Методы и объекты химического анализа, 2009, т. 4, № 1, С. 60–66.

Установление фальсификации молочной продукции методами газовой хроматографии

Ф. А. Чмиленко, Н. П. Минаева, А. В. Сандомирский, Л. П. Сидорова

Днепропетровский национальный университет,
ул. Научная 22, 49050, Днепропетровск, Украина, e-mail: analytic.dnu@mail.ru

Поступила: 28 декабря 2007 / Принята к опубликованию: 11 июня 2009

Предложена методика хроматографической идентификации молочной продукции с низким содержанием жира, которая включает стадию концентрирования жира экстракцией водно-молочно-спиртовой эмульсии гексаново-эфирной смесью для последующего хроматографического определения стериновой фракции.

Chmilenko F.A, Minaeva N.P., Sandomirskij A.V., Sidorova L.P. Identification of milk products falsification by gas chromatographic method *– The technique of chromatographic identification of low oil containing milk products have been proposed. This technique includes the step of oil concentrating by hexane ether mixture extraction from aqueous-milk-alcohol emulsion for further chromatographic determination of stearine fraction.*

Ключевые слова: *газовая хроматография, молочная продукция, концентрирование, экстракция*
Keywords: *gas chromatography, milk products, concentrating, extraction*

Контроль качества пищевых продуктов – одна из составляющих проблемы здорового питания, обеспечивающего не только проживание, но порой и выживание потребителя пищевых продуктов. Не секрет, что значительное расширение ассортимента продуктов питания на потребительском рынке не обходится без стремления выпускать под видом известных товарных марок явные подделки или продукцию заведомо заниженного качества. В связи с этим особую актуальность приобретает идентификация пищевых продуктов, которая включает ряд процедур по установлению их соответствия образцам (стандартам) или техническим условиям.

Фальсификация пищевых продуктов устанавливается по параметрам и показателям необходимым и достаточным для подтверждения соответствия стандарту. Количество идентифицируемых показателей зависит от вида продукции.

В последнее время на рынке Украины присутствует значительное количество фальсифицированной продукции. Чаще всего фальсификации подвержены дорогостоящие виды растительных масел (оливковое, какао, ореховое) и молочные продукты (масло, сливки, сметана, сыр, сгущенное и сухое молоко, мороженое и др.). Фальсификацию масло-жировой продукции можно условно разделить на две группы: “грубая”, когда содержание растительных добавок больше 20% и “тонкая”, когда доля последних – менее 20%. Как показывает практика, для фальсификации наиболее часто используют гидрированные растительные жиры или их смеси с другими маслами. Такие композиции часто продаются, как заменители молочного жира, жиры для кондитерской промышленности и производства мороженого.

Наиболее достоверными показателями, характеризующими качество масложировой продукции, являются жирнокислотный и триглицеридный [1, 2] состав, а также параметры стериновой фракции, которые устанавливают хроматографическими методами [3–7].

Следует отметить, что существует также экспрессный метод анализа, в основе которого лежит свойство масложировой продукции – люминесцировать и изменять свой цвет под действием ультрафиолетового излучения. Сливочное масло имеет цвет люминесценции от бледно-желтого до ярко-желтого, растительный жир – интенсивно-голубой, спред отвечает смешанному цвету. Однако при добавке небольшого количества растительных масел или использовании растительного жира типа “Олмикс”, который имеет темно-желтый цвет люминесценции, провести идентификацию практически невозможно. Также установлено, что цвет люминесценции молочного жира и растительных жиров обусловлен наличием определенных примесей, зависящих от вида технологической обработки. Поэтому

© Ф.А. Чмиленко, Н.П. Минаева, А.В. Сандомирский, Л.П. Сидорова

метод установления фальсификации, который основан на этом принципе, требует дальнейшего изучения и усовершенствования.

