

ODREĐIVANJE SASTAVA TRIGLICERIDA MLEČNE MASTI PRIMENOM GASNE HROMATOGRAFIJE*

Dr Nikola MARJANOVIĆ, mr Ištvan JANKOVITŠ, dr Jovan TURKULOV, dr Đerđ KARLOVIĆ, dr Marijana CARIC, mr Spasenija MILANOVIĆ, Milica ZAGORAC, Tehnološki fakultet, Novi Sad

Sažetak

Poznato je da trigliceridi čine 97—98% od ukupnih lipida mleka. Na sastav triglicerida mlečne masti, odnosno zastupljenost pojedinih masnih kiselina u njima, pored životinjske vrste utječu i: način gajenja, ishrana (sastav i plan), laktacija, godišnje doba, klima i stepen kretanja.

Za određivanje trigliceridnog sastava mlečne masti korišćena je visokotemperaturna gasna hromatografija. Ispitan je veći broj uzoraka kravlje i ovčije mlečne masti. Dobijeno je dobro razdvajanje triglicerida prema broju ugljenikovitih atoma u acilnom lancu triglicerida. Kvalitet razdvajanja potvrđuje i činjenica da su razdvojeni i trigliceridi sa neparnim brojem ugljenikovitih atoma. Upoređenjem gasnih hromatograma sastava triglicerida različitih uzoraka mlečne masti mogu se dobiti podaci o poreklu, kvalitetu i eventualnom dodatku biljnog ulja ili animalne masti, posebno ako je dodatak iznad 10%.

Uvod

Trigliceridi kao najznačajniji depo energije kod većine živih bića predstavljaju 97—98% od ukupnih lipida u mleku. Masne kiseline potrebne za sintezu triglicerida mlečne masti koriste se iz hrane (to su uglavnom više masne kiseline iznad C_{16} i nezasićene), obrazuju u želucu preživara mikrobiološkom transformacijom (više zasićene masne kiseline, kiseline razgranatog lanca, trans nezasićene i one sa konjugovanim dvostrukim vezama) ili nastaju u mlečnoj žlezdi sintezom (pretežno niže masne kiseline C_4 do C_{14}). U mlečnoj žlezdi sintezom nastaje oko 25% od ukupnih masnih kiselina. U nedostatku navedenih izvora masnih kiselina koriste se masne kiseline iz depoa masti u organizmu životinja. Na sastav triglicerida masti, odnosno zastupljenost pojedinih masnih kiselina u njima pored životinjske vrste utječe način gajenja, ishrana, godišnje doba, klima i stepen kretanja.

Nesumnjivo je da svi navedeni utjecaji, naročito ako se adiraju, mogu da prouzrokuju znatna odstupanja od predviđenih vrednosti za pojedine masne kiseline u sastavu mlečne masti. Na taj način se u ekstremnim slučajevima može desiti da nadvlada osnovni utjecaj koji definiše sastav masnih kiselina u trigliceridima mlečne masti: vrsta životinje (tabela 1.). Zbog toga su neophodne vrlo precizne instrumentalne metode za ispitivanje sastava triglicerida mlečne masti.

* Referat je održan na XXII seminaru za mljekarsku industriju, Zagreb 1984.

Tabela 1**Sastav masnih kiselina u nekim mlečnim mastima izraženi u masenim procentnim udelima (Weeb et. al. 1965.)**

	mlečna mast		
	krave	ovce	koze
C ₄ : 0	2,8	4,0	3,0
C ₆ : 0	2,3	2,1	2,5
C ₈ : 0	1,1	2,0	2,8
C ₁₀ : 0	3,0	6,0	10,0
C ₁₂ : 0	2,9	2,8	6,0
C ₁₄ : 0	9,0	5,3	12,3
C ₁₆ : 0	24,0	17,5	27,9
C ₁₈ : 0	13,2	15,6	6,0
Neparnim C-atomima	3,7	—	—
Razgranate	1,5	—	—
Mono-nezasićene	33,3	38,6	25,1
Poli-nezasićene	3,8	5,6	3,8
Trans	5,0	12,1	—
Konjugovane	1,1	2,7	—

Određivanje triglicerida masti prema Litchfieldu (1972) je težak analitički zadatak iz dva razloga:

- zbog veoma velikog broja mogućih različitih triglicerida i
- zbog njihove velike hemijske i fizičke sličnosti.

