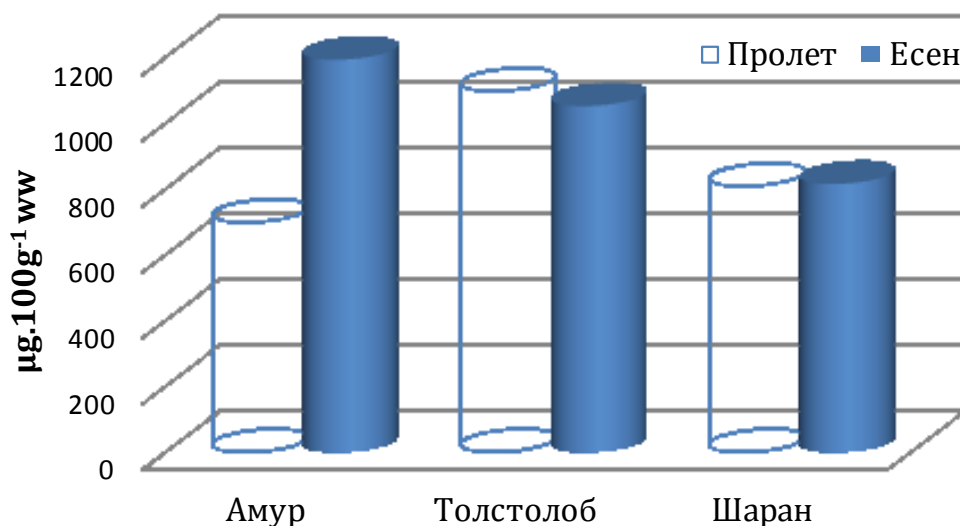
Данни за съдържание на витамин Е в ядивна тъкан на сом от природна популация са представени от Датската база данни [Danish Food Composition Databank, 2009]. Докладваните количества от 2400 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww са по-високи от получените в нашето изследване - 1470,6 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww. За разлика от тях, Ozyurt и съавтори са анализирали аквакултура сом и са получили значително по-ниски стойности за съдържанието на витамин Е (800 $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ww) [Ozyurt et al., 2009]. В цитираните изследвания не се дава информация за сезона на улов, а също и липсват представени биометрични характеристики на рибите, които са от особена

важност за съдържанието на общи липиди и липидоразтворими биологично активни вещества, каквито са и изследваните витамини.

При проведеното от нас изследване на Балканската пъстърва бе установено съдържание на витамин Е от $958,4 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$. В достъпната литература не открихме данни за този рибен вид.

Няколко научни групи представят резултати за съдържанието на витамин Е в ядивна тъкан на дъгова пъстърва (от природна популация и аквакултура), която е от същото семейство като балканската пъстърва [Ribarova F. et al., 2003; Dias M. et al., 2003; Kuhnlein H. et al., 2007; Danish Food Composition Databank, 2009; Szlinder-Richert J. et al., 2011]. Някои от авторите откриват ниски нива на витамин Е - $130 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Dias M. et al., 2003] и $230 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Kuhnlein H. et al., 2007]. При други те са значително по-високи $1600 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Danish Food Composition Databank, 2009] и $1800 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ [Ribarova F. et al., 2003]. За разлика от тях посочената от Szlinder-Richert и съавтори стойност $930 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$ е в много добро съответствие със стойността получена при нашето изследване [Szlinder-Richert J. et al., 2011].

Както при витамин А, така и при витамин Е е извършено сезонно проследяване на съдържанието му в ядивната тъкан на рибите шаран, толстолоб и амур. Получените резултати са представени на фигура 14.



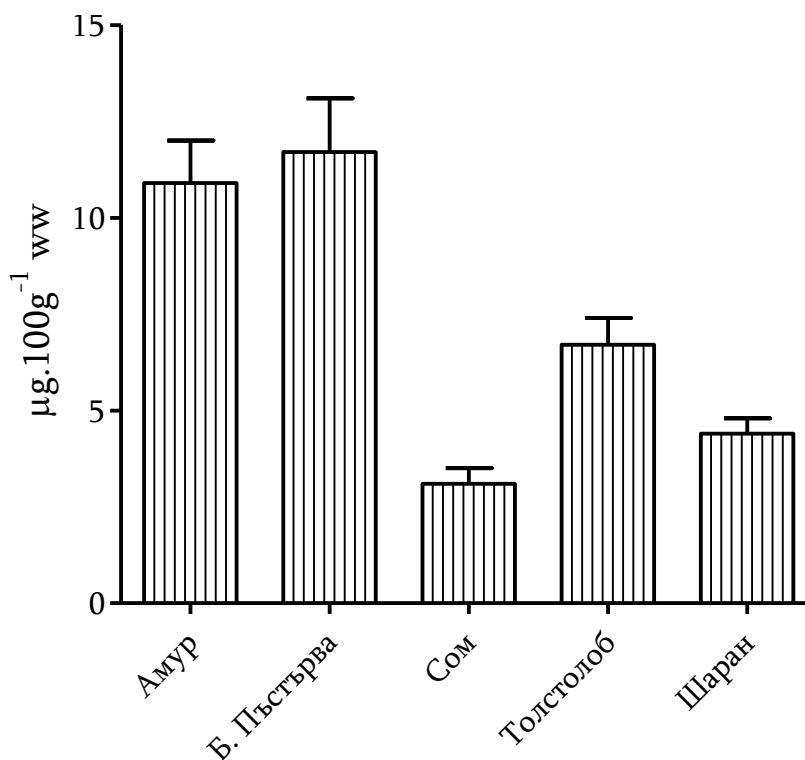
Фигура 14 Съдържание на витамин Е ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) в сладководни рибни видове изследвани през два сезона

При два от анализиранияте видове (амур и шаран) се забелязва повишаване количеството на витамин Е през есенния сезон. В есенната проба амур установеното количество е с около 40% по-високо от това в пролетната ($p > 0,001$). При шаран повишението е статистически незначимо ($p < 0.05$) и е под 1%. Много близки количества на витамин Е са установени при пробите толстолоб за двата сезона, като те показват по-ниско съдържание през есенния сезон (с 4%, $p < 0,05$).

В обобщение може да се каже, че има различно разпределение на данните за витамин Е при сладководните и черноморските изследвани рибни видове. Резултатите за черноморските риби ($210,4 \div 3293,7 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) варират в много по-широки граници, отколкото тези за сладководните ($698,1 \div 1470,6 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$).

2.3. Съдържание на витамин D₃ в свежа ядивна тъкан на сладководни риби

Установените количества на витамин D₃ в свежа ядивна тъкан на сладководни риби варира в изключително тесен диапазон – $1,1 \div 13,9 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$. Данните за количествата този анализ в сладководни риби, в прегледаната литература обхващат много по-широки граници – $1,3 \div 19,7 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$. Два от анализиранияте рибни вида са с много ниско съдържание – пролетен шаран ($1,1 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) и сом ($3,1 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$). Всички останали видове показват значително по-високи количества от витамин D₃.



Фигура 15 Средно съдържание на витамин D₃ в ядивна тъкан на сладководни рибни видове

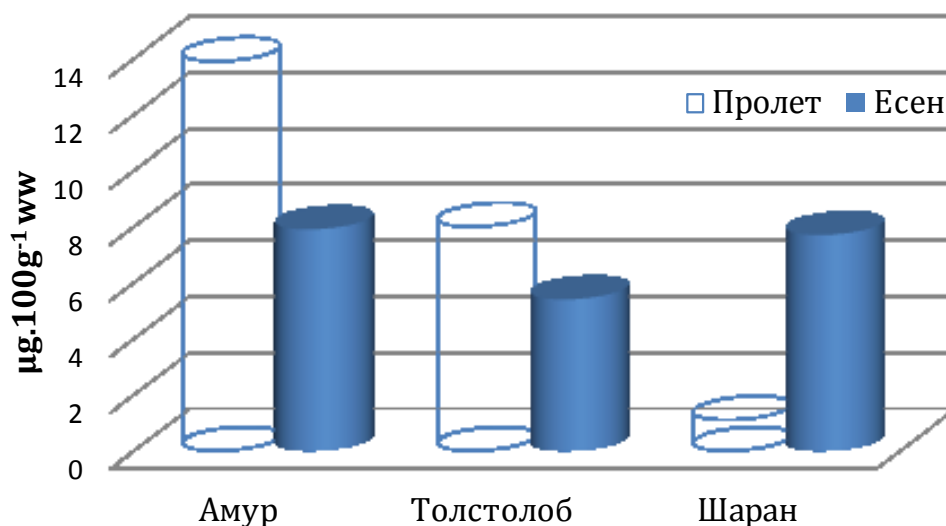
На фигура 15 са представени осреднените стойности на съдържанието на витамин D₃ в петте анализирани сладководни рибни вида. Равномерното разпределение на данните, което се наблюдаваше при витамин Е, тук не се потвърждава. От профила на фигурата се вижда, че две от изследваните риби (пъстърва и амур) показват високо съдържание на витамин D₃ - значително над средното (7,4 µg.100g⁻¹ ww) за тази група риби. При шаран и сом, установените нива са значително под тази стойност, а при толстолоб резултатът почти съвпада със средната стойност за групата (6,7 µg.100g⁻¹ ww). При сравнение на тези данни с резултатите за черноморските риби се забелязва, че тук липсват много високите стойности за витамин D₃, които бяха наблюдавани там (фиг. 9 и 10). При сладководните риби резултатите се подразделят в две групи: около 10 µg.100 g⁻¹ ww и около и под 5 µg.100 g⁻¹ ww.

В литературата са открити данни на различни научни колективи за съдържание на витамин D₃ в шаран, сом и пъстърва [Ostermeyer and Schmidt, 2005; Danish Food Composition Databank, 2009; J. Szlinder-Richert et al., 2011].

При сом се установява най-ниско съдържание на витамин D₃ сред сладководните риби (3,1 µg.100g⁻¹ ww), което се потвърждава от стойностите показани от Датската база данни (1,3 µg.100g⁻¹ ww) [Danish Food Composition Databank, 2009]. За изследваните екземпляри отново липсват данни относно отглеждането – храната и биометрията на изследваните екземпляри.

Съдържанието на витамин D₃ в дъгова пъстърва (предмет на аквакултура и от природна популация) е обект на множество научни изследвания [Dias M. et al., 2003; Ostermeyer and Schmidt, 2005; Kuhnlein H. et al., 2007; Lu Z. et al., 2007; Danish Food Composition Databank, 2009; Szlinder-Richert J. et al., 2011]. Установеното при нашето изследване съдържание на витамин D₃ в балканска пъстърва е 11,7 µg.100 g⁻¹ ww (фиг. 15). То е изключително близко до представените от други научни колективи данни за дъгова пъстърва – 8,0 µg.100 g⁻¹ ww [Szlinder-Richert J. et al., 2011], 8,2 µg.100 g⁻¹ ww [Ostermeyer and Schmidt, 2005], 9,7 µg.100 g⁻¹ ww [Lu Z. et al., 2007] и 13,0 µg.100 g⁻¹ ww [Danish Food Composition Databank, 2009].