Определение общего жирнокислотного состава широко используется только для выявления грубых фальсификаций. Определить количество в 10–20% примесей с помощью одного этого метода невозможно вследствие природных колебаний жирнокислотного состава в достаточно широком диапазоне. В последнее время много публикаций посвящено анализу полученных данных жирнокислотного состава, где внимание уделяется статистическим методам обсчета [8, 9]. Как показывает практика, эти методы не всегда полностью учитывают возможные ситуации, поскольку полученные результаты могут зависеть от аппаратурного оформления анализа, полноты разделения и определения кислот. Пока нет единого мнения по граничным значениям содержания тех или иных кислот, так как критерии натуральности молочного жира не стандартизованы и находятся на стадии обсуждения специалистов [10–12], не выработан простой и удобный для оператора алгоритм интерпретации аналитических результатов.

Состав стериновой фракции четко зависит от природы жира - животного или растительного происхождения. При использовании исключительно молочного жира в стериновой фракции должен находиться только холестерин. В растительных жирах холестерина практически нет, но присутствуют другие стерины, а именно: брасикастерин, кампастерин, стигмастерин, β-ситостерин и т.д. По наличию этих стеринов можно судить о примесях растительного масла в животном.

Состав стериновой фракции масло-жировой продукции можно установить, используя хроматографический метод с предварительным щелочным гидролизом [3, 5]. Однако данным методом можно проанализировать молочную продукцию с высоким (более 50%) содержанием жира (масло, спреды). Для молочной продукции с низким (менее 50%) содержанием жира (мороженое, молоко, сырки и т.д.) данным методом воспользоваться нельзя. Необходимо провести дополнительную стадию пробоподготовки по извлечению жира из пробы.

Цель работы – разработать методику хроматографической идентификации молочной продукции с низким содержанием жира. Для этого необходимо разработать ускоренную стадию пробоподготовки по извлечению жирового слоя из молочной продукции для последующего хроматографического определения стериновой фракции. Методика должна быть экспрессной, с небольшими затратами времени на выделение жировой фракции и небольшим расходом органических растворителей на подготовку пробы.

Методы и материалы исследований

Определение жирно-кислотного состава масло-жировой продукции с высоким содержание жира (масло, спреды)

Определение жирно-кислотного состава проводили на газожидкостном хроматографе “Агат” с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) (метод ГХ/ПИД) на стеклянной капиллярной колонке с жидкой неподвижной фазой Карбовакс 20 М длиной 80 м, внутренним диаметром 0,35 мм, толщиной слоя покрытия фазы 0,2 мкм. Температура инжектора составляла 280°С, детектора – 300°С, термостата колонки в изотермическом режиме – 190°С. При программированном режиме начальная температура – 80°С, выдержка при начальной температуре – 5 мин, скорость подъема температуры 8°С/мин, конечная температура – 190°С, давление газа-носителя на входе в инжектор – 0,1 МПа, распределение потока на входе в колонку – 1/10 (сбрасывание в атмосферу – 9/10 потока на выходе из инжектора). Газ носитель – азот.

Для качественной идентификации метиловых эфиров жирных кислот использовали стандартный раствор корпорации SUPELCO, в который входит 37 метиловых эфиров жирных кислот (Кат. № 47885). Для количественной оценки использовали метод внутренней нормализации

Пробоподготовка основана на щелочном гидролизе триглицеридов и получением метиловых эфиров жирных кислот реакцией этерификации. Навеску образца массой (100±5) г в стеклянном стакане помещают в сушильный шкаф при температуре 40–45°С и выдерживают до полного расслоения. Верхний жировой слой сливают и фильтруют через бумажный фильтр. Расплавленную жировую фазу хорошо перемешивают. В стеклянную пробирку отбирают пипеткой 2–3 капли жира, растворяют их в 1,9 $см^3$ гексана. В раствор вводят 0,1 $см^3$ раствора метилата натрия в метаноле концентрацией 2 $моль/дм^3$. После интенсивного перемешивания в течение 2 мин, реакционную смесь отстаивают 5 мин и фильтруют через стеклянную воронку, в нижней части которой находится слой обезжиренной ваты и 0,5–1,0 г моногидрата кислотно-сернокислого натрия. Полученный фильтрат вводили в хроматограф в количестве 1 $мм^3$ с помощью микрошприца. Детектирование метиловых эфиров жирных кислот проводили методом ГХ/ПИД.