Primer radi, maslac, koji prema Jensen u et. al. (1976) sadrži 142 različite masne kiseline, teoretski može da sadrži 2.863.288 različitih molekula triglicerida. Međutim, iskustvo pokazuje da u prirodnim mastima stvarno postoji samo 50% do 80% mogućih molekulskih oblika, što je u slučaju maslaca još uvek oko 1.500.000 različitih triglicerida.

U ispitivanju triglicerida danas najbolje rezultate daju hromatografske metode, posebno gasna hromatografija. Gasna hromatografija je danas nezaobilazna tehnika za ispitivanje lipida uopšte, zbog svoje velike moći razdvajanja, osetljivosti, brzine analize i mogućnosti automatskog očitavanja. U analizi lipida najviše se primenjuje indirektni postupak određivanja masnih kiselina gasnom hromatografijom preko njihovih metilestara. Nešto se manje primenjuje postupak direktnog određivanja triglicerida prema njihovoj molekularnoj masi.

Trigliceridi se prema svojoj masi, odnosno prema broju ugljenikovih atoma u acilnom lancu (kako se češće označavaju) određuju visokotemperaturnom podeonom gasnom hromatografijom. Primenom temperaturnog programa od 170 °—370 °C prema Karleskind et. al. (1974) mogu se razdvojiti trigliceridi od 24 do 66 C-atoma u acilnom lancu, koji se, porastom atomske mase eluiraju jedan za drugim. Međutim, izomerni trigliceridi sa istim brojem C-atoma u acilnom lancu, čak nezavisno od broja nezasićenih veza eluirace se zajedno, odnosno, činiće zajednički pik na gasnom hromatogramu. Razdvajanje

samo prema molekularnoj masi je ograničavajući faktor pri primeni ove metode za identifikaciju triglicerida, naročito ako se trigliceridi lipida sastoje od masnih kiselina čiji je broj ugljenikovih atoma isti (najčešće C₁₆ i C₁₈), jer tada gasni hromatogram sadrži relativno mali broj pikova. Primeri za ovo su: veći broj biljnih ulja, svinjska mast i dr. Međutim u slučaju kada trigliceridi prirodnih lipida sadrže masne kiseline različitih dužina lanaca (mlečne masti, kokos mast, ulje palminih koštica, repičino ulje itd.) mogućnosti identifikacije su znatno veće.

Navedeni nedostatak metode se delimično može ublažiti kombinacijom ovog postupka sa hromatografijom na tankom sloju impregniranom srebrnim jonima, pomoću koje se trigliceridi mogu prethodno razdvojiti prema stepenu nezasićenosti.

Pri nabranju negativnih osobina direktnog određivanja triglicerida gasnom hromatografijom treba istaći nepotpuno kvantitativno izdvajanje posebnih triglicerida sa višom molekularnom masom, (iznad 48 C-atoma) zbog njihove male isparljivosti, pa se pri tačnijim kvantitativnim određivanjima mora izvršiti korekcija nađenih sadržaja triglicerida. Oko vrednosti korekcionih faktora ne postoji slaganje u literaturi, međutim, ako se radi o uzorcima sa trigliceridima do 54 C-atoma u acilnom lancu (veći broj prirodnih ulja i masti kao i mlečna mast) potrebna korekcija ne prelazi 10% (Litchfield et. al. 1965, K u k s i s 1964).

Za razdvajanje triglicerida prema molekularnoj masi obično se koriste kraće kolone zbog potpunijeg kvantitativnog izdvajanja triglicerida, izrađene od stakla ili nerđajućeg čelika. Kolone od nerđajućeg čelika se češće koriste, iako imaju nešto slabije osobine (veća je adsorpcija triglicerida), ali je sa njima znatno lakše rukovanje. Kolona se puni čvrstim nosačem, obično diatomejskom zemljom ispranom kiselinom, poznatom pod komercijalnim nazivom Gas Chrom Q, Chromosorb W/AW-DMCS ili Supelcoport AW-DMCS. Stacionarna tečna faza mora biti nepolarna i termostabilna da bi se izbeglo »krvarenje kolone«, a najčešće su za ove svrhe korišćene stacionarne tečne faze: OV-1, OV-101, SE-30, SE-52, Dexsil-300, koje se dodaju od 1% do 3% u odnosu na masu inertnog nosača (Litchfield 1972).