На фигура 16 са представени резултати за съдържание на витамин D₃ при изследваните в два сезона сладководни риби – шаран, толстолоб и амур. Подобно на резултатите за витамин А, при изследваните в два сезона риби, и тук при анализа на витамин D₃ се установяват значими сезонни разлики (p<0.001). При два от рибните видове се наблюдава значително понижение на съдържанието на анализа през есенния сезон. При амур то възлиза на 43 %, докато при толстолоб е 32 %. Шаранът показва значително повишение на съдържанието на витамин D₃ в есенните проби – с 85 %. В тази група сладководни риби, прави впечатление близкото съдържание на витамин D₃, което е открито при всички видове през есенния сезон.



Фигура 16 Съдържание на витамин D₃ (µg.100g⁻¹ ww) в сладководни рибни видове изследвани през два сезона

Вероятната причина е еднаквото местообитание, близките биометрични характеристики на анализиранияте екземпляри, както и наличната храна и достъпа на слънчеви лъчи (синтез на витамин D₃).

Оскъдни са данните в литературата за съдържание на витамин D₃ в шаран. Ostermeyer and Schmidt докладват 0,98 µg.100 g⁻¹ ww витамин D₃ в култивиран шаран, което потвърждава получения в нашето изследване резултат за пролетната проба (1,1 µg.100 g⁻¹ ww, табл. 24) [Ostermeyer and Schmidt, 2005]. За разлика от тях Szlinder-Richert установяват 7,46 µg.100 g⁻¹ ww витамин D₃, за шаран предмет на аквакултура. Тази стойност е изключително близка до установената от нас в есенната проба (7,7 µg.100 g⁻¹ ww). Авторите не посочват в проучването си сезона на улов на рибите [Ostermeyer and Schmidt, 2005; Szlinder-Richert J. et al., 2011].

ОБОБЩЕНИЕ ЗА СЪДЪРЖАНИЕ НА ВИТАМИНИ А, D₃ и Е

В СЛАДКОВОДНИ И ЧЕРНОМОРСКИ РИБИ

Резултатите за съдържанието на витамин А в изследваните рибни видове имат близки стойности:

- сладководни риби - $1,9 \div 29,6 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$;
- черноморски риби $0,9 \div 38,5 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$.

Изключение прави трикона през сезон пролет, която е с неколkokратно по-високо съдържание - $192 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$. И при двете групи изследвани риби се наблюдават по-високи стойности на витамин А в изследваните през есенния сезон екземпляри.

Данните за съдържанието на витамин Е в свежа ядивна тъкан на изследваните риби се различават от тези за витамин А. И при двете групи риби се наблюдават много широки граници, в които попадат резултатите. Установените количества за черноморските риби обаче ($210,4 \div 3293,7 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) варират в много по-широк диапазон, отколкото тези за сладководните ($698,1 \div 1470,6 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$). При черноморските видове се установява тенденция на повишаване количеството на витамин Е във всички есенни проби, което не е така ясно изразено при сладководните видове. От сравнението на резултатите за двете групи може да се заключи, че свежата ядивна тъкан на повечето от черноморските риби и на всички сладководни, предоставя значителни количества витамин Е. Най-богати на витамин Е сред черноморските риби са калкан ($3293,7 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$), карагъоз ($1403,9 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) и барбуна ($1175,0 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$), а при сладководните е сом ($1470,6 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$).

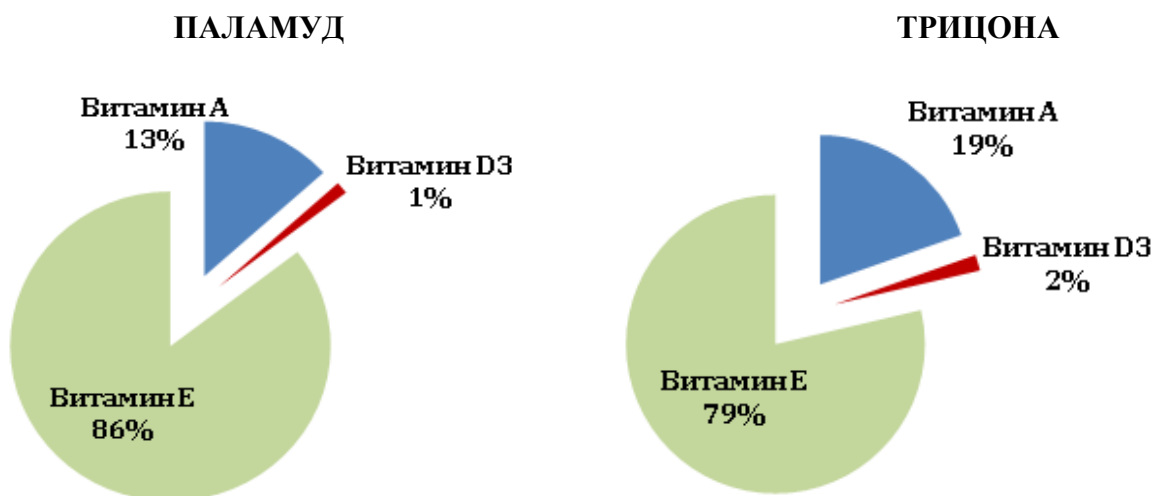
В сравнение с витамини А и Е, данните за витамин D₃ показват различно разпределение при сладководните и черноморски риби. Количествата на витамин D₃ в черноморските риби ($2,5 \div 46,5 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) варират в много по-широки граници, отколкото тези за сладководните ($1,1 \div 13,9 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$). При извършеното сезонно проследяване и при двете групи риби бяха установени значими разлики между двата сезона, но зависимост между количество на анализа и сезона на улов не бе открита. С най-високо количество на витамин D₃ се характеризира свежата ядивна тъкан на черноморските сафрид ($29,9 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) и карагъоз ($21,1 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) и на сладководните балканска пъстърва ($11,7 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$) и амур ($10,9 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ ww}$).

3. ПРОЦЕНТНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ВИТАМИНИ А, D₃ И Е В ЛИПИДИ НА ЧЕРНОМОРСКИ И СЛАДКОВОДНИ РИБИ

Резултатите на витамини А, D₃ и Е, отнесени за липидно тегло, са използвани за оценка на потенциала на рибните липиди, като източник на тези витамини.

Всеки анализиран рибен вид се характеризира с различно съдържание на общи липиди, различни количества на ненаситени мастни киселини в тях, а също и различно витаминно съдържание. Данните за съдържанието на витамини А, D₃ и Е, като процент на витамина в 1 грам общи липиди, могат да характеризират отделния рибен вид. При всички анализирани риби с най-високо процентно съдържание в общите им липиди се представя витамин Е – достига до над 99% при някои черноморски и сладководни видове. Най-високото процентно разпределение на витамин А е 19%, докато това на витамин D₃ при никоя риба не надвишава 3% от общите липиди. Според тези данни, проучените рибни видове могат да се разделят в няколко групи:

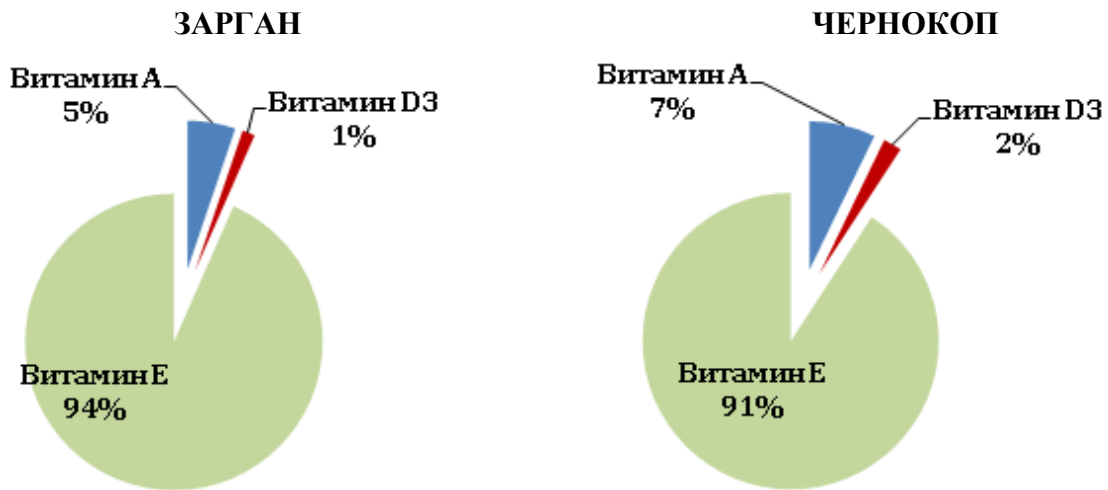
- Риби със съдържание на витамин Е до 90% - това са паламуд и трициона:



Две от анализираните черноморски риби се характеризират с най-ниско процентно съдържание на витамин Е в липидите им. При тях се забелязва значително по-високото съдържание на витамин А (съответно 13% и 19%), спрямо другите черноморски и сладководни риби.

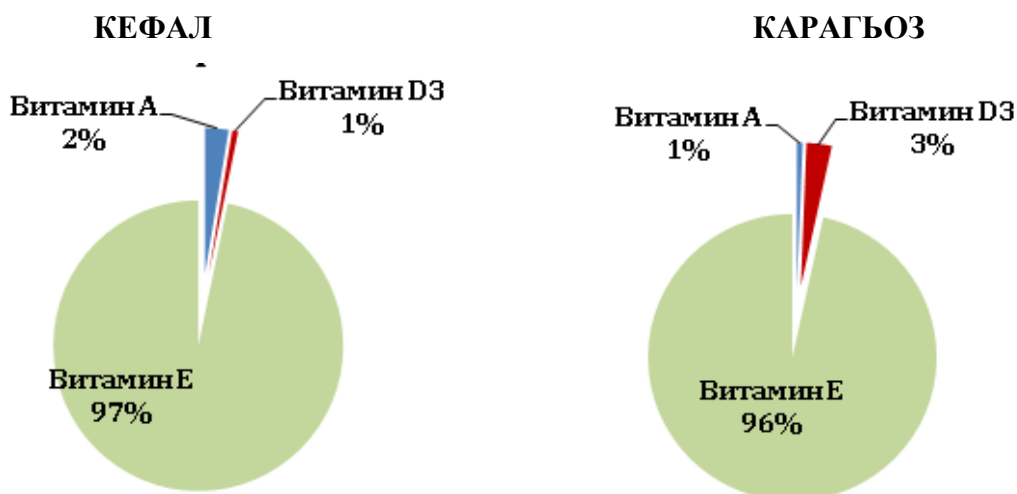
- Риби със съдържание на витамин Е от 90 до 94% са зарган и чернокоп.