В таблице представлен жирно-кислотный (ЖК) состав некоторых растительных масел и сливочного масла [2]. Расчет состава метиловых эфиров жирных кислот масла проводили методом внутренней нормализации. Массовую долю каждой кислоты масла X_i вычисляли по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\sum_i S_i}$$

где S_i – площадь пика метилового эфира жирной кислоты; S_iS_i – сумма площадей всех идентифицированных пиков метиловых эфиров жирных кислот на хроматограмме.

Несоответствие ЖК состава свидетельствует о фальсификации масло-жировой продукции, может быть следствием неправильного хранения масла или нарушением технологических процессов при его производстве и фасовании.

Определение стеринового состава масло-жировой продукции с высоким (более 50%) содержанием жира (масло, спреды)

Определение фальсификации масло-жировой продукции по составу стериновой фракции (а именно по содержанию растительных стеринов) является наиболее достоверным методом, который позволяет выявить добавки масел растительного происхождения от 2% и выше. При этом на хроматограмме фиксируют пики фитостеринов, эти компоненты подтверждают факт фальсификации.

Определение стериновой фракции проводили на хроматографе Shimadzu 14B методом ГХ/ПИД на капиллярной колонке с жидкой неподвижной фазой ZB-5, длиной 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщиной покрытия неподвижной фазы 0,25 мкм. Температуры инжектора и детектора составляют 300°С.

Таблица. Жирно-кислотный состав (по основным жирным кислотам) растительных масел и сливочного масла [2].

Название	Условное обозначение	Массовая доля (мас. %)		
		Оливковое масло	Масло какао	Сливочное масло
Бутановая (масляна)	$C_{4:0}$	–	–	4,7–6,5
Гексановая (капроновая)	$C_{6:0}$	–	–	2,5–3,5
Октановая (каприловая)	$C_{8:0}$	–	–	1,2–1,7
Декановая (каприновая)	$C_{10:0}$	–	–	2,2–3,2
Додекановая (лауриновая)	$C_{12:0}$	–	–	2,1–4,3
Тетрадекановая (миристиновая)	$C_{14:0}$	–	до 0,7	8,2–11,6
Гексадекановая (пальмитиновая)	$C_{16:0}$	7,0–20,0	24,0–25,2	22,8–31,4
Гексадеценовая (пальмитолеиновая)	$C_{16:1}$	0,3–3,5	–	1,3–2,1
Октадекановая (стеариновая)	$C_{18:0}$	1,5–4,3	34,0–35,5	7,7–12,1
Октадеценовая (олеиновая)	$C_{18:1}$	56,0–83,0	37,0–41,0	17,6–23,5
Октадекадиеновая (линолевая)	$C_{18:2}$	3,3–20,0	1,0–4,0	1,0–3,1
Октадекатриеновая (линоленовая)	$C_{18:3}$	0,4–1,5	до 0,2	0,47–1,0
Ейкозановая (арахиновая)	$C_{20:0}$	0,2–1,6	0,2–0,8	0,16–0,3
Докозеновая (бегеновая)	$C_{22:0}$	0,5–1,3	–	0,06–0,09

Термостат колонки: начальная температура – 200°С, выдержка при начальной температуре – 2 мин, программирование температуры анализа – 7°С/мин, конечная температура – 295°С. Давление газа-носителя на входе в инжектор – 0,1 МПа, распределение потока на входе в колонку – 1/20 (сброс в атмосферу – 19/20 частей потока на выходе из инжектора). Газ носитель – азот.

Для идентификации пиков на хроматограмме использовали стандарты корпорации SUPELCO: холестерин Кат. № 47127, бета-ситостерин Кат. № S 1270, стигмастерин Кат. № 47132, кампастерин Кат. № B 736, брасикастерин Кат. № B 493.