Prednosti određivanja trigliceridnog sastava pomoću podeone gasne hromatografije je pre svega u vrlo jednostavnoj pripremi uzorka, koja praktično obuhvata samo ekstrakciju triglicerida iz uzorka. Iako ograničena, primena dobijenog hromatograma triglicerida prema broju C-atoma u acilnom lancu, ipak je vrlo značajna kod brzog određivanja vrste masti ili ulja, prisustva primesa, a naročito veliki značaj ima kod praćenja procesa interesterifikacije u cilju dobijanja masti određenog trigliceridnog sastava.

Cilj ovog rada je bio da se primenom visokotemperaturne gasne hromatografije odredi trigliceridni sastav različitih vrsta mlečnih masti, da se uporede rezultati kvantitativnog sastava triglicerida međusobno i sa literaturnim podacima i na kraju, da se ispita mogućnost primene ovog postupka za ustanovljavanje dodatka mlečnoj masti drugih animalnih i biljnih masti.

Materijal i metoda rada

Kao uzorci kravlje mlečne masti korišćena su dva maslaca iz Mađarske (»Margareta« i »Tea vaj«) i dva domaća maslaca (novosadske i subotičke mlečare). Ovčije mlečne masti su dobijene iz ovčijeg mleka sa teritorije Sremske

Mitrovica i Novog Sada. Novosadsko ovčije mleko je bilo kolostralno (do sedam dana).

Maslac i margarin su za analizu pripremani sušenjem sa bezvodnim natrijum-sulfatom i ceđenjem uz zagrevanje na 60 °C. Ovčije mleko je separirano, a mlečna mast je ekstrahovana iz pavlake pomoću petrol-etera i sušena sa bezvodnim natrijum-sulfatom. Nakon ceđenja petrol-etar je uparen pomoću vakuumaparivača.

0,5 g ovako pripremljenog uzorka je rastvoreno u 1 ml hloroforma i ovi rastvori su korišćeni za analizu gasnom hromatografijom.

Za analizu je korišćen gasni hromatograf »Packard-Becker 409« sa pisačem Unicam AR 25.

Uslovi analize trigliceridnog sastava su bili sledeći:

Kolona: čelična, dužine 1 m i unutrašnjeg prečnika 3,18 mm (1/8 inch)

Čvrst nosač: Supelcoport 100/120 mesh AW/DMCS

Stacionarna faza: 1% Dextsil-300

Temperaturni program: 250 °C 3 min; 7,5 °C/min i 12 min na 350 °C

Temperatura injektora: 340 °C

Detektor: vodonikov plameno-jonizacioni, protok vazduha 250 ml/min; protok vodonika 25 ml/min; temperatura 350 °C

Gas nosač: azot, protok 15 ml/min

Kvantitativno određivanje udela triglicerida prema broju C-atoma u acilnom lancu rađeno je metodom 100% bez upotrebe korekcionih faktora. Površine su merene grafičkim postupkom.

Rezultati ispitivanja i diskusija

Uslovi hromatografisanja visokotemperaturnom gasnom hromatografijom obezbedili su dobro razdvajanje triglicerida mlečne masti prema broju C-atoma u acilnom lancu. Pored potpuno razdvojenih triglicerida sa parnim brojem C-atoma u acilnom lancu delimično su razdvojeni i trigliceridi mlečne masti sa neparnim brojem C-atoma. Na gasnom hromatogramu kravlje mlečne masti (slika 1.), trigliceridi sa neparnim brojem C-atoma nisu posebno označeni, zbog niskog sadržaja, ali se jasno vide između označenih pikova triglicerida sa parnim brojem C-atoma. U tabeli 2. su dati rezultati određivanja triglicerida kravlje i ovčije mlečne masti sa parnim brojem C-atoma u acilnom lancu izraženi u masenim procentualnim udelima ne uzimajući u obzir udeo triglicerida sa neparnim brojem C-atoma.

Iz tabele 1. se vidi da postoji relativno velika sličnost u trigliceridnom sastavu sva četiri uzorka mlečne masti. To je razumljivo, s obzirom na to da su bliske regije porekla i da je način odgoja i ishrane stoke sličan. U sastavu dominiraju trigliceridi od 34 do 40 C-atoma u acilnom lancu, koji čine više od 50% od ukupnih triglicerida. Međutim, ako se ovi rezultati uporede sa literaturnim podacima (tabela 3.) postoji relativno dobro slaganje samo sa rezultatima Von Wieskea (1975), dok se u odnosu na rezultate, Litchfielda i Karleskinda et.al. (1974) javljaju značajne razlike.

