УДК 637.07:543.635.32:543.544.3

ВИЗНАЧЕННЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ТРИАЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ МОЛОЧНОГО ЖИРУ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О. В. Голубець, І. В. Вудмаска

Інститут біології тварин УААН

Проведено визначення триацилгліцерольного складу зразків молочного жиру методом високотемпературної газової хроматографії. Вимірювання проводилось на газовому хроматографі CP-3800 (Varian), оснащеному полум'яно-іонізаційним детектором. Для розділення триацилгліцеролів використовувалась капілярна високотемпературна колонка з неполярною фазою. Введення зразка у хроматографічну колонку здійснювалось методом «гарячої інжекції». За обраних умов аналізу вдалося отримати розділення основних груп триацилгліцеролів молочного жиру від С24 до С54. Масова частка кожної групи триацилгліцеролів у досліджуваних зразках визначена з урахуванням коригувальних факторів, отриманих при аналізі сертифікованого зразка молочного жиру.

За допомогою даного методу було визначено груповий ацилгліцерольний склад зразків ліпідів молока, отриманого у пасовищний та стійловий періоди. Виявлено достовірну різницю у вмісті триацилгліцеролів груп С28–С36, С42–С48, С 50–С54.

Ключові слова: ТРИАЦИЛГЛІЦЕРОЛИ, ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ, МОЛОЧНИЙ ЖИР.

При характеристиці жирів переважно враховують їх жирнокислотний склад та ряд фізичних (густина, температура плавлення, в'язкість) і хімічних (кислотне число, число омилення, ефірне число, йодне число, гідроксильне число, перекисне число) показників [5 ,18]. Жирні кислоти, які входять до складу триацилгліцеролів найбільше впливають на властивості жирів. Разом з тим, фізико-хімічні властивості жиру залежать також від співвідношення окремих підкласів триацилгліцеролів з різним позиційним розміщенням окремих жирних кислот. Наприклад, температура плавлення олії какао на 20 °С нижча за температуру плавлення яловичого жиру, хоча жирнокислотний склад обох жирів приблизно однаковий [8].

Донедавна співвідношення жирних кислот та вміст холестеролу і каротину були основними показниками біологічної цінності молочного жиру [7, 18]. В останні роки при оцінці якості молочного жиру крім перерахованих показників визначають розмір жирових глобул, їх ультраструктуру, структуру триацилгліцеролів та фосфоліпідів [10, 11, 15]. Від будови триацилгліцеролів залежить їх перетравність і засвоєння [20]. Позиційне розміщення жирних кислот у триацилгліцеролах раціону впливає на жирнокислотний склад синтезованих з них ліпідів організму [11, 16]. Це зумовлено тим, що в слизовій оболонці тонкого кишечника триацилгліцероли ресинтезуються переважно з sn-2 моноацилгліцеролів, тоді як вільні жирні кислоти етерифікуються у печінці. Позиційне розміщення жирних кислот у триацилгліцеролах дозволяє з високою вірогідністю визначати вид жиру [8, 19], тому цей показник використовують для перевірки молочного жиру молока та молочних продуктів при підозрі фальсифікації шляхом додавання жирів іншого походження [6, 13]

Вплив різних факторів на співвідношення окремих класів триацилгліцеролів молочного жиру вивчений мало. Певною мірою це обумовлено особливостями жирнокислотного складу. До складу молочного жиру входить 12 основних жирних кислот, з яких утворюється велика кількість індивідуальних триацилгліцеролів. Ідентифікація і кількісне визначення кожного з них складні технічно і потребують одночасного використання декількох методів дослідження — тонкошарової, рідинної та газорідинної хроматографії, масспектрометрії, інфрачервоної спектрометрії [2, 4, 9, 12, 14, 19]. Тому частіше використовується груповий аналіз триацилгліцеролів, який базується на об'єднанні їх у підкласи класи за загальним вуглецевим числом, яке визначається за сумою атомів вуглецю в усіх жирнокислотних залишках молекули триацилгліцеролів [6, 18].

Метод газової хроматографії був першим хроматографічним методом, який використовували для розділення триацилгліцеролів. Ці сполуки мають високу температуру кипіння, тому обов'язковою умовою для їх визначення є наявність нерухомих фаз, що витримують робочу температуру до 350–400 °С. Найпоширенішим у газовій хроматографії на капілярних колонках є метод введення зразка в колонку без попереднього випарювання (cold on-column injection), який дозволяє уникнути гідролізу компонентів [6].