Пробоподготовка заключается в щелочном гидролизе пробы масло-жировой продукции с последующим экстрагированием неполярным растворителем неомыляемых примесей, выделение стериновой фракции из неомыляемых веществ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Для щелочного гидролиза используют этанольный раствор гидроксида калия с концентрацией 1 моль/дм^3. К навеске образца массой 5 г добавляют 50 см^3 этого раствора, вносят "кипелки", кипятят с обратным холодильником 1 час, охлаждают, добавляют 100 см^3 дистиллированной воды и экстрагируют в делительной воронке неомыляемые вещества гексаном (трижды по 50 см^3). Объединенный гексановый слой промывают 10% водным раствором этанола (четыре раза по 25 см^3). Гексановый экстракт упаривают досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют этилацетатом и очищают с помощью тонкослойной хроматографии.

Определение разделенных стеринов проводили методом капиллярной ГХ/ПИД в изотермическом режиме. При очистке образца методом ТСХ на пластинках Сорбфил (ПТСХ-АФ-В-УФ) предложена подвижная фаза с оптимальным соотношением гексан:этилацетат (от 65:35 до 60:40 об %), а также хлороформ:этилацетат (95:5 об %). Количество наносимого образца на ТСХ пластинку не должна превышать 0,1 мг неомыляемых веществ, что эквивалентно 1 г образца масложировой продукции. Нанесение образцов в виде отдельных точек (рис. 1) также способствует улучшению результатов разделения.

Применение капиллярных колонок разрешает достичь лучшего разделения пиков указанных стеринов.

Содержание холестерина в сливочном масле может колебаться от 190 до 250 мг на 100 г продукта. На хроматограмме (рис. 3б) содержание холестерина 180,3±5,4 мг/100 г, брасикастерина 0,5±0,1 мг/100 г, кампастерина 7,4±0,4 мг/100 г, стигмастерина 3,2±0,2 мг/100 г, бета-ситостерина 25,3±1,3 мг/100 г. Предел обнаружения бета-ситостерина по методике 0,5 мг/100 г продукта, т.о. добавка масел растительного происхождения 0,2% и выше будет фиксироваться на хроматограмме.

Определение стеринового состава молочной продукции с низким (менее 50%) содержанием жира (мороженое, молоко, сырки)

Поскольку в исследуемом продукте содержание жира составляет менее 50%, поэтому воспользо-