Наблюдаваното процентно разпределение на трите мастноразтворими витамини при двете морски риби е близко.

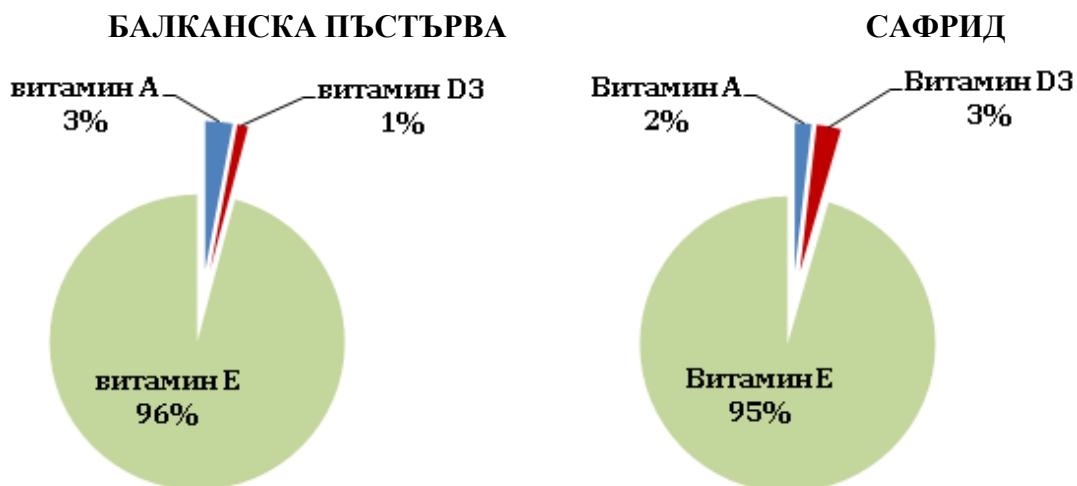


Забелязва се, че с повишаване процента на витамин Е се понижава този на витамин А (в по-голяма степен), докато витамин D₃ се запазва почти непроменен в сравнение с рибите паламуд и трикона.

- Риби със съдържание на витамин Е между 95 и 97% са черноморските кефал, карагъоз и сафрид и сладководната балканска пъстърва

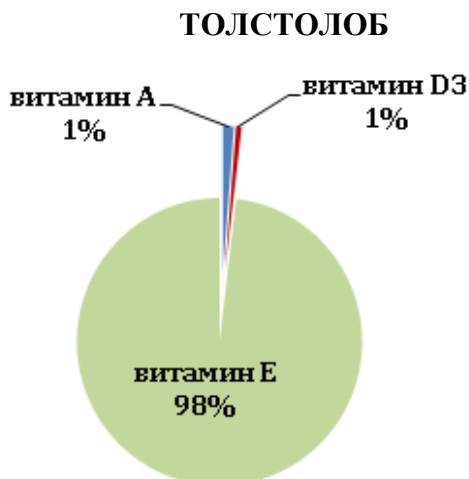


При четирите изброени рибни видове ясно се забелязва, че повишението на процентното съдържание на витамин Е в липидите не води до равномерно понижение на другите два мастноразтворими витамина. При кефал и пъстърва се променя единствено процента на витамин А, докато при карагъоз и сафрид наблюдаваме леко повишение в процента на витамин D₃.



Този факт потвърждава изводите в настоящата работа и в прегледаната литература, че съдържанието на мастноразтворими витамини в различните риби е строго видовоспецифично.

- Риби със съдържание на витамин Е 98% са черноморските кая и барбуна и сладководните толстолоб, амур и шаран



Пет от всички анализирани рибни видове се характеризират с 98%-но съдържание на витамин Е, като останалите два процента от общите липиди на всеки от петте рибни вида са поделени от другите два мастноразтворими витамина – витамин А и витамин D₃.

При всички останали изследвани риби процентното съдържание на витамин Е в липидите е над 99%. Частта, която съставляват общо витамин А и витамин D₃ не достига 1% от общите липиди.

От представените данни за процентното разпределение на трите мастноразтворими витамина в общите липиди на анализираните риби, се потвърждават извода от прегледаната литература за индивидуалността на всеки рибен вид.

4. ПРОМЕНИ В СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВИТАМИНИ А, D₃ И Е СЛЕД ТЕРМИЧНА ОБРАБОТКА НА ЯДИВНА РИБНА ТЪКАН

В болшинството случай преди консумация рибата се подлага на обработка чрез варене, обработка на пара, печене на скара, печене на фурна, микровълнова обработка, пържене, опушване, сушене и др. Топлинната обработка на храните се използва, за да се засили ароматът и вкусът им, да се инактивират патогенни микроорганизми, да се увеличи срока на годност на хранителните продукти и да се подобри външния вид на храната [Vognar, 1998; Beyza Ersoy, 2009]. Съдържанието на мастноразтворимите витамини, като незаменими компоненти на храната, е важно да се проследи при различните видове термична обработка.

В литературата данните за влиянието на топлинната обработка на храната върху съдържанието и промените в мастноразтворимите витамини са много оскъдни. В някои изследвания се установява, че витамини А и Е, търпят големи загуби по време на приготвяне на храната [Bennink, 1982; Kumar & Aalbersberg, 2006; Leskova, 2006; Ogbonnaya, 2009].

С оглед изясняване на промените, настъпващи с трите изследвани мастноразтворими витамини при топлинна обработка на ядивната рибна тъкан, е изследвано влиянието на различни методи на термично обработване на рибни филета. Настъпващите промени с изследваните анализи са проследени в ядивна тъкан с кожа на три черноморски рибни вида - чернокоп, сафрид и карагъоз и една сладководна риба - дъгова пъстърва. Температурната обработка е извършена по начини, традиционно използвани в Българската кухня:

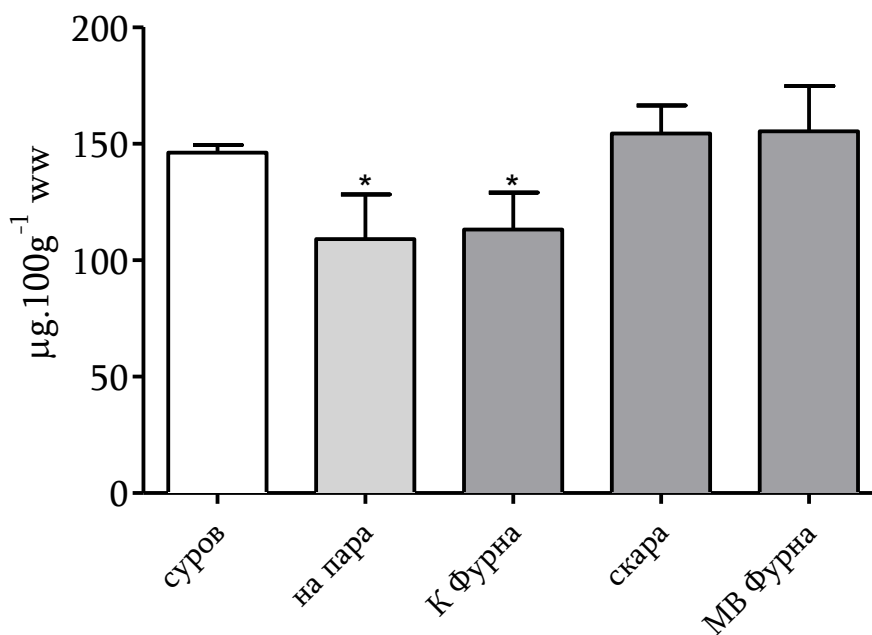
- **обработка на пара** - при $80 \pm 10^\circ \text{C}$ (за 8-10 min);
- **пържене в слънчогледовото масло** при $150 \pm 10^\circ \text{C}$ (за 8-15 min);
- **печене на скара** при $\sim 240 \pm 10^\circ \text{C}$ (за 15 до 20 min);
- **печене във фурна** при $180-250^\circ \text{C}$ (за 25 до 35 min);
- **обработка в микровълнова фурна** при $\sim 800 \text{ W}$ (за 10 до 25 min) [Vognar, 1998; Beyza Ersoy, 2009].

След обработката, филетираната рибната тъкан, заедно с кожата, е хомогенизирана с домакински пасатор в продължение на 3 min, при 3000 оборота. Пригответената средна проба от термично обработена ядивна рибна тъкан е използвана за провеждане на количествен анализ за съдържание на витамини А, D₃ и Е.

4.1. Влияние на различните видове термична обработка върху съдържанието на витамини А, D₃ и Е в ядивна рибна тъкан на чернокоп

Ефектът на различни видове термична обработка върху съдържанието на витамини А, Е и D₃ е проследен в ядивна рибна тъкан на чернокоп. Избрани са, характерни за приготвянето на тази риба, традиционни термични техники – печене на скара, печене в конвекторна фурна (КФ), печене в микровълнова фурна (МВФ) и обработка на пара. Получените данни показват, че различните видове на термична обработка на рибната тъкан, повлияват по различен начин съдържанието на трите мастноразтворими витамини (фиг. 17, 18 и 19). Единствено съдържанието на витамин D₃ при всеки от методите на термична обработка се понижава в сравнение със суровата проба.