Метою нашої роботи було дослідження ацилгліцерольного складу ліпідів молока корів залежно від сезону — в пасовищний та стійловий періоди.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були зразки жиру, отримані з молока корів, одержаного у пасовищний та стійловий періоди. Екстрагування жиру із зразків молока проводили згідно ISO 14156 [17]. Для проведення хроматографічного аналізу 250 мг отриманого молочного жиру розчиняли у 5 мл н-гептану.

Визначення ацилгліцерольного профілю ліпідів молока проводили на газовому хроматографі CP-3800 (Varian), обладнаному полум'яно-іонізаційним детектором, системою електронного управління потоками газів, універсальним інжектором для введення зразків у режимах з розділенням та без розділення потоків (Split/Splitless) та автосемплером (CP-8410 Varian). Для фіксації колонки використовували графітові прокладки, здатні витримувати температуру вище 250 °С.

Для калібрування колонки використовувався стандартизований зразок зневодненого молочного жиру BCR 519 (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM).

Для розділення триацилгліцеролів використана капілярна колонка DB-5HT (Agilent Technologies) довжиною 15 м із внутрішнім діаметром 0,32 мм та товщиною шару фази 0,1 мкм. Нерухома фаза — неполярна, 5 % фенілметилполісилоксан. Максимальна робоча температура колонки становить 400 °С, що дало можливість проводити аналіз в режимі програмування температур від 90 °С до 380 °С. Параметри хроматографічного аналізу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Робочі параметри хроматографічного аналізу

Коефіцієнт поділу потоку	20:1
Швидкість потоку газу-носія (He), мл/хв	2,5
Об'єм зразка, мкл	0,5
Температура дозатора, °С	390
Температура детектора, °С	400
Режим програмування температури термостата	90 °С – 4 хвилини 20 °С/хв. до 260 °С 260 °С – 1 хвилина 10 °С/хв. до 320 °С 320 °С – 1 хвилина 10 °С/хв. до 350 °С 350 °С – 1 хвилина 5 °С/хв. до 380 °С 380 °С – 1,5 хвилини

Для введення зразків у хроматограф застосовували техніку «гарячої інжекції»: голку інжекційного шприцу прогрівали в інжекторі протягом 5-ти секунд, після чого розчин швидко (50 мкл/сек) вводився в інжектор. Такий спосіб введення запобігає неоднорідному розподілу компонентів, і на відміну від введення "on column", дозволяє уникнути ризику забруднення колонки та можливості потрапляння в неї фрагментів септи (прокладки дозатора).

Ідентифікація піків та їх інтегрування проводили за допомогою програмного забезпечення «Galaxy». Статистична обробка даних проводилась за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2000 із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу [1].

Результати й обговорення

При газохроматографічному визначенні триацилгліцероли розділяються у вигляді груп, що характеризуються однаковим сумарним вуглецевим числом. Кожний наступний пік відповідає групі триацилгліцеролів, сумарне вуглецеве число якої відрізняється від попереднього на 2. За обраних умов хроматографування вдалося отримати задовільне розділення основних груп триацилгліцеролів молочного жиру від С24 до С54.

Кількісна оцінка вмісту триацилгліцеролів залежить від декількох факторів. Найбільш важливе значення мають кількість введених у колонку триацилгліцеролів, їх молекулярна вага та ступінь насиченості. Верхня межа лінійної залежності чутливості полум'яно-іонізаційного детектора до кількості триацилгліцеролів становить приблизно 20 мкг, тому кількість введеного зразка повинна знаходитись у межах цього лінійного діапазону. Врахувати вплив інших факторів можна за допомогою відповідних коригувальних факторів.

Хроматограма триацилгліцеролів сертифікованого зразка молочного жиру, отримана за зазначених умов, наведена на рис.1.