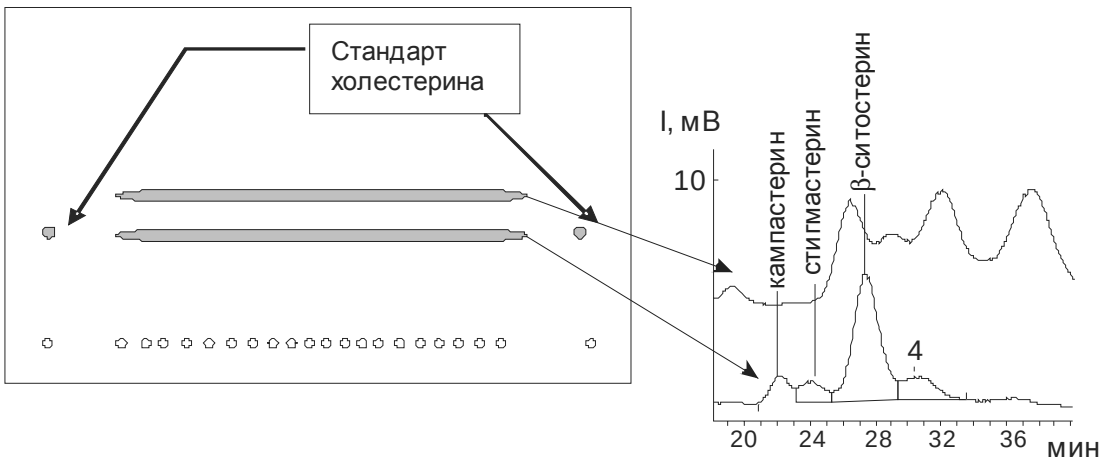

Рис. 1. Схематическое изображение тонкослойной пластинки с нанесенными неомыляемыми веществами растительного масла. После опрыскивания раствором проявителя при облучении ультрафиолетовым светом стериновая фракция имеет желтую окраску. (Подвижная фаза: хлороформ – етилацетат (95:5 об. %), раствор для опрыскивания – родамин 6G); здесь и на рис. 2 и 3 I, мВ – отклик детектора.
В правой части рисунка расположены хроматограммы, нижняя хроматограмма соответствует зоне стеринов на ТСХ-пластинке, хроматограмма над ней – зона производных стеринов, которая при плохом разделении накладывается, что может вызвать искажение результатов.

ваться методикой по определению спредов и жировых смесей нельзя [3]. Необходима дополнительная стадия концентрирования определенного количества жира (не менее 2,5 г) для дальнейших исследований.

Методика извлечения жира

Навеску исследуемого продукта рассчитывали таким образом, чтобы количество извлекаемого жира из нее составляло не менее 2,5 г. Навеску продукта помещали в коническую колбу на 250 мл, добавляли дистиллированную воду, объемом в 2 раза большим, чем масса навески и этиловый спирт, объемом в 2 раза меньше навески пробы. Данную смесь нагревали до температуры 40°С перемешивали, добавляли 25 мл диэтилового эфира, интенсивно встряхивали в течение 1 мин, предварительно закрыв колбу стеклянной крышкой. Затем приливали 25 мл гексана, ставили на встряхиватель на 20 мин. Верхний гексаново-эфирный слой сливали в делительную воронку, а водно-молочную эмульсию экстрагировали трижды тем же гексаново-эфирным раствором, сливая верхний слой в ту же делительную воронку. Водно-молочную эмульсию количественно переносили в центрифужные патроны и центрифугировали в течение 20 мин при 5000 об/мин, затем сливали верхний слой в делительную воронку с гексаново-эфирной смесью.

В сухую коническую колбу емкостью 250 мл, предварительно взвешенную, выливали слой гексана и эфира из делительной воронки, и упаривали эту смесь при температуре 60°С. Колбу с жиром взвешивали. Затем проводили щелочной гидролиз полученной жировой фракции с последующим экстрагированием неполярным растворителем, выделением стериновой фракции из неомыляемых веществ методом тонкослойной хроматографии. Определение разделенных стеринов проводили методом газовой хроматографии аналогично, как и для продукции с высоким содержанием жира.

Результаты исследований и их обсуждение

Как видно из таблицы, ЖК состав молочного жира не постоянен. Изменчивость состава молочного жира, как известно, обусловлена сезонными колебаниями, особенностями питания коров, их породой и технологическими аспектами. Переменность состава растительных жиров связана с климатическими факторами, особенностями возделывания сельскохозяйственной культуры, ее сортом, зрелостью семян к моменту уборки и др.

Наиболее изучено содержание в жирах лауриновой ($C_{12:0}$), миристиновой ($C_{14:0}$), пальмитиновой ($C_{16:0}$), стеариновой ($C_{18:0}$), олеиновой ($C_{18:1}$), линолевой ($C_{18:2}$) кислот. Поэтому именно эти кислоты многие авторы рассматривают [9–11] в качестве критериев идентификации натуральности молочного жира. Нами установлено, что разница по содержанию этих кислот в натуральных и фальсифицированных продуктах (рис. 2 а, б, в) не превышает 10%,