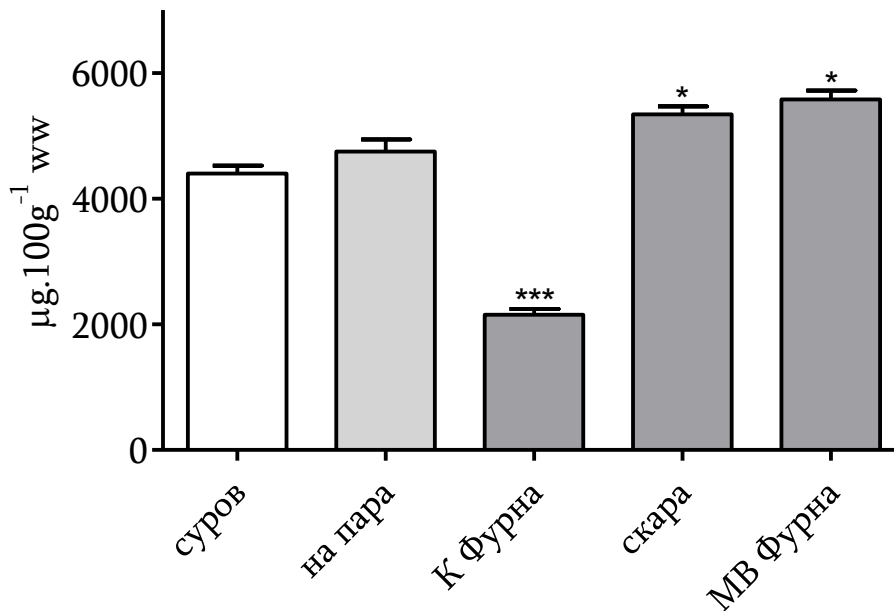
На фигура 17 са сравнени количествата на витамин А, установени в сурова и термично обработената ядивна рибна тъкан на чернокоп. Установява се статистически значимо понижение (* $p < 0.05$) в нивото на витамин А след обработка на пара и печене в КФ, спрямо това в суровата проба. Загубите от анализа, в резултат на всеки от тези два типа термична обработка възлизат на 25%.



Фигура 17 Съдържание на витамин А в термично обработена ядивна тъкан на чернокоп (* $p < 0.05$ обработена спрямо сурова тъкан)

За разлика от тези методи, печенето на скара и в МВФ не повлиява нивата на витамин А в рибната тъкан - 146,2 µg.100 g⁻¹ ww в сурово състояние, спрямо 154,4 µg.100 g⁻¹ ww за скара и 155,3 µg.100 g⁻¹ ww за МВФ ($p > 0.05$).

Влиянието на тези видове термична обработка на ядивна тъкан на чернокоп е проследено и по отношение нивата на витамин Е (фигура 18). Най-значимо понижение в количествата на витамин Е (с 50%) в термично обработената спрямо суровата рибната тъкан е установено при печене в КФ (фиг. 18).



Фигура 18 Съдържание на **витамин Е** в термично обработена ядивна тъкан на чернокоп (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$ обработена спрямо сурова тъкан)

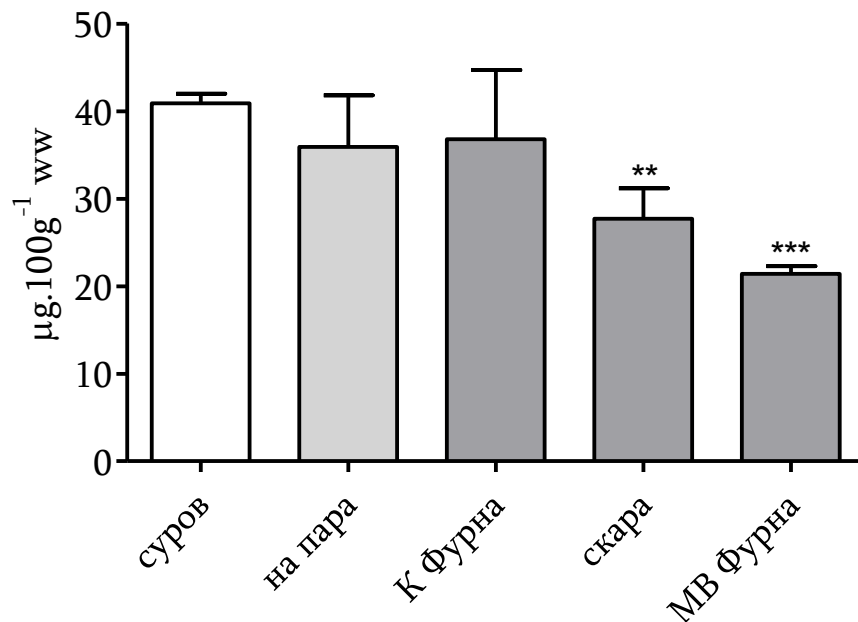
При другите видове термична обработка не се откриват статистически значими разлики спрямо суровата тъкан ($p > 0,05$). Забелязва се, че нивата на витамин Е в пробите при печене на скара и в МВФ търпят статистически значимо повишение, което вероятно се дължи на намаленото влагосъдържание на пробите след обработката и подобряване степента на хидролиза на обработената тъкан.

Изследване на влиянието на различни температурни методи (печене на скара, в МВФ, в КФ и пържене) върху промените на нивата на витамин А и витамин Е в ядивна тъкан на африкански сом са провели Ersoy и сътрудници [Ersoy B. and A. Özeren, 2009]. Те установяват значими разлики в съдържанието и на двата анализата при всички термични обработки. Най-слабо е понижение на витамин А те са отчетли след печене в МВФ (10%), а най-силно след печене в КФ (36%). Същите автори установяват съществени промени и в съдържанието на витамин Е. Представените данни сочат, че и върху неговото количество най-силно влияе печенето в КФ – нивата на витамин Е неколкократно се повишават (4,5 пъти). При другите два метода на обработка промените също са големи – при печене на скара се наблюдава повишение с 73%, а при печене в МВФ - повишение с 53%. При сравнение с нашите резултати

може да се каже, че установените от тях промени, спрямо сурова тъкан, са много по-големи от тези наблюдавани при нашето изследване (скара + 17%, МВФ + 21%, КФ понижение - 50%) (фиг. 36).

Изменението в съдържанието на витамин D₃ при различните термични обработки в ядивна тъкан на чернокоп е показано на фигура 19.

Статистически значимо намаление в нивата на витамин D₃ на обработените проби спрямо необработените се установява при печене на скара – 32% (p<0.01) и печене в МВФ – с 47% (p<0.001) (фиг. 19). При останалите термични обработки различията са статистически незначими (p > 0,05). Температурното влияние върху нивата на витамин D₃ се проявява в много малка степен, отколкото при другите два витамина. Отчетените понижения са: – при обработка на пара с 12%, а при печене в КФ с 10% (фиг. 19).



Фигура 19 Съдържание на витамин D₃ в термично обработена ядивна тъкан на чернокоп (** p<0.01, *** p<0.001 обработена спрямо сурова тъкан)

Малко са литературните данни за промяната в съдържанието на витамин D₃ в рибна тъкан след различни температурни методи на обработка. Влиянието на печене в КФ върху съдържанието на витамин D₃ в ядивна тъкан на дъгова пъстърва и балтийска херинга е проучено от Mattila и колектив [Mattila et al. 1999]. Представените от тях данни потвърждават тези получени в нашето изследване. Авторите установяват слабо понижение (до 10%) на количеството на витамин D₃ след термичната обработка на ядивната рибна тъкан.

4.2. Влияние на обработка на пара върху съдържанието на витамини А, D₃ и Е в ядивна рибна тъкан

Този тип термична обработка е използван при ядивна тъкан на четири рибни вида – черноморски чернокоп, карагъоз и сафрид и сладководна дъгова пъстърва.

За всички изследвани рибни видове е установено статистически значимо понижение в количеството на витамин А в обработената рибна тъкан, в сравнение със суровата - $p < 0,05$ при чернокоп, - $p < 0,01$ при карагъоз и $p < 0,001$ при сафрид и дъгова пъстърва. Установените загуби на витамин А са най-големи при сафрид (51%) и дъгова пъстърва (54%), следвани от карагъоз (36%) и чернокоп (25%).

Таблица 5 Процентна промяна в съдържание на витамини А, D₃ и Е след обработка на пара на изследваните рибни видове

Рибен вид	Витамин А	Витамин Е	Витамин D ₃
Чернокоп	- 25%	+ 8%	- 12%
Сафрид	- 51%	+ 84%	+ 18%
Карагъоз	- 36%	- 2%	- 12%
Пъстърва	- 54%	- 33%	- 23%

При чернокоп, сафрид и дъгова пъстърва установените разлики в съдържанието на витамин Е, преди и след обработката, са статистически значими ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Изключение прави карагъозът, при който витаминното съдържание не се променя ($p > 0,05$) в резултат на обработката на пара. Загубата на витамин Е, установена в ядивна тъкан на пъстърва и чернокоп възлиза съответно на 33% и 7%. При сафрид се установява повишаване на съдържанието на витамин Е след термичната обработка с 45%.

При анализа на витамин D₃ в различните рибни видове се отчита различен ефект на влияние. Подобно на другите два витамина и тук се наблюдава понижение на количеството на анализа в ядивните тъкани на чернокоп, карагъоз и пъстърва, като изключение прави отново сафрид. Статистически значимо понижение (с 22%) в съдържанието на витамин D₃ е установено в ядивна тъкан на дъгова пъстърва. При чернокоп и карагъоз понижението в съдържанието на обработената в сравнение със суровата тъкан е съответно 7% и 12%, като разликите са статистически незначими ($p > 0,05$).

От резултатите за съдържанието на витамин D₃ се забелязва, че установените разликите в промените му при различни видове термична обработка, в различните риби, е съизмеримо като стойности по между им. При всички рибни видове обработката на пара показва значителна устойчивост на витамин D₃, за разлика от другите два - витамин А и Е (табл. 28).

ПРИ ОБОБЩЕНИЕТО на данните от извършените анализи може да се каже, че влиянието на различните видове термични обработки повлияват по различен начин и в различна степен съдържанието на витамини А, D₃ и Е.

От друга страна, влиянието на един и същ метод за обработка, има различен ефект при различните рибни видове – т.е. се предполага, че зависимостта е тъканно- и видово-специфична.

Върху съдържанието на витамин А най-силно негативно влияние има обработката на пара. За витамин Е – печене в КФ. За разлика от тях витамин D₃ е най-устойчив на различните изследвани температурни методи на обработка на рибата.

5. ПРОМЕНИ В СЪДЪРЖАНИЕТО НА ВИТАМИНИ А, D₃ И Е ПРИ СЪХРАНЕНИЕ ВЪВ ФРИЗЕР НА ЯДИВНА РИБНА ТЪКАН

Промени във витаминното съдържание се наблюдават, освен при високотемпературна обработка на рибата, така и при продължително съхранение при ниска температура. Изследването ефекта на продължителното съхранение във фризер, върху витаминното съдържание на рибните тъкани е важно по отношение хранителната стойност на рибата след съхранение в замразено състояние. Изключително оскъдни са данните в проучената литература по този въпрос.