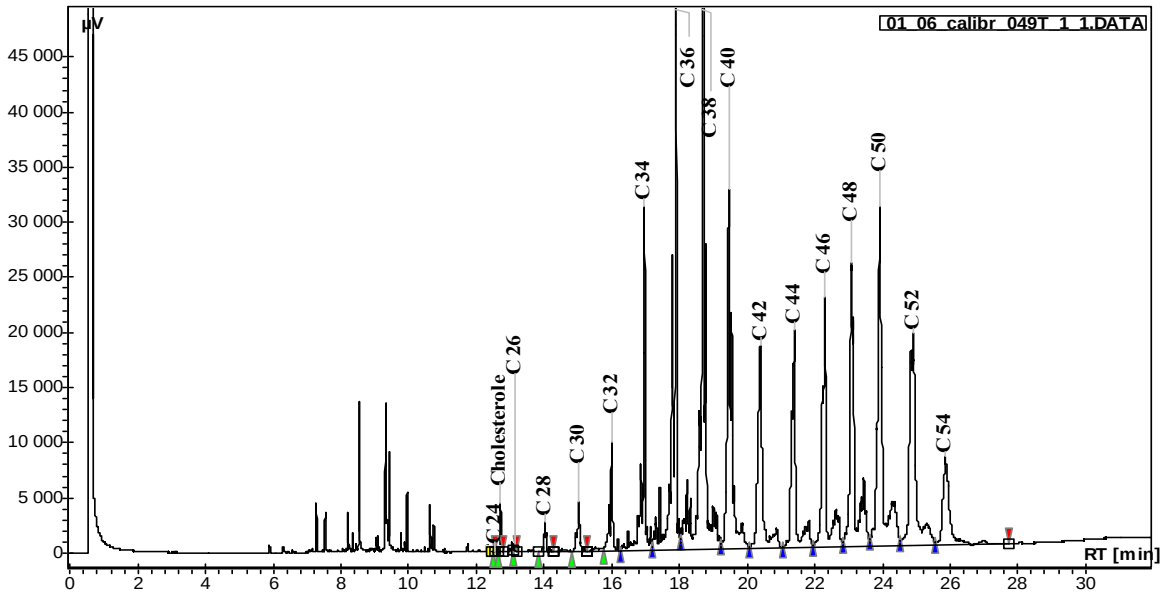

Рис.1. Хроматограма триацилгліцеролів сертифікованого зразка молочного жиру BCR 519

На основі результатів аналізу сертифікованого зразку молочного жиру ми розраховували поправочні коефіцієнти, як відношення відносної масової частки кожної групи триацилгліцеролів до відносної площі відповідного піка. Отримані значення використовувались для розрахунку масової частки окремих груп триацилгліцеролів у досліджуваних зразках (табл. 2).

Таблиця 2

Склад триацилгліцеролів молочного жиру корів у пасовищний та стійловий періоди,

г/100 г жиру (M±m, n=5-9)

Групи триацилгліцеролів	Сезонні періоди	
	пасовищний (n=9)	стійловий (n=5)
C26	0,26±0,03	0,29±0,06
C28	0,60±0,07	0,71±0,06
C30	1,14±0,11	1,34±0,24
C32	2,26±0,15	2,80±0,22*
C34	5,00±0,28	5,90±0,23*
C36	9,56±0,34	10,70±0,18*
C38	12,41±0,47	12,70±0,56
C40	10,60±0,20	10,51±0,61
C42	6,22±0,34	7,18±0,30*
C44	5,32±0,17	6,48±0,52*
C46	6,03±0,23	7,04±0,69
C48	7,96±0,20	8,67±0,72
C50	11,60±0,60	10,62±0,53
C52	12,71±0,89	9,80±0,40*
C54	8,01±0,65	5,10±0,79*

Примітка: * — P< 0,05.

Одержані результати свідчать про наявність вірогідних різниць у складі триацилгліцеролів молока, отриманого у пасовищний та стійловий періоди. Так, у зразках молока, отриманого у стійловий період спостерігається більший вміст триацилгліцеролів із загальним вуглецевим числом С32–С36 та С42–С44 і менший вміст С52–С54 у порівнянні із пасовищним періодом. Це можна пояснити тим, що у складі триацилгліцеролів перших двох груп переважають насичені жирні кислоти, тоді як до складу триацилгліцеролів з вуглецевим числом С50–С54, входить значна кількість ненасичених жирних кислот (в основному олеїнова та її ізомери). Такі різниці у складі триацилгліцеролів молочного жиру в основному узгоджуються з даними про сезонні зміни жирнокислотного складу ліпідів молока корів. У осінньо-зимовий період молочний жир характеризується підвищеним вмістом насичених кислот з високою температурою плавлення, особливо пальмітинової та зменшенням вмісту ненасичених жирних кислот, що зумовлено змінами у складі раціону [18].

Висновки

Встановлено вірогідні різниці у вмісті окремих підкласів триацилгліцеролів молочного жиру корів у різні сезонні періоди утримання.

Під час пасовищного періоду, порівняно до стійлового, у складі молочного жиру корів виявлено більший вміст триацилгліцеролів з сумарною кількістю вуглецевих атомів жирних кислот С32, С34, С36, С42 і С44 та менший вміст триацилгліцеролів груп С52, С53 і С54.