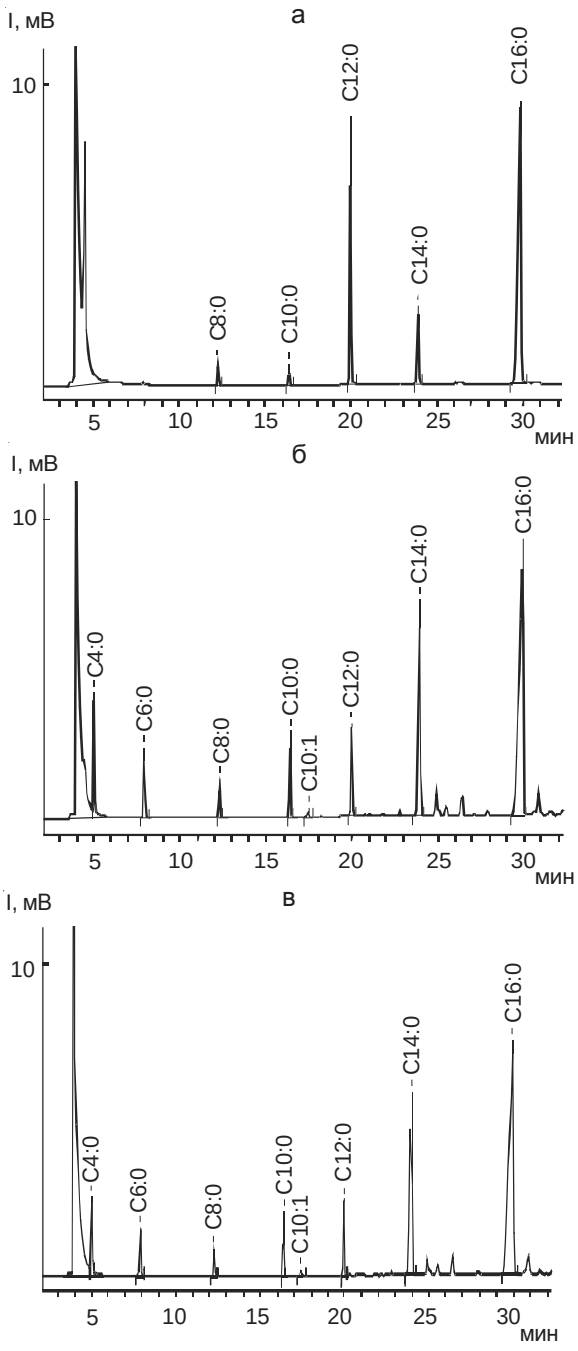

Рис. 2 Хроматограмма жирно-кислотного состава растительного (а), сливочного (б) и фальсифицированного сливочного масла с добавлением растительного масла (в). Рядом с кислотой приведена ее концентрация.