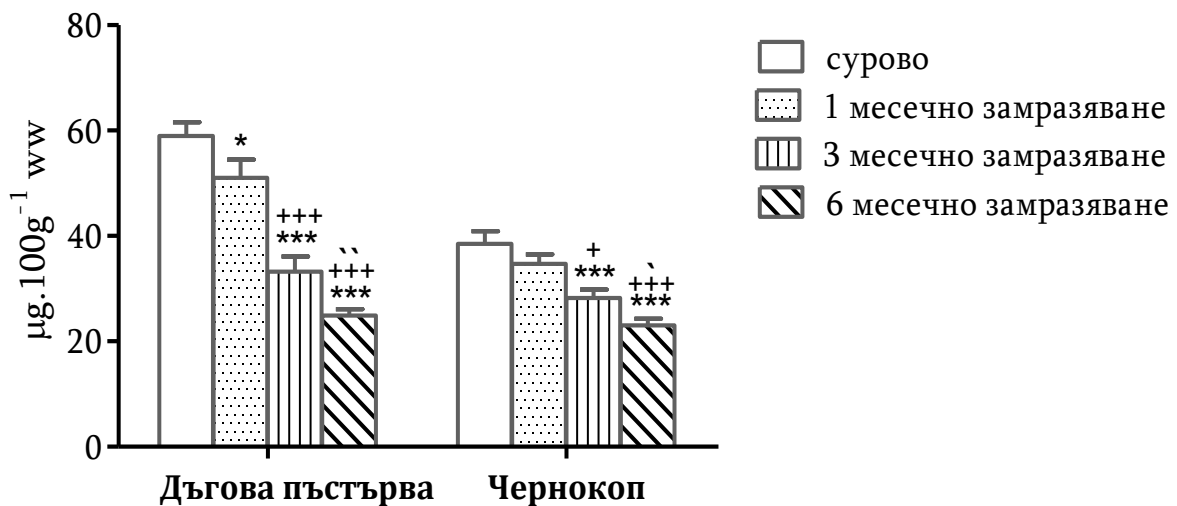
S. Aubourg и колектив изследват влиянието на съхранението при замразяване на ядивна тъкан на сафрид при -20°C, върху съдържанието на витамин Е. Те установяват, че загубите на α-токоферол в пробите се влияят, както от продължителността на съхранение, така и от температурата при която е проведено замразяването (-20°C и -80°C). По-значимо намаляване в количеството на витамин Е е установено във филетираните проби, сравнено с тези съхранявани в цялостно състояние (с 5% и 15%). Авторите установяват, че при съхранение над 3 месеца се наблюдава значително понижаване съдържанието на витамин Е в рибната тъкан (над 50%) [Aubourg S. et al., 2004].

Проследено е влиянието на продължителността на съхранение в битов фризер (-20 °C ± 2°C) върху съдържанието на витамини А, D₃ и Е в ядивна рибна тъкан. Проучването е

проведено в ядивна тъкан от черноморски и сладководни рибни видове – чернокоп и дъгова пъстърва.

Избраните периоди на съхранение на пробите във фризерната част на домашен хладилник са: един, три и шест месеца. Промените, настъпили в резултат на продължителността на съхранение на пробите, са установени при сравняване количествата на анализите в първата група рибни проби с това на останалите групи (фиг. 20, 21 и 22).

Установено е, че свежата ядивна рибна тъкан на дъгова пъстърва и чернокоп са с близко съдържание на витамин А (съответно 58.9 ± 2.6 и $38.5 \pm 2.4 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$) и витамин D₃ (14.9 ± 1.1 и $11.2 \pm 1.2 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$, съответно). За разлика от тях, съдържанието на витамин Е във филета от пъстърва ($1648.9 \pm 68.8 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$), е четири пъти по-високо от това в ядивната тъкан на чернокоп ($427,1 \pm 37.1 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}\text{ww}$).

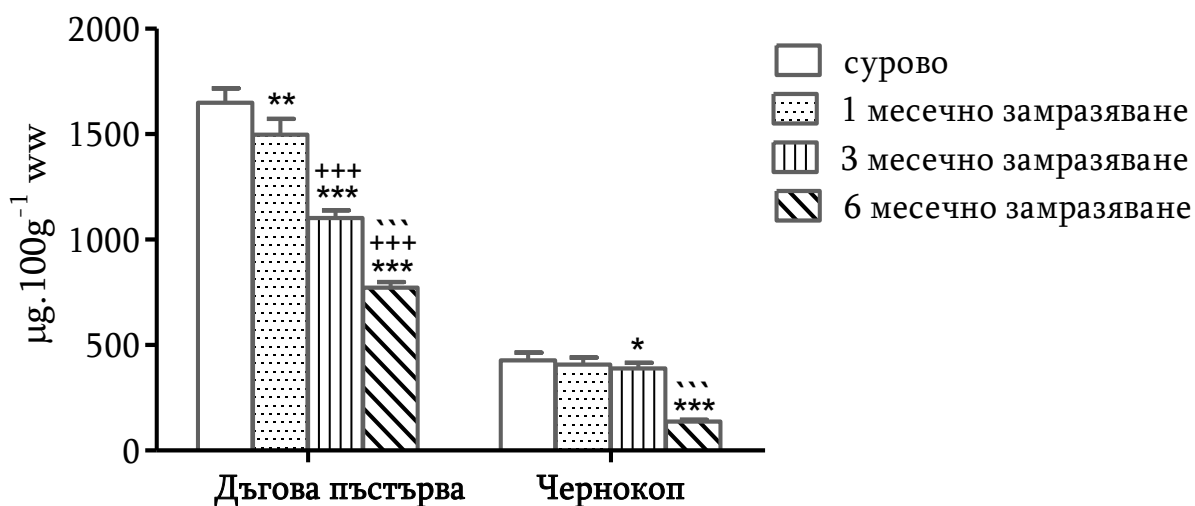


Фигура 20 Съдържание на витамини А при съхранение на ядивна рибна тъкан на пъстърва и чернокоп при -20°C (***) $p < 0.001$ при сравнение на сурова и след 3 месеца; + $p < 0,05$ при сравнение на след 3 със след 6 месеца)

На фигура 20 са представени промените в съдържанието на витамин А, в зависимост от продължителността на замразяване на ядивната тъкан от чернокоп и дъгова пъстърва. И при двата рибни вида се наблюдава статистически значимо понижение на съдържанието на ретинол с увеличаване продължителността на замразяване на рибната тъкан. По-големи загуби са отчетени в рибната тъкан на дъговата пъстърва. След едномесечно съхранение при -20°C , понижението на витамин А е с 13% ($p < 0,05$), след тримесечно съхранение с 43% ($p < 0,001$), а след шестмесечно с 58% ($p < 0,001$). При чернокоп, едномесечното замразяване води до понижаване на нивата на витамина с 10 %, а три- и шестмесечното – съответно с 26% и 40%.

Най-голямо е намалението в съдържанието на витамин А след 6 месечно замразяване и при двата вида рибни тъкан – 58% при дъгова пъстърва и 40% при чернокоп.

Подобно време-зависимо понижение се наблюдава и при съдържанието на витамин Е в изследваните рибни тъкани (фиг. 21).

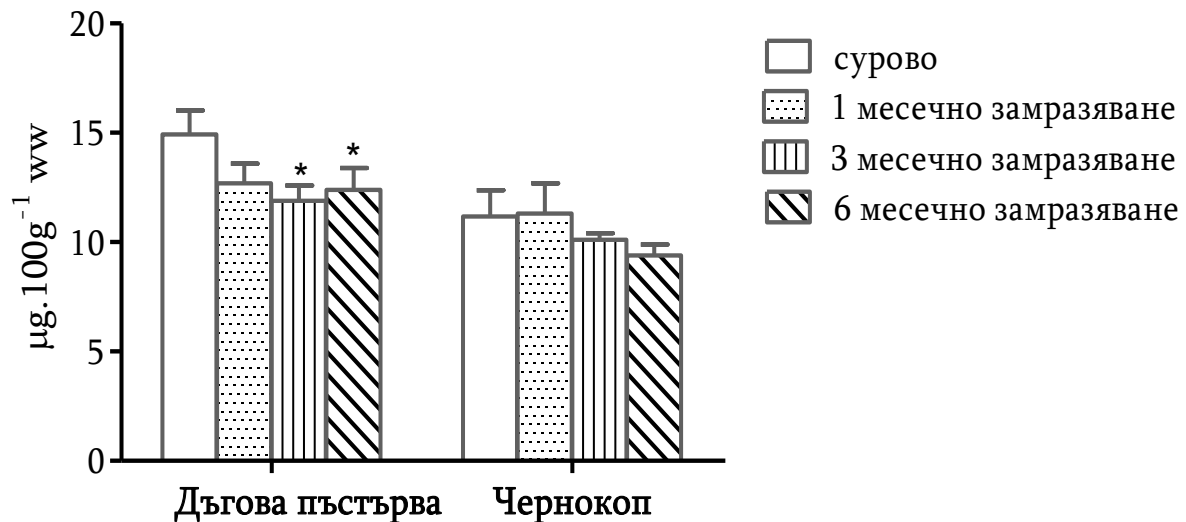


Фигура 21 Съдържание на витамин Е в зависимост от продължителността на съхранение на ядивна рибна тъкан на дъгова пъстърва и чернокоп (***) $p < 0.001$ при сравнение на сурова и след 3 месеца; * $p < 0.05$ при сравнение на сурова и след 6 месеца; +++ $p < 0,001$ при сравнение на след 3 със след 6 месеца)

По-отчетливи са промените в съдържанието на витамин Е в ядивната тъкан на пъстърва (фиг. 21). След едномесечен период на съхранение загубите на витамина са 9% ($p < 0,05$) за дъгова пъстърва и 5% за чернокоп ($p > 0,05$). Тези стойности значително се повишават след третия (33% и 9%, съответно; $p < 0.05$) и след шестия месец на замразяване (53% и 67%, съответно; $p < 0.05$).

Възможно обяснение за установените промени в съдържанието на витамин А и витамин Е в рибната тъкан при продължително замразяване е високото съдържание на пероксиди в замразената рибна тъкан, които са стабилни при ниски температури. Поради високия си окислителен потенциал те могат да окислят въглеводородните вериги на мастноразтворимите витамини в рибната тъкан [FAO, 1992]. Структурата на мастноразтворимите витамини съдържа система от спрегнати двойни връзки, които са податливи на окисление и могат да инициират верижан процес на последващо автоокисление.

За разлика от наблюдаваните ефекти върху съдържанието на витамини А и Е, промените в съдържанието на витамин D₃ в рибната тъкан при замразяване за един, три и шест месеца при -20°C, са по-слабо изразени (фигура 22).



Фигура 22 Съдържание на витамин D₃ в рибна тъкан на дъгова пъстърва и чернокоп в зависимост от продължителността на съхранение при -20°C (* p<0.05 сурова спрямо 6 мес. замр.; +++ p<0,001 3 мес. замр. спрямо 6 мес. замр.)

