

Ф.О. ЧМИЛЕНКО, Н.П. МІНАЄВА, Л.П. СИДОРОВА

ОСОБЛИВОСТІ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТРАНС-ІЗОМЕРІВ ЖИРНИХ КИСЛОТ В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

Розроблена хроматографічна методика ідентифікації масложирової продукції на вміст транс-ізомерів, що включає стадію пробопідготовки метилуванням жирних кислот з газохроматографічним детектуванням або в тонкому шарі.

Сучасний ринок харчових продуктів пропонує недосвідченому споживачеві широкий вибір вітчизняних і імпортованих продовольчих товарів. З них найбільш вживаних в нашому раціоні є жири і масла. Різноманітність продукції, що виставляється, «ненав'язлива» реклама, використання барвистої упаковки дозволяють споживачеві сміло віддати перевагу тому або іншому продукту. З'явилися і нові продукти, що не випускалися раніше в нашій країні, або були привезені з-за кордону.

Останнім часом на ринку України присутня значна кількість фальсифікованої продукції. При вступі України в СОТ особливого місця набувають питання харчової хімії, особливо контроль якості продуктів харчування і її сертифікація. Відсутність стандартів України (ДСТУ) по багатьом позиціям, примушує хіміків-аналітиків, гігієністів, токсикологів розробляти нові методики аналогічно ISO – 1900–2000.

Найчастіше фальсифікують молочні продукти (масло, вершки, сметана, сири, молоко згущене і сухе, морозиво та ін.). Як показує практика, для фальсифікації найчастіше використовують гідрогенізовані рослинні жири або їх суміші з іншими маслами. Тому для молочної і масложирової галузей харчової промисловості України особливо актуальними стали питання підвищення якості продукції, вдосконалення методів її контролю і стандартизації.

Відомо, що при гідруванні рослинних жирів утворюються жирні кислоти у формі транс-ізомерів, на відміну від природних ненасичених жирних кислот, які мають цис-конфігурацію і засвоюються організмом людини. Видно, транс-конфігурація молекули енергетично вигідніша при існуючих технологіях гідрування жирів. Сучасні дослідження показують, що транс-ізомери жирних кислот (ТІЖК) не засвоюються в нашому організмі природним біологічним шляхом. Накопичуючись в організмі людини, знижують імунітет, порушують роботу ферментів, клітинних мембран, сприяють збільшенню рівня холестерину в крові. Їх дію підви-

щує ризик онкологічних і серцево-судинних захворювань і виникнення діабету [1,2].

Тому органами охорони здоров'я Європейського союзу рекомендується по можливості зменшувати рівень споживаних з їжею транс-ізомерів (ТІ). У низці країн вводяться норми на вміст ТІЖК в харчових продуктах, що містять масла і жири. Так в країнах Євросоюзу в спредах і маргаринах транс-ізомери допускаються на рівні не більше 2%, в Росії і Україні % – не більше 8%. У США крім того існує вимога при маркуванні продуктів харчування указувати про наявність в них транс-ізомерів.

Враховуючи, що ринок України заповнений гідрованими жирами, в яких середній вміст транс-ізомерів за даними зарубіжних фірм-виробників може досягати 49%, українцям необхідно здійснювати контроль за вмістом транс-ізомерів в масложирових продуктах на стадії їх державної санітарно-епідеміологічної експертизи. В даний час розглядається питання про необхідність розробки нормативного документа на вміст транс-ізомерів жирних кислот в гідрованих рослинних жирах і харчових продуктах, що містять гідровані жири. Введення в Україні такого ДСТУ дозволить обмежити можливість надходження на ринок продукції, небезпечної для здоров'я.

Оцінювання якості харчових продуктів слід розглядати в контексті змінюючихся запитів покупців, вимог законодавства і з погляду нових розробок в приладовому аналізі. Нові хроматографічні, мас-спектрометричні, спектроскопічні методи дозволяють детектувати кількість слідів транс-жирних кислот. Але залишаються проблеми пов'язані з неповним відділенням ізомерів транс-кислоти від її цис-ізомерів. Так само немає універсальних методів визначення для всіх зразків масложирової продукції. Рішенням цих і інших проблем визначення ТІЖК активно займаються в даний час.

Для визначення вмісту транс-ізомерів жирних кислот застосовують сучасні методи хромато-

мас-спектрометрії, капілярної газорідинної хроматографії (ГРХ) і вискоэффективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [3,4,8–11,15]. Іон-срібна ВЕРХ зазвичай використовується для розділення і визначення транс 18:1 ізомерів в частково гідрованих маслах і молочних жирах [16,17]. Застосовуються також гібридні методи: метод газової хроматографії у поєднанні з методом тонкошарової хроматографії [5,7] газова хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням використовується після попереднього метилювання жирних кислот [12–14].

Зараз, задовільні результати аналізів для жирних кислот жирів, що містять транс-жирні кислоти, отримує газова хроматографія (ГХ), використовуючи капілярні колонки, з надзвичайно полярною цианосиліконовою нерухомою фазою. Точніші аналізи транс-жирних кислот можуть бути отримані за допомогою гібридних методів: газовою хроматографією з AgNO_3 тонкошаровою хроматографією або AgNO_3 рідинною хроматографією і газохроматографічною мас-спектроскопією [5].

Спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР) стала однією з більшості багатообіцяючих методів визначення органічних структур, забезпечуючи корисні дані для аналізу жирного кислотного складу харчових масел. Головною перевагою ЯМР є те, що ідентифікація кожної жирної кислоти здійснюється за допомогою визначення специфічних сигналів. Жирнокислотний склад ідентифікують за допомогою ГХ, транс-жирні кислоти ідентифікує ^{13}C ЯМР спектроскопія. Результати, отримані ^{13}C ЯМР методом, достатньо близькі до отриманих ГХ [6].

Для кількісної оцінки цис- і транс- ізомерів жирних кислот використовуються також методи інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії, Метод визначення ТІЖК % ІЧ-спектроскопія з Фур'є-перетворенням, який заснований на властивості ненасичених сполук з ізольованим транс-етиленовим зв'язком давати в ІЧ-спектрах смуги поглинання в області $960\text{--}990\text{ см}^{-1}$ і дозволяє встановити сумарний вміст ТІ [18,19]. ІЧ пропонує перевагу простоти і швидкості, але низька межа виявлення – 5% і відсутність детальної інформації обмежують його використання. Необхідну детальну інформацію про жирні кислоти отримують методами ГРХ, але визначується кількість транс-ізомерів може бути занижена в результаті С18:1 позиційного перекриття. Пропонуються різні комбіновані методи, що дозволяють вирішувати ці проблеми.

Метою даної роботи є розробка методики ідентифікації ТІЖК в масложирових продуктах.

Методика передбачає виділення жиру з проби молочних продуктів з низьким вмістом жиру (менше 50%), лужний гідроліз тригліцеридів до вільних жирних кислот з подальшим отриманням реакцією етерифікації метилових ефірів жирних

кислот за допомогою метилату натрію, і здійсненні хроматографічного дослідження. Визначення ТІ виконується методом газової хроматографії з розділенням на капілярній колонці в ізотермічному режимі з полум'яно-іонізаційним детектуванням

Експериментальна частина

Апаратура: хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот, в т.ч. транс-ізомерів здійснювалося нами на газорідинному хроматографі "Shimadzu" GC – 14 В з полум'яно-іонізаційним детектором. Капілярна колонка $\text{SP}^{\text{TM}}\text{-2560}$ (сорбент – бісцианопропілполісилоксан), завдовжки 100 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм, товщиною нерухомої фази 0,2 мкм (24056). Температури інжектора і детектора – 220°C , термостата колонки – 180°C , ізотермічний режим. Газ носій – гелій (25 см/с). Об'єм проб, що вводиться, – 0,5 мкл, ділення потоку 100:1. Тиск газу-носія на вході в інжектор 0,2 МПа, розподіл потоку на вході в колонку 1/20 (скидання в атмосферу 19/20 частин потоку на виході з інжектора). Аналіз жирнокислотного складу масел з визначенням вмісту і співвідношення цис-, транс-ізомерів жирних кислот виконувався на колонці фірми (SUPELCO 595 North Harrison Road, Bellefont, PA 16823-0048 USA). Для якісної ідентифікації використовували стандартні зразки метилових ефірів жирних кислот, що містять транс-ізомери корпорації SUPELCO (Кат. № 47792; Кат. № 47199; Кат. № 46905; Кат. № 46951; Кат. № 47885). Для кількісного оцінювання використовували метод внутрішньої нормалізації.

Методика експерименту

Визначення транс-ізомерів жирних кислот в масложировій продукції з високим (більше 50%) вмістом жиру (масло, спреди, маргарини, жири та ін.)

Пробопідготовка заснована на лужному гідролізі тригліцеридів і отриманням реакцією етерифікації метилових ефірів жирних кислот.

Відбирають навашку аналізованої проби (заздалегідь розплавлену) масою 50–100 мг, поміщають в скляну пробірку і розчиняють в 1 мл толуолу. У толуольний розчин вводять 1 мл метилату натрію в метанолі молярною концентрацією 1 моль/л, гріють до $70\text{--}80^{\circ}\text{C}$, протягом 15–20 хв. Суміш охолоджують до кімнатної температури і додають 1 мл дистильованої води і 1 мл гексану, струшують протягом 10 с. Відокремлюють верхній органічний шар і поміщають в герметичну ємкість (віалу з тефлоновою пробкою) з безводним сульфатом натрію. Отриманий фільтрат вводили в хроматограф в кількості 1 мм^3 за допомогою мікрошприця.

Ідентифікація транс-ізомерів здійснювалася нами на газорідинному хроматографі "Shimadzu" GC – 14 В з полум'яноіонізаційним детектором за часом утримування ТІЖК в стандартних

хроматографічних умовах. Обробка хроматограм виконувалася з використанням програмного забезпечення Мультихром 1,5х для Windows (Амперсент, Росія). Як стандарт використовувалася суміш жирних кислот С18:1, С18:2, і С18:3 в розчині метилен хлориду.

Визначення транс-ізомерів жирних кислот в масложировій продукції з низьким (менше 50%) вмістом жиру (морозиво, молоко, сирки та ін.)

У досліджуваному продукті із вмістом жиру менше 50%, скористатися методикою визначення спредів і жирових сумішей не можна. Необхідна додаткова стадія концентрування певної кількості жиру (не менше 0,5 г) для подальших досліджень.

Методика концентрування жиру

Наважка досліджуваного продукту розраховується так, щоб кількість концентрованого жиру з неї складала не менше 0,5 г. Наважку продукту поміщають в конічну колбу на 250 мл, додають дистильовану воду об'ємом в 2 рази більшим за масу наважки і етиловий спирт, об'ємом в 2 рази меншим наважки проби. Дану суміш нагрівають до температури 40°C перемішують, додають 25 мл діетилового ефіру, інтенсивно струшують протягом 1 хв, заздалегідь закривши колбу скляною кришкою. Потім підливають 25 мл гексану, ставлять на струшувач на 20 хв. Верхній гексаново-ефірний шар зливають в діляльну воронку, а водно-молочну емульсію екстрагують ще тричі тим же гексаново-ефірним складом, зливаючи верхній шар в ту ж діляльну воронку. Водно-молочну емульсію кількісно переносять в центрифужні патрони і центрифугують протягом 20 хв при 5000 об./хв, потім зливають верхній шар в діляльну воронку з гексаново-ефірною сумішшю.

У суху конічну колбу на 250 мл, заздалегідь зважену, виливають шар гексану і ефіру з діляльної воронки, і упарюють цю суміш при температурі 60°C. Колбу з жиром зважують. Потім виконують лужний гідроліз отриманої жирової фракції і реакцією етерифікації отримують метилові ефіри жирних кислот.

Детектування розділених ТІ виконується методом газової хроматографії також як і для про-

дукції з високим вмістом жиру.

Визначення транс-ізомерів жирних кислот в масложировій продукції з попереднім ТШХ розділенням

Приготування метилових ефірів жирних кислот. Наважку зразка масою (100±5) г в скляному стакані поміщають в сушильну шафу при температурі 40–45°C і витримують до повного розшарування. Верхній жировий шар зливають і фільтрують через паперовий фільтр. Розплавлену жирову фазу добре перемішують. У скляну пробірку беруть піпеткою 2–3 краплі жиру, розчиняють їх в 1,9 см³ гексану. У розчин вводять 0,1 см³ розчину метилату натрію в метанолі концентрацією 2 моль/дм³. Після інтенсивного перемішування протягом 2 хв, реакційну суміш відстоюють 5 хв і фільтрують через скляну воронку, в нижній частині якої знаходиться шар знежиреної вати і 0,5–1,0 г моногідрату кислотно-сірчанокислого натрію.

Розділення на фракції метилових ефірів жирних кислот. Пластинку Сорбфіл (ПТСХ-АФ-В-УФ) витримують 1 год при t=105°C. На пластинку наносять стандартний розчин ТІЖК об'ємом 1 мкл і зразки проби у вигляді окремих крапок завдовжки 2 см, що сприяє поліпшенню результатів розділення. Розділення на фракції виконують використовуючи запропоновану рухому фазу з оптимальним співвідношенням гексан:діетиловий ефір (90:10 об./об.). Після цього підсушують пластинку протягом 5 хвилин на атмосферному повітрі і потім обприскують родаміном 6G і оцінюють в УФ світлі. Ділянки, що відповідають, транс- і цис- зв'язкам мононенасичених жирних кислот, відповідно, знімають за допомогою скальпеля і переносять в колбу. Додають 5 мл етилацетату і кип'ятять 15 хв із зворотним холодильником, фільтрують в пробірку (двічі), упарюють на роторному випарнику насуху, розчиняють пробу етилацетатом 200 мкл і вводять в хроматограф 1 мкл за допомогою мікрошприця.

Методика була використана для ідентифікації транс-ізомерів жирних кислот в жировій суміші, олії кукурудзяній нерафінованій та рафінованій, жири кондитерському для пампушок, маргаринах, печиві польському, олії пальмовій гідрогенізованій, кукурудзяному рафінованій і нерафінованій, горіхах,