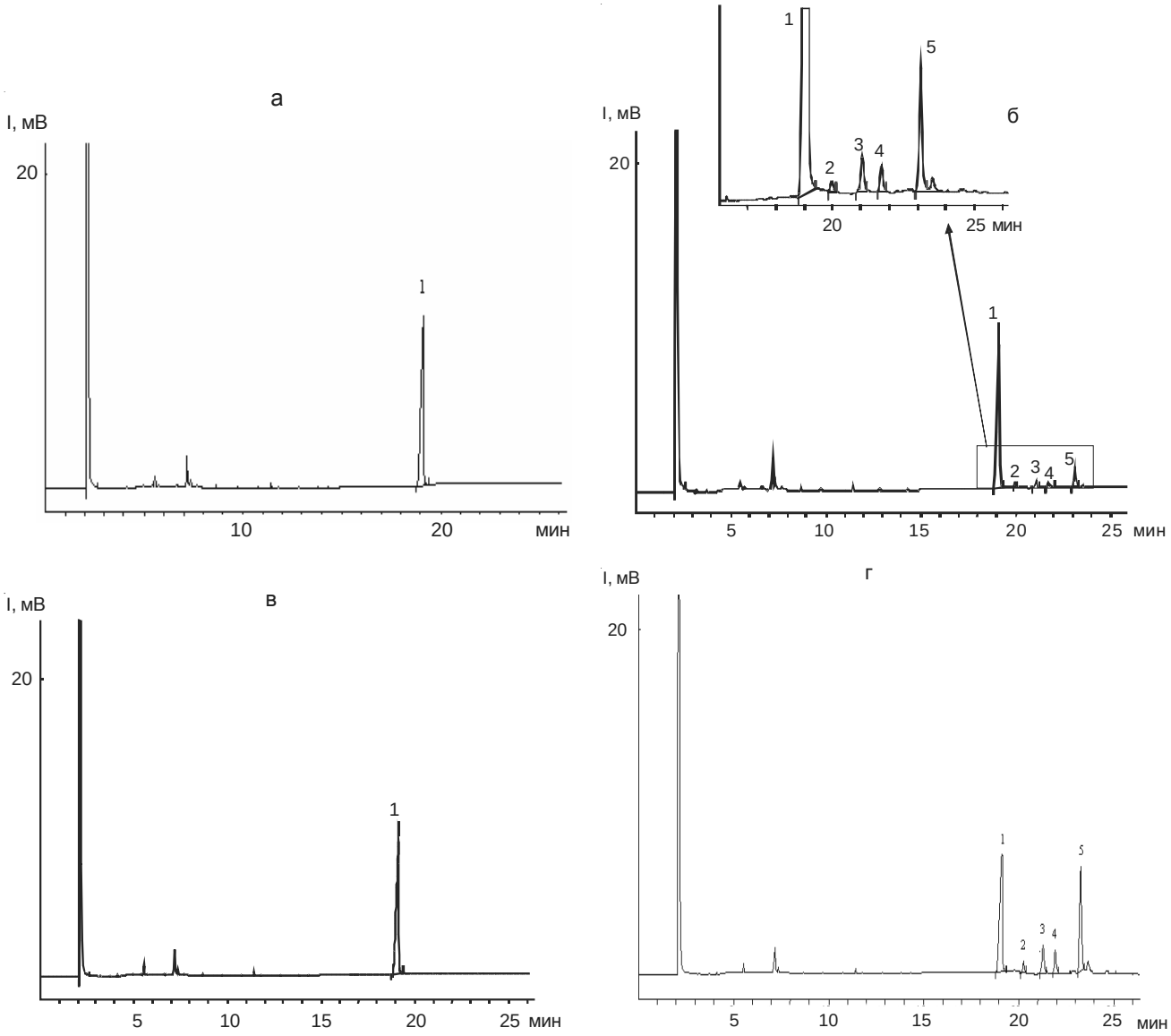

Рис. 3 Хроматограмма стериновой фракции сливочного масла (а), фальсифицированного сливочного масла добавлением растительного масла (б), сливочного мороженного (без добавки растительного жира) (в), мороженного с добавкой растительного жира (г). Пики: 1 – холестерин, 2 – брасикастерин, 3 – кампастерин, 4 – стигмастерин, 5 – β-ситостерин.

поэтому предпочтительнее провести идентификацию по бутановой кислоте ($C_{4:0}$).

Для выявления фальсификации молочного жира хроматографический метод определения ЖК состава может использоваться только при условии количественного определения бутановой кислоты ($C_{4:0}$) с использованием внутреннего стандарта. На рис. 2 а, б, в приведены типичные хроматограммы оливкового, сливочного масел и фальсификата. Регистрацию выходного сигнала осуществляли с помощью программно-аппаратного комплекса "Мультихром для Windows, версия 1,5х". Только в сливочном масле содержание бутановой кислоты (6,1±0,5%) входит в интервал концентраций (мас. %), характерных для молочного жира (4,7–6,5%) [5]. В фальсификате (рис. 2 в.) содержание масляной кислоты заниженное (3,7±0,3%), в растительном масле эта кислота отсутствует.

Типичные хроматограммы представлены соответственно на рисунках: оливкового масла (рис.2 а, изотермический режим), сливочного масла (рис. 2 б) и фальсифицированного сливочного масла (рис. 2 в).