Резултатите показват статистически значимо понижение в нивата на витамин D₃ за третия и шестия месец от замразяването на рибната тъкан на дъгова пъстърва с 20% и 17%, съответно. При чернокоп за целия изследван период промените са статистически незначими (p>0,05). По отчетливо понижение в нивата на витамин D₃ се установява след третия (10%) и след шестия (16%) месец. Като цяло изчислените загуби са ниски по стойност и съпоставими при двата рибни вида. Установено е еднакво понижение (16% и 17%) в нивата на витамин D₃ в рибната тъкан на двата изследвани вида след 6 месечно съхранение.

В ОБОБЩЕНИЕ, резултатите от проведеното изследване ясно показват, че съдържанието на витамини А, Е и D₃ в ядивна рибна тъкан на дъгова пъстърва и чернокоп намалява при продължително замразяване в домашен фризер. Най-значимо е намалението на витамин А и витамин Е (p<0.001), съответно с 40% и 67% след шестмесечно съхранение на тъкан от чернокоп при температура -20°C. При двата изследвани рибни вида нивата на витамин D₃ се променят в най-малка степен.

Получените резултати за промените на витаминното съдържание в зависимост от продължителното съхранение на рибите, са близки до наблюдаваното отнасяне след различните методи на термична обработка. И тук продължителното съхранение при -20°C в домашен фризер повлиява в най-ниска степен съдържанието на витамин D₃.

6. ОЦЕНКА ЗА СЪДЪРЖАНИЕ НА ВИТАМИНИ А, D₃ и Е В ЧЕРНОМОРСКИ И СЛАДКОВОДНИ РИБИ И ПРЕПОРЪЧИТЕЛЕН ДНЕВЕН ПРИЕМ

Рибата се счита за една от храните, доставящи значително количество от витамин D₃ и по-малки от витамин А и витамин Е. Оценката на съдържанието на тези витамини в традиционно консумирани в България черноморски и сладководни рибни видове, би било полезно във връзка с изработване на препоръки за здравословно хранене на населението.

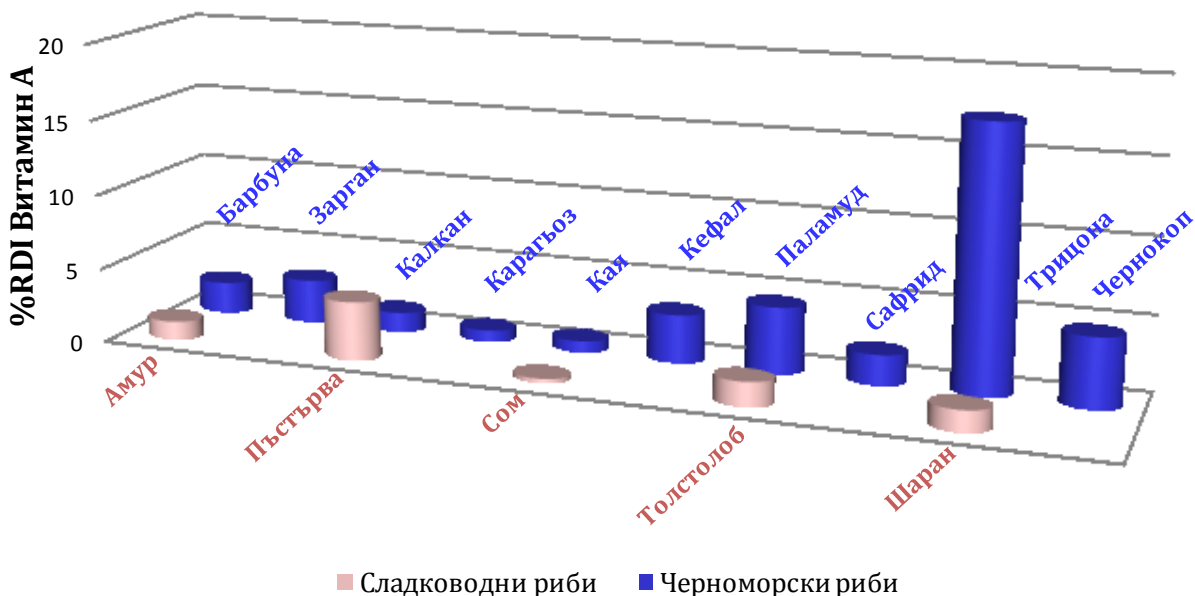
Предмет на проучванията на Световната Здравна Организация (СЗО) е изготвянето на препоръки за ежедневен прием в достатъчни и безопасни, количества на важни нутриенти, в това число и витамини А, D₃ и Е [FAO, 2001; WHO, 2004; FNIC, 2013]. Това количество се дефинира като „препоръчителен дневен прием“ (ПДП) от съответния витамин (relative daily intake – RDI). Подобни препоръки са в сила за различните държави и са изготвени от съответни правителствени здравни организации. Количествата включени в тях са базирани на традиционния хранителен режим, рисковите фактори и здравния статус на населението на съответната държава. Министерството на здравеопазването в България е изготвило и публикувало тези препоръки в „Наредба № 23 от 19 юли 2005г. за физиологичните норми за хранене на населението“ [Наредба №23/19.07.2005 г.]. В табличен вариант е посочено съответното количество от нутриента, което е препоръчително да се приема от дадена група индивиди, разделени по възраст и пол.

Оценката на черноморски и сладководни риби като източник на витамини А, D₃ и Е в ядивната тъкан на анализирани е извършена въз основа на сравняване на определените от нас количества на анализа със съответния препоръчителен дневен прием за България. Сравнението е извършено по отношение на препоръчаните дневни количества за индивиди от възрастова група до 65 години [Наредба №23/19.07.2005 г.]. Количества за трите витамина, спрямо които са извършени изчисленията, са съответно – 750 µg/дневно витамин А (осреднено от 700 µg/дневно за жени и 800 µg/дневно за мъже, 5 µg/дневно витамин D₃ и 15 mg/дневно витамин Е.

Получените резултати показват, че в ядивната тъкан на всички анализирани рибни видове, с най-висок процент от RDI е витамин D₃ – от 60% до 826 %. Тези стойности за витамини А и Е са значително по-ниски и са в граници – 0,25÷17,3% RDI и 2,6÷22% RDI, съответно.

6.1. Оценка на съдържанието на витамини А в ядивна тъкан на черноморски и сладководни рибни видове

Резултатите относно съдържанието на витамин А като процент от RDI при изследваните черноморски риби е в граници от 0,74 % RDI до 17,3 % RDI, докато при сладководните този интервал е от 1,2 % RDI до 7,9 % RDI. На фигура 23 е представено сравнение на процентното разпределение между двете групи риби и между видовете в отделните групи. Съпоставени са десетте анализирани черноморски вида (с имена под абсцисата) и петте сладководни вида (с имена над абсцисата). Видно е, че 100 g ядивна тъкан от трицона осигуряват най-голямо количество витамин А. Резултатите за останалите видове са с повече от три пъти по-ниски. Между 2 и 5 % от RDI се осигуряват със 100 g чернокоп, паламуд, кефал, зарган, барбуна и сафрид, а калкан, кая и карагъоз показват стойности около 1%.



Фигура 23 Сравнение на процента от RDI на витамин А в черноморски и сладководни риби

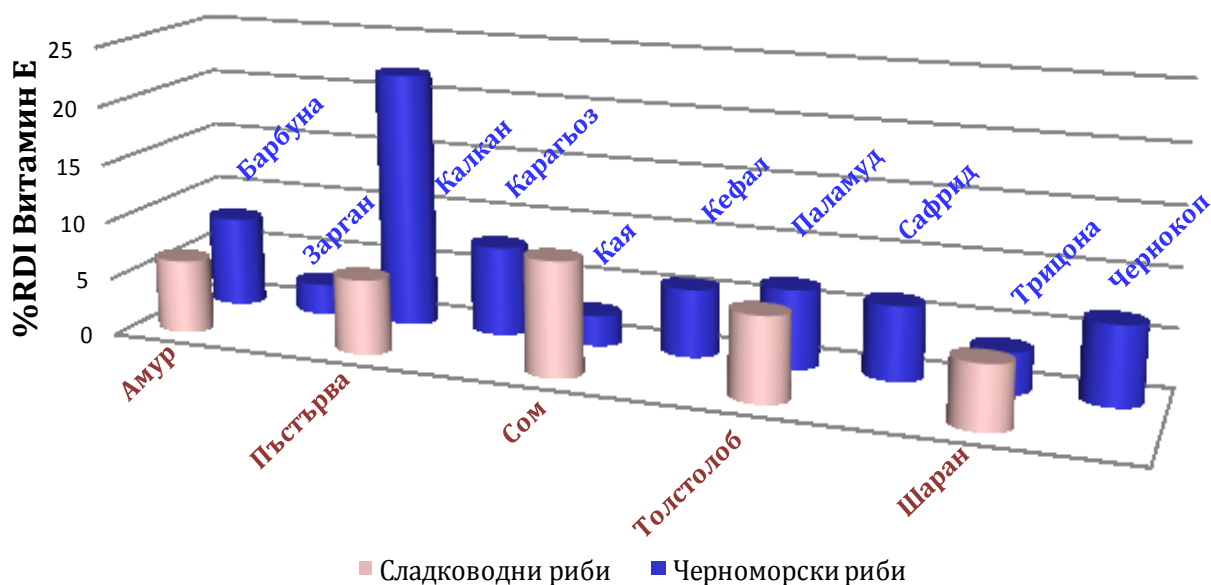
Резултатите от изследваното съдържание на витамин А в сладководни риби показват по-ниско процентно съдържание от RDI (фиг. 23). Най-големи количества ретинол сред анализираните видове се осигуряват със 100g пъстърва (3,9% RDI), а най-ниски от 100g сом (0,25% RDI). Порция от 100g толстолоб, шаран и амур предоставя наполовина по-ниско, от това при пъстърва, количество витамин А като процент от RDI (между 1,5 и 2% RDI).

От представените на фигура 23 данни се вижда, че 100g от почти всички изследвани черноморски и сладководни рибни видове осигуряват близки количества витамин А като процент от RDI (0,25÷4,6% RDI), като единствено изключение прави трицоната с 17,3% RDI.