Tabela 2

Sadržaj triglicerida u kravljjoj i ovčijoj masti prema broju C-atoma u acilnom lancu određen podeonom gasnom hromatografijom i izražen u procentnom udelu

broj C atoma	kravljja mlečna mast				ovčija mlečna mast	
	1	2	3	4	I	II
24	—	—	—	—	1,0	—
26	1,1	1,2	0,8	0,6	2,8	0,2
28	2,3	2,0	1,6	1,6	3,7	1,2
30	4,1	3,7	2,6	2,8	7,2	2,6
32	6,5	6,1	5,3	5,1	8,1	4,7
34	10,7	11,4	9,9	10,4	9,5	7,3
36	17,3	17,6	15,8	18,2	12,3	11,0
38	16,2	17,0	16,6	16,5	13,0	14,6
40	11,2	11,5	11,4	11,8	10,0	14,1
42	7,3	6,9	7,6	7,5	5,9	8,6
44	5,8	5,9	6,0	5,9	8,1	6,6
46	4,9	4,7	4,8	4,8	4,4	5,2
48	5,0	4,9	5,1	5,0	3,3	4,6
50	4,7	4,6	6,1	5,4	3,0	6,3
52	2,5	2,3	5,3	3,8	5,3	8,4
54	0,4	0,1	1,1	0,6	2,4	4,6

1. »Margarita« maslac
2. »Tea vaj« maslac
3. Novosadski maslac
4. Subotički maslac
 - I. iz ovčijeg mleka
 - II. iz kolostralnog ovčijeg mleka (do sedam dana)

U odnosu na rezultate ovih autora odstupanje je posebno izraženo u manjem sadržaju triglicerida od 32 do 36 C-atoma i većem sadržaju triglicerida sa 50 do 54 C-atoma. Razlike u sastavu su najverovatnije posledica velike razlike u ishrani, a verovatno i drugih uslova koji utječu na trigliceridni sastav kravljje mlečne masti.

Upoređenjem trigliceridnog sastava ovčije mlečne masti (I u tabeli 2.) sa kravljjom mlečnom mašču (1, 2, 3 i 4 u tabeli 2.) vidi se da je u ovčijoj mlečnoj masti sadržaj triglicerida od 24 C do 32 C-atoma veći, a 36 C do 42 C-atoma niži. Trigliceridni sastav mlečne masti iz kolostralnog ovčijeg mleka (II u tabeli 2) se u većoj meri razlikuje od ovčije mlečne masti (I), a u većem delu je čak sličniji sastavu ispitivanih kravljjih mlečnih masti.

Pomoću trigliceridnog sastava dobijenog gasnom hromatografijom može se utvrditi prisustvo drugih mlečnih, animalnih ili biljnih masti u određenoj mlečnoj masti (patvorenje). Ovo se izvodi na osnovu karakterističnog sadržaja triglicerida sa određenim brojem C-atoma.

Ukoliko se kravljjoj mlečnoj masti (slika 1.) dodaje margarin doći će do promene sastava, odnosno sadržaja triglicerida prema broju ugljenikovih atoma

u acilnom lancu. Na slici 2. je predstavljen hromatogram triglicerida margarina, koji pokazuje da ispitivani margarini uglavnom sadrže trigliceride sa većim brojem ugljenikovih atoma u acilnom lancu (od 48 C do 54 C-atoma). Dodatkom margarina u mlečnu mast doći će do povećanja sadržaja samo triglicerida sa višim brojem C-atoma dok se, obzirom na korišćenu metodu izražavanja rezultata (metoda 100%), udeo ostalih triglicerida smanjuje. Ove promene se mogu uočiti na gasnom hromatogramu maslaca kojem je dodato 15% margarina (slika 1).