При содержании растительных добавок < 20% анализом жирно-кислотного состава фальсификацию не всегда удается выявить достоверно, что связано с достаточно широкими границами содержания кислот в молочном жире.

Фальсификацию можно выявить, установив состав стериновой фракции хроматографическим методом при проведении идентификации стеринов по их временам удерживания в аналогичных хроматографических условиях. Наличие на хроматограмме пика бета-ситостерина свидетельствует о присутствии растительных жиров в продукции. Другие фитостерины дополнительно подтверждают наличие жиров немолочного происхождения.

Типичная хроматограмма стеринового состава сливочного масла и фальсификата соответственно представленны на рис. 3 а и б.

Присутствие на хроматограмме пиков со временем удержания, характерным для бета-ситостерина, высота составляет больше, чем 2% полной шкалы, свидетельствует о наличии бета-ситостерина в исследуемой пробе, т.е. подтверждает наличие растительного жира в исследуемом продукте. Наличие на хроматограмме пиков других фитостеринов – кампастерина или стигмостерина также подтверждает этот вывод.

Натуральное сливочное масло имеет на хроматограмме только пик холестерина.

Хроматограммы фальсифицированного и не фальсифицированного мороженого представлены на рис. 3, в и г.

Хроматографические методы определения жирнокислотного состава и состава стериновой фракции могут быть взаимноуточняющими при определении фальсификации молочной продукции.

Выводы

Таким образом, предложена методика хроматографической идентификации молочной продукции с низким содержанием жира, включающая стадию концентрирования жира экстракцией водно-молочно-спиртовой эмульсии гексаново-эфирной смесью для последующего хроматографического определения стериновой фракции.

С целью установления стеринового состав для очистки образцов методом ТСХ предложена подвижная фаза с оптимальным соотношением гексан : этилацетат (от 65 : 35 до 60 : 40 об %), а также хлороформ : этилацетат (95 : 5 об %). Также уточнено количество наносимого образца на ТСХ пластинку, которое не превышает 0,1 мг неомыляемых веществ, что эквивалентно 1 г образца масло-жировой продукции.

Литература

1. *ДСТУ* ISO 5508-2001 “Жири та олії тваринні і рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот”.
2. *ГОСТ* 30623-98 “Масла растительные и маргариновая продукция. Метод обнаружения фальсификации”.
3. *ДСТУ* ISO 18609-2004 “Жири тваринні і рослинні та олії. Метод визначення вмісту неомильних речовин з використанням екстрагування гексаном.”
4. *ДСТУ* ISO 3594-2001 “Жир молочний. Виявлення рослинного жиру методом газорідинної хроматографії стеринів (Контрольний метод).”
5. *ДСТУ* ISO 6799-2002 “ Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення складу стеринової фракції. Газо-хроматографічний метод”.
6. *ДСТУ* ISO 3596-1-1998 “Визначення вмісту неомильних речовин з застосуванням екстракції діетиловим ефіром.”
7. *ГОСТ* Р 51471-99 “Жир молочний.Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов”.
8. *Рудаков О.Б., Полянский К.К., Алексюк М.П.* Качественная идентификация молочного жира по хроматографическим данным // Журн. аналит. химии. – 2002. – 57, № 12. – С. 1267–1275.
9. *Кириллова Л.Г., Алексюк М.П., Батищева Л.В.* Метод определения фальсификации сливочного масла // Переработка молока. – 2005. – № 1. – С 14.
10. *Рудаков О.Б., Полянский К.К.* Развитие метода интерпретации хроматограмм животных жиров // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. – № 10. – С. 40–42.
11. *Боев А.И., Никитина С.Ю., Полянский К.К.* Способ идентификации сливочного масла методом газовой хроматографии // Сыроделие и маслоделие. – 2001. – № 2. – С. 42–43.
12. *Полянский К.К., Голубева Л.В., Долматова О.И.* Определение жирно-кислотного состава молочного жира и его фальсификации // Сыроделие и маслоделие. – 2002. – № 1. – С. 10.