O. V. Golubets, I. V. Vudmaska

APPLICATION OF HIGH TEMPERATURE GAS CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION TRIGLYCERIDE COMPOSITION OF MILK FAT

S u m m a r y

The method for determination of milk fat triglyceride composition by high-temperature gas chromatography is described. The gas chromatograph CP-3800 (Varian) with a flame ionization detector was used. For division of triglycerides the capillary column with a non-polar phase was utilized. Sample solution was injected by a method of hot injection. Under the chosen conditions it was possible to receive satisfactory division of basic groups of triglycerides

from C24 to C54. Amount of each group of triglycerides was calculated with correction factor obtained from analysis of a certificated sample of milk fat. With the help of the given method was determined triglycerides profile of summer and winter milk samples. The difference in the contents of triglyceride groups C32-C36, C42-C44, C52-C54 were found.

Institute of Animal Biology of Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv

1. *Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel — К.: Морион, 2001 — С. 180–183.

2. Andrikopoulos N. K. Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. — 2002. — 42 (5). — P. 473–505.3. *Barber M. C., Clegg R. A., Travers M. T., Vernon R. G.* Lipid metabolism in the lactating mammary gland // Biochim. Biophys. Acta — 1997. — 1347. — P. 101–126.

4. *Bareth A., Strohmar W., Kitzelmann E.,* Gas chromatographic determination of mono- and diglycerides in milk and milk products // European Food Research and Technology. — 2003. — 216 (4). — P. 365–368.

5. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects / Clegg R. A., Barber M. C., Pooley L. et all // Livestock Production Science. — 2001. — 70. — P. 3–14.

6. Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols. Application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils / Destaillats F., de Wispelaere M., Joffre F. et all // J. Chromatogr. A. — 2006. — 1131 (1–2). — P. 227–234.

7. Comparison of available analytical methods to measure trans-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat / Destaillats F., Golay P. A., Joffre F. et all // J. Chromatogr. A. — 2007. — 1145 (1–2). — P. 222–228.

8. Triacylglycerol analysis for the quantification of cocoa butter equivalents (CBE) in chocolate: feasibility study and validation / Dionisi F., Golay P. A., Hug B. et all // J. Agric. Food Chem. —2004. — 52 (7). — P. 1835–1841.

9. Separation of triacylglycerols in a complex lipidic matrix by using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection / Dugo P., Kumm T., Chiofalo B. et all // J. Sep. Sci. — 2006. — 29 (8). — P. 1146–1154.

10. Differently sized native milk fat globules separated by microfiltration: fatty acid composition of the milk fat globule membrane and triglyceride core / Fauquant C., Briard V. et all // Eur. J. Lipid Sci. Technol. — 2005. — 107. — P. 80–86.

11. *Favé G., Coste T. C., Armand M.* Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability // Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). — 2004. — 50 (7). — P. 815–831.

12. Identity of the major triacylglycerols in ovine milk fat / Fontecha J., Goudjil H., Ríos J. J. et all // International Dairy Journal. — 2005. — 15. — P. 1217–1224.

13. *Fontecha J., Mayo I., Toledano G., Juárez M.* Triacylglycerol composition of protected designation of origin cheeses during ripening. Authenticity of milk fat // J. Dairy Sci. — 2006. — 89 (3). — P. 882–887.

14. Composition of goat's milk fat triglycerides analysed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS / Fontecha J., Ríos J. J., Lozada L. et all. // International Dairy Journal. — 2000. — 10. — P. 119–128.

15. *Heid H. W., Keenan T. W.* Intracellular origin and secretion of milk fat globules // Eur. J. Cell. Biol. — 2005. — 84 (2–3). — P. 245–258.

16. Hunter J. E. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides // Lipids. — 2001. — 36 (7). — P. 655–668.

17. ISO 14156/IDF 172:2001. Milk and milk products - Extraction method for lipids and liposoluble compounds.

18. *Jensen R. G.* The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. Review // J. Dairy Sci. — 2002. — 85 (2). — P. 295–350.

19. Martinez-Force E., Ruiz-Lopez N., Garces R. The determination of the asymmetrical stereochemical distribution of fatty acids in triacylglycerols // Anal. Biochem. — 2004. — 334 (1). — P. 175–182.

20. Mu H., Hoy C. E. The digestion of dietary triacylglycerols // Prog. Lipid Res. — 2004. — 43 (2). — P. 105–133.