Tabela 3

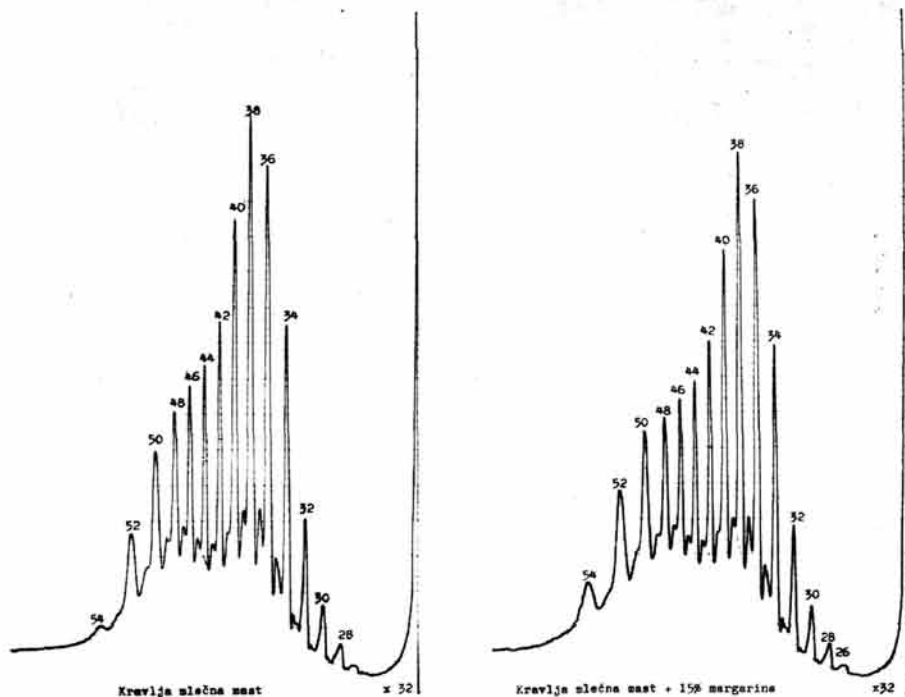
Uopredni prikaz naših i literaturnih podataka trigliceridnog sastava maslaca prema broju C-atoma u acilnom lancu izraženi u procentnim udelima

broj C atoma	naši rezultati	Litchfield*	Karleskind et. al. (1974)	Von Wieske (1975)
22			0,1	
24			0,4	
26	0,6— 1,2		0,4	0,5
28	1,6— 2,3		0,9	1
30	2,6— 4,1	1,3	1,4	2
32	5,1— 6,5	2,5	2,2	5
34	9,9—11,4	4,8	3,9	10
36	15,8—18,2	10,5	10,1	15
38	16,2—17,0	14,4	14,6	14
40	11,2—11,8	11,4	12,0	10
42	6,9— 7,6	5,9	6,0	7
44	5,8— 6,0	4,7	4,8	6
46	4,7— 4,9	5,4	5,5	6
48	4,9— 5,1	8,2	7,6	7
50	4,6— 6,1	10,9	11,7	7
52	2,3— 5,3	11,9	12,4	6
54	0,1— 1,1	7,2	6,0	2
56		0,9		

* Rezultati Litchfielda su uzeti iz rada Karleskinda et. al. (1974) i predstavljaju korigovane vrednosti nadenog trigliceridnog sastava.

Da bi se jednostavnije moglo ustanoviti prisustvo margarina u maslacu na osnovu gasnog hromatograma triglicerida, traženi su karakteristični sadržaji triglicerida sa određenim brojem C-atoma čijim odnosom bi se mogle uočiti promene u sastavu. Sadržaj triglicerida sa 52 C-atoma je bilo lako izabrati, s obzirom da je kod većine ispitivanih margarina, udeo ovog triglicerida bio najveći, a kod maslaca mali, zato je i njegovo povećanje najizrazitije u slučaju dodatka margarina maslacu. Kod izbora referentnog triglicerida mora se voditi računa o tome da margarin često sadrži i kokos mast (trenutno ih naši margarini ne sadrže zbog teškoća sa uvozom), koja ima izrazito visoki sadržaj triglicerida sa 32 C do 40 C-atoma, pa ovi trigliceridi nisu uzeti u obzir. Za ovu svrhu najpogodnijim se pokazao triglicerid sa 28 C-atoma, odnosno površina pikova na gasnom hromatogramu, kod ispitivanih maslaca se kretao od

0,93 do 3,7. Kod uzorka maslaca u koji je dodavan margarin ovaj je odnos bio najveći »52C/28C« = 3,7. Dodatkom 5⁰/₀ margarina maslacu ovaj odnos je porastao na 3,9, dodatkom 10⁰/₀ margarina maslacu na 4,0, a dodatkom 15⁰/₀ odnos se čak povećao na 5,6. Na osnovu ovih podataka, može se sasvim pouzdano ustanoviti prisustvo iznad 10⁰/₀ margarina u maslacu, naravno pod uslovom da je približno poznat sastav »čiste« mlečne masti. Ukoliko je trigliceridni sastav uzorka mlečne masti poznat mogao bi se ustanoviti dodatak margarina i iznad 5⁰/₀.