6.2. Оценка на съдържанието на витамин Е в ядивна тъкан на черноморски и сладководни рибни видове

Съдържанието на витамин Е като процент от RDI в анализирани морски и сладководни видове е представено на фигура 24. Резултатите за изследваните черноморски рибни видове обхващат в граници от 2,6 % RDI до 22 % RDI. Най-големи количества витамин Е се осигуряват от 100g ядивна тъкан на калкан, а най-ниски от същото количество филе на кая и зарган. Рибите чернокоп (6,7 % RDI), кефал (5,8 % RDI) и барбуна (7,8 % RDI) показват средно за интервала процентно съдържание на витамин Е (фиг. 24), което беше наблюдавано и при резултатите за витамин А при тези риби (фиг. 23). При повечето черноморски рибни видове % RDI на витамин Е надвишава 5%, като при калкана е четирикратно по-висок (фиг. 45). Освен кая и зарган, друга риба с много ниско процентно съдържание от RDI витамин Е е триционата (3,5 % RDI).

Съдържанието на витамин Е като % от RDI за групата на сладководните риби е в интервала от 5,4 до 9,8 % RDI (фиг. 24). Най-голямо количество от този анализ осигурява 100 g ядивна тъкан на сом (9,8 % RDI). Впечатление прави много близкия процент RDI, който предоставя порция от останалите сладководни риби – около 6% RDI.

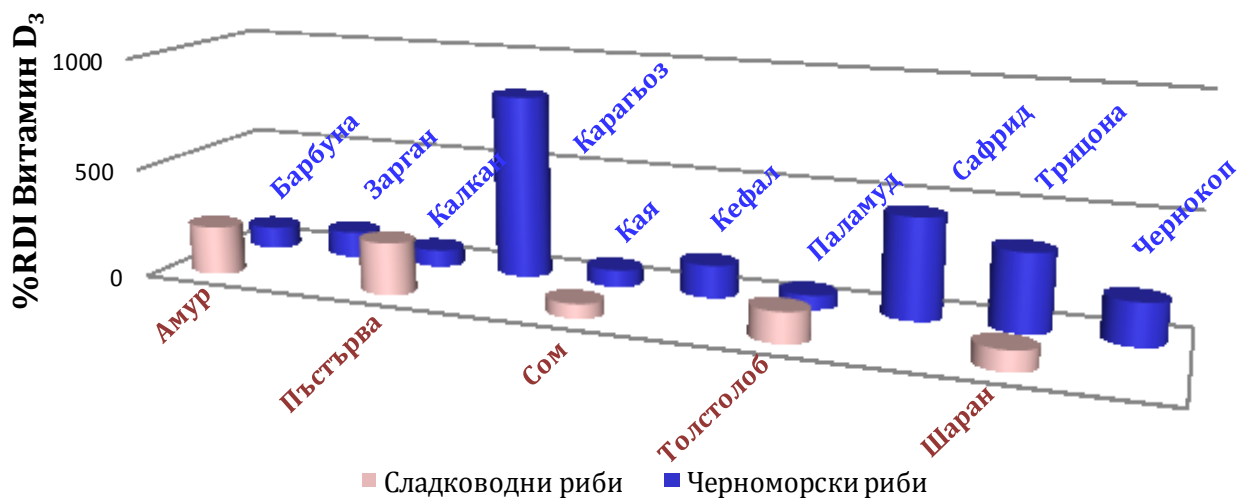


Фигура 24 Сравнение на процента от RDI на витамин Е в черноморски и сладководни риби

От сравнените на фигура 24 резултати може да се заключи, че порция от 100 g от всички анализирани сладководни риби, както и шест от черноморските (калкан, барбуна, карагъоз, чернокоп, сафрид и кефал) осигуряват над 5% от RDI за витамин Е. С изключение на калкан двете групи риби се характеризират с близко съдържание на този анализ.

6.3. Оценка на съдържанието на витамини D₃ в ядивна тъкан на черноморски и сладководни рибни видове

Съдържанието на витамин D₃ като процент от RDI за 100 g ядивна тъкан на изследваните черноморски и сладководни риби е представено на фигура 25. Стойностите са значително по-високи от тези наблюдавани за витамини А и Е. Всички изследвани рибни видове осигуряват над 60% от препоръчителния дневен прием на витамин D₃ за България. В границите от 60 до 100 % RDI попадат четири от черноморските рибни видове - барбуна, калкан, кая и паламуд (фиг. 25).



Фигура 25 Сравнение на процента от RDI на витамин D₃ в черноморски и сладководни риби

Порция от 100 g ядивна тъкан на останалите шест анализирани черноморски риби осигурява витамин D₃ в граници от 116 до 826 %RDI (фиг. 25). Най-високо е процентното съдържание, установено в ядивна тъкан на карагъоз - то осемкратно надвишава RDI за витамин D₃ при възрастни индивиди. По-ниско от това при карагъоза, но също много висок процент от RDI витамин D₃, осигуряват 100 g сафрид (448 %RDI), следван от трицона (344 %RDI).

На фигура 25 са представени и данните за % RDI витамин D₃ изчислен за сладководни рибни видове. Тук процентното разпределение на витамина е в интервал от 62 до 234 %RDI. Най-висока е изчислената стойност за 100 g ядивна тъкан на пъстърва (фиг. 25). Близко до това процентно разпределение е количеството, осигурено от амур (218 %RDI), последвано от това при толстолоб (134 %RDI). Порция от 100 g рибно филе от трите сладководни вида осигурява значително над необходимото дневно количество витамин D₃ за възрастни индивиди в България. Другите два рибни вида – шаран и сом, за 100 g ядивна тъкан се характеризират със значително по-ниски количества - съответно 88 %RDI и 62 %RDI.

ОБОБЩЕНИЕТО на представените данни показва, че изследваните черноморски и сладководни рибни видове осигуряват близки до 5% от RDI количества на витамини А и Е. Като естествен източник на тези тези два микронутриента могат да се използват също и други храни. Затова рибата може да се използва като допълнение към определен хранителен режим.

Много малък брой растителни храни са източници на витамин D₂. От животинските храни рибата се счита за един от най-богатите източници. Последното е доказано с направените в настоящата работа изследвания. Сред анализираниите черноморски и сладководни риби две трети от всички тях предоставят над 100% RDI витамин D₃ за България.

СЗО и Българският здравен съюз представят своите препоръки за дневен прием на мастноразтворими витамини в табличен вариант по възрастови групи. Посочените количества за повечето групи се различават съществено едни от други. Тези разлики пораждат необходимост за познаване процентното съдържание от препоръчителния дневен прием за конкретен витамин, предоставяно от ядивната тъкан на традиционно консумирани рибни видове. Препоръчаните количества за витамини А, Е и D₃ за България са постановени в наредба от 2005 г. Нормите посочени от Световната здравна организация за трите витамина са: за витамин А – WHO, 2001 г., за витамин Е – WHO, 2000 г. и за витамин D₃ – IOM (Catharine Ross 2011 г.). Последната е осъвременена поради епидемиологичния характер на разпространение на витамин D дефицита при индивиди от държави в Европейския съюз.

Поради тези факти е изчислено процентното съдържание от RDI на трите мастноразтворими витамина, което се предоставя от 100g свежа ядивна тъкан на всяка от изследваните черноморски и сладководни риби. Получените резултати са представени в табличен вариант по образец на БЗС. В тях са сравнени данните за % RDI за съответния витамин, изчислени по препоръките за България и СЗО (табл. 6 и 7).

В таблици 6 и 7 е представена детайлна информация по възрастови групи, относно %RDI за витамини А, Е и D₃ в ядивна тъкан на едни от най-широко консумираните в България рибни видове – трициона и пъстърва.

Преизчислените спрямо RDI и представени в посочените таблици данни, могат да бъдат използвани за:

- популяризиране сред населението на държавата ни на информацията за витаминното съдържание на традиционно консумирани в България морски и сладководни риби;
- табличните данни могат да са полезни при изготвянето на различни хранителни режими, в които съществена част са рибата и рибните продукти.

Таблица 6 Сравняване процентното съдържание на мастноразтворими витамини в ТРИЦОНА (за 100g ядивна тъкан) от RDI за България и според СЗО

Групи по възраст/пол	%RDI Витамин А		%RDI Витамин Е		%RDI Витамин D ₃	
	България	WHO	България	WHO	България	IOM
Кърмачета						
0 - 6 мес.	30	28,1	18,3	12,3	224	112
6 - 12 мес.	28,1	22,5	18,3	9,9	224	112
Деца						
1 - 3 год.	28,1	37,5	8,2	8,2	224	74,7
3 - 7 год.	25	28,1	7	7	224	74,7
7 - 10 год.	22,5	18,8	7	7	224	74,7
Подрастваци	Момчета					
10 - 14 год.	18,8	18,8	4,5	4,5	224	74,7
14 - 19 год.	14,1	12,5	3,3	3,3	224	74,7
	Момичета					
10 - 14 год.	18,8	18,8	4,5	4,5	224	74,7
14 - 19 год.	16,1	16,1	3,3	3,3	224	74,7
Възрастни	Мъже					
19 - 30 год.	14,1	12,5	3,3	3,3	224	74,7
30 - 60 год.	14,1	12,5	3,3	3,3	224	74,7
60 - 75 год.	14,1	12,5	3,3	3,3	112	74,7
над 75 год.	14,1	12,5	3,3	3,3	74,7	56
	Жени					
19 - 30 год.	16,1	16,1	3,3	3,3	224	74,7
30 - 60 год.	16,1	16,1	3,3	3,3	224	74,7
60 - 75 год.	16,1	16,1	3,3	3,3	112	74,7
над 75 год.	16,1	16,1	3,3	3,3	74,7	56
Бременни жени						
под 18 год.	15	15	3,3	3,3	224	74,7
над 19 год.	14,1	14,6	3,3	3,3	224	74,7
Кърмещи жени						
под 18 год.	10,2	9,4	2,6	2,6	224	74,7
над 19 год.	9,4	8,7	2,6	2,6	224	74,7

Таблица 7 Сравняване процентното съдържание на мастноразтворими витамини в **ПЪСТЪРВА** (за 100g ядивна тъкан) от RDI за България и според СЗО

Групи по възраст/пол	%RDI Витамин А		%RDI Витамин Е		%RDI Витамин D ₃	
	България	WHO	България	WHO	България	IOM
Кърмачета						
0 - 6 мес.	7,9	7,4	54,5	36,8	234	117
6 - 12 мес.	7,4	5,9	54,5	29,4	234	117
Деца						
1 - 3 год.	7,4	9,9	24,5	24,5	234	78
3 - 7 год.	6,6	7,4	21	21	234	78
7 - 10 год.	5,9	4,9	21	21	234	78
Подрастващи	Момчета					
10 - 14 год.	4,9	4,9	13,4	13,4	234	78
14 - 19 год.	3,7	3,3	9,8	9,8	234	78
	Момичета					
10 - 14 год.	4,9	4,9	13,4	13,4	234	78
14 - 19 год.	4,2	4,2	9,8	9,8	234	78
Възрастни	Мъже					
19 - 30 год.	3,7	3,3	9,8	9,8	234	78
30 - 60 год.	3,7	3,3	9,8	9,8	234	78
60 - 75 год.	3,7	3,3	9,8	9,8	117	78
над 75 год.	3,7	3,3	9,8	9,8	78	58,5
	Жени					
19 - 30 год.	4,2	4,2	9,8	9,8	234	78
30 - 60 год.	4,2	4,2	9,8	9,8	234	78
60 - 75 год.	4,2	4,2	9,8	9,8	117	78
над 75 год.	4,2	4,2	9,8	9,8	78	58,5
Бременни жени						
под 18 год.	3,9	3,9	9,8	9,8	234	78
над 19 год.	3,7	3,8	9,8	9,8	234	78
Кърмещи жени						
под 18 год.	2,7	2,5	7,7	7,7	234	78
над 19 год.	2,5	2,3	7,7	7,7	234	78

ИЗВОДИ

1. Систематизирани и обобщени са голям брой литературни данни от научни изследвания в областта на количествения анализ на мастноразтворими витамини в риби, които са използвани за сравняване с резултатите, получени в настоящата работа.

2. Модифициран и верифициран е HPLC метод за едновременно количествено определяне на витамин А и витамин Е в ядивна рибна тъкан.

3. Методът за количественото определяне на витамини А и Е е доразвит и валидиран с цел едновременно определяне на мастноразтворими витамини А, D₂, D₃ и Е в рибна тъкан. Методът може да бъде прилаган при анализ на други видове храни.

4. Извършен е количествен анализ на витамини А, D₃ и Е в десет черноморски и пет сладководни рибни вида.

- Витамин Е
 - при черноморски риби: от 210,4 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$ до 3293,7 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$
 - при сладководни риби: от 698,1 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$ до 1470,6 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$
- Витамин А
 - при черноморски риби: от 0,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$ до 192,3 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$
 - при сладководни риби: от 1,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$ до 29,6 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$
- Витамин D₃
 - при черноморски риби: от 2,5 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$ до 46,5 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$
 - при сладководни риби: от 1,1 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$ до 13,9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ ww}$

При двете групи риби са установени най-високи нива на витамин Е, следвани от витамин А и витамин D₃, отнесени към 100g свежо тегло.

5. С по-високо съдържание на витамини А и D₃ се характеризира ядивната тъкан на черноморските риби (съответно с 59% и 30%), докато количествата на витамин Е за двете групи са с близки стойности.

6. Същата тенденция - витамин Е с най-висока концентрация, а витамин D₃ с най-ниска, се наблюдава когато стойностите на витамините се преизчисляват спрямо липидното съдържание на изследваните рибни видове.

- Витамин Е
 - при черноморски риби: от 31,5 $\mu\text{g}\cdot \text{g}^{-1}\text{ lw}$ до 1439,4 $\mu\text{g}\cdot \text{g}^{-1}\text{ lw}$
 - при сладководни риби: от 70,5 $\mu\text{g}\cdot \text{g}^{-1}\text{ lw}$ до 352,7 $\mu\text{g}\cdot \text{g}^{-1}\text{ lw}$

- Витамин А

- при черноморски риби: от $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$ до $46,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$
- при сладководни риби: от $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$ до $7,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$

- Витамин D₃

- при черноморски риби: от $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$ до $4,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$
- при сладководни риби: от $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$ до $3,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ lw}$

7. С по-високо съдържание на трите мастноразтворими витамина в рибните липиди се характеризират черноморските видове – с 59% на витамин А, с 19% на витамин D₃ и с 16% на витамин Е.

8. При двусезонните рибни видове (черноморски: кая, трициона, сафрид, карагъоз, чернокоп и калкан; сладководни: амур, толстолоб и шаран) са установени промени в количествата на трите мастноразтворими витамина:

- Нивата на витамин А при черноморските риби кая, сафрид, карагъоз, чернокоп и калкан и при сладководните видове амур и шаран са по-високи през есента.
- Нивата на витамин Е при всички черноморски риби са по-високи през есенния сезон, докато при сладководните видове такава тенденция не се наблюдава.
- Не е установена сезонна зависимост в съдържанието на витамин D₃ както в черноморските, така и при сладководните риби, включени в настоящото проучване.

9. Проследени са промените в съдържанието на витамини А, D₃ и Е след различни видове термична обработка на рибите.

- Обработката на пара значимо ($p < 0,05$) понижава количествата на витамин А, докато тези на витамин Е и витамин D₃ не се променят ($p > 0,05$);
- Печенето на рибата във фурна ($180 \pm 10^\circ\text{C}$) значимо понижава нивата на витамин А ($p < 0,05$) и витамин Е ($p < 0,001$), докато витамин D₃ не се променя ($p > 0,05$);
- Печенето на скара и в микровълнова фурна не повлияват нивата на витамин А в ядивната тъкан, значимо повишават тези на витамин Е ($p < 0,05$) и понижават количеството на витамин D₃ ($p < 0,01$ и $p < 0,001$).

10. Съхранението на рибите при ниски температури ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$), оказва различно влияние върху съдържанието на мастноразтворими витамини. Най-силно се повлиява витамин Е.

- Съхранение до 1 месец – нивата на витамин А се понижават с 13%, на витамин Е – с 9%, докато тези на витамин D₃ не се променят.

- Съхранение до 6 месеца – понижението на витамин Е е с ~60%, това на витамин А – с ~50%, а витамин D₃ намалява с ~20%.

11. Направено е сравнение на определените количества на витамини А, D₃ и Е, в изследваните черноморски и сладководни риби с нормите за препоръчителен дневен прием в България.

- 100 g от ядивната тъкан на повечето изследвани риби доставят витамин D₃ над 100% от RDI за възрастни индивиди за България, а при останалите видове този внос е от 60 до 100% от RDI.
- Всички от изследваните риби доставят витамин Е ~10% от RDI, само при калкан този внос е 22% RDI.
- Всички изследвани рибни видове доставят витамин А ~ 5% от RDI за възрастни индивиди за България, изключение прави трикона, при която вносът е 17% RDI.

ПРИНОСИ

1. Модифициран и приложен е HPLC метод за едновременно количествено определяне на витамин А и витамин Е в ядивна рибна тъкан. Получените резултати са съпоставими с тези, представени от други научни колективи.
2. Разработен и валидиран е HPLC метод за съвместно количествено определяне на мастноразтворими витамини А, D₂, D₃ и Е в ядивна рибна тъкан, с потенциал за приложение при определянето на тези витамини и в други храни.
3. За първи път в България е извършено систематично изследване за съдържанието на витамини А, D₃ и Е в черноморски и сладководни рибни видове. Получените резултати могат да се използват за създаване на база с данни за химичния състав на храни.
4. Определено е влиянието на топлинната обработка и съхранение при ниска температура на рибите, върху съдържанието на витамини А, D₃ и Е, в ядивната тъкан.
5. Оценен е диетичният внос на витамини А, D₃ и Е, осигуряван от 100 g ядивна рибна тъкан, спрямо физиологичните норми за различни възрастови групи за България.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. М. Станчева, **Д. Добрева**, А. Мерджанова, Б. Галунска (2008) Определяне на витамин А и витамин Е чрез високо-ефективна течна хроматография в риба кая (*Neogobius fluviatilis*) от българското черноморско крайбрежие, Научни трудове Пловдивски университет „Паисий Хилендарски” – България, Химия, А, 36, 5, 45-50
2. **Dobrev D.A.**, Galunska B., Stancheva M. (2011) Liquid chromatography method for the simultaneous quantification of fat soluble vitamins in fish tissue, *Scripta Scientifica Medica*, Varna Medical University, 43, 1, 276-279
3. **Dobrev A.D.**, Stancheva M., Merdzhanova A., Makedonski L. (2011) Fatty Acid profile and Vitamin A and E content in Horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*), *Asian Chemistry Letters*, 15, 1 and 2, 91-100
4. Stancheva M., **Dobrev A.D.**, Galunska B. (2012) Retinol, cholecalciferol and alpha-tocopherol contents of Bulgarian Black Sea fish species, *Ovidius University Annals of Chemistry*, 23, 1, 31-34
5. Merdzhanova A., Stancheva M., **Dobrev D.A.**, Makedonski L. (2013) Fatty acid and fat soluble vitamins composition of raw and cooked Black Sea horse mackerel, *Ovidius University Annals of Chemistry*, 24, 1, 27-34

СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Mona Stancheva, **Diana Dobrev**, Albena Merdzhanova, Bistra Galunska, 7^{ma} Научна конференция по Химия с международно участие, 10-11 октомври 2008, Св.Св. Кирик и Жулиета, България, *High performance liquid chromatography analysis of vitamin A and vitamin E in goby tissue from Bulgarian Black Sea coast*
2. Mona Stancheva, Albena Merdzhanova, **Diana Dobrev**, Lubomir Makedonski, 5th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 23-26 September 2009, Fatsa – Ordu, Turkey, *Fatty Acid Profil and Fatsoluble Vitamins A and E Content of Horse Mackarel (Trachurus Mediterraneus)*

3. Mona Stancheva, **Diana Dobрева**, Albena Merdzhanova, Bistra Galunska, The 1st International Vitamin Conference, 19-22 May 2010, Copenhagen, Denmark, *The Effect of Storage and Processing on Fat Soluble Vitamin Content in Bulgarian Freshwater and Black Sea Fishes*

4. Mona Stancheva, Albena Merdzhanova, **Diana Dobрева**, Lubomir Makedonski, Workshop Challenges in Food Chemistry, 27-29 May 2010, Constantza, Romania, *Fatty Acids Composition and Vitamin A, D and E Content of Sprat (*Sprattus Sprattus*) and Goby (*Neogobius Rattan*) from Bulgarian Black Sea*

5. Mona Stancheva, **Diana Dobрева**, Albena Merdzhanova, Bistra Galunska, 8^{-ma} научна конференция по Химия с международно участие, 18-19 юни 2010, Копривщица, България, *Vitamin Content and Fatty Acid Composition of Brown Trout (*Salmo Trutta fario*)*

6. **Диана Добрева**, Работна среща по проект към МОН DVU 440/2008, 1-2 октомври 2010, Варна, кк “Константин и Елена”, *Определяне Съдържанието на Мастноразтворими Витамини в Черноморски Рибни*

7. Mona Stancheva, **Diana A. Dobрева**, Bistra Galunska, International Conference “Chimia 2012- New Trends in Applied Chemistry”, 24-26 May, Constanta Romania, *Retinol, cholecalciferol and alpha-tocopherol contents of Bulgarian Black sea fish species*