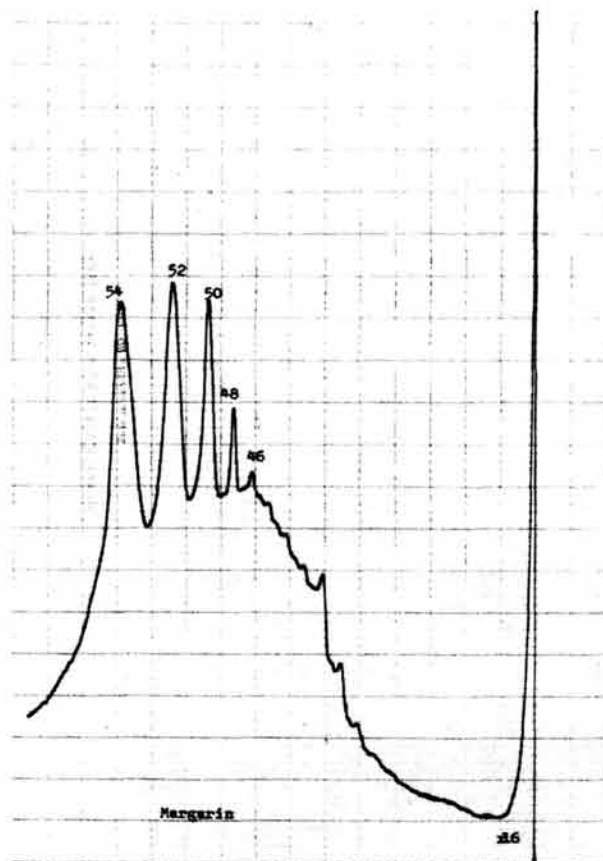
Slika 1.

Gasni hromatogram triglicerida kravlje mlečne masti i kravlje mlečne masti sa dodatkom 15⁰/₀ margarina

Zaključak

Izabranim uslovima rada pri visokotemperaturnoj podeonoj gasnoj hromatografiji dobijeno je dobro razdvajanje triglicerida kravlje i ovčije mlečne masti prema broju ugljenikovih atoma u acilnom lancu. Takođe su izdvojeni i trigliceridi sa neparnim brojem ugljenikovih atoma.

Na osnovu gasnog hromatograma, odnosno masenog udela razdvojenih triglicerida mlečnih masti moguće je pod određenim uslovima njihovo brzo karakterisanje i utvrđivanje patvorenja.



Slika 2.
Gasni hromatogram triglicerida margarina

Ispitana je mogućnost utvrđivanja dodatka margarina mlečnoj masti određivanjem sadržaja i odnosa sadržaja triglicerida sa 52 C i 28 C-atoma. Ispitivanja su pokazala da se sa sigurnošću može utvrditi dodatak margarina mlečnoj masti iznad 10%.

Summary

It is known that triglycerides comprise 97—98% of the total milk lipids. Composition of milk fat triglycerides i.e. the percentage of individual fatty acids in them are effected by the species, aswell as by the breeding, composition and plan of feeding, lactation, season, climate and agitation.

Determinations of triglyceride composition of milk fats have been carried out by high-temperature gas chromatography. Great number of samples of cow and sheep milk fats have been analyzed. Separation of triglycerides proved

to be satisfactory according to the number of carbon atoms in acyl chain of triglycerides. The obtained quality of separation is also proved by the fact that even triglycerides with an odd number of carbon atoms have been separated. Comparison of gas chromatograms of the composition of triglycerides from different samples of milk fat can give the data on the origine, quality and possible addition of vegetable oil or animal fat, particularly if the addition exceeds 10%.

Literatura

- JENSEN, R.G., QUINN, J.G., CARPENTER, D.L., SAMPUGNA, J.; *J. Dairy Sci.*, **50**, 119 (1967);
KARLESKIND, A., VALMALLE, J., WOLFF, P.; *Rev. Franç. Corps Gras*, **11**, 617 (1974);
KUKSIS, A.; in »Lipid Chromatographic Analysis« (G.V. Marineffi ed.), Vol. 1., pp 239—337, Dekker, New York, 1967.
LITCHFIELD, C., HARLOW, R.D., and REISER, R.; *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 849, (1965);
LITCHFIELD, C.; »Analysis of Triglycerides« Academic Press, New York and London, 1972.
WEBB, B.H., JOHNSON, A.H.; (Editors), »Fundamentals of Dairy Chemistry«, The AVI Publishing Comp., Inc., Westport, Connecticut, 1965.
WIESKE, von Th.; *Fette Seifen Anstrichmittel*, **77**, 285 (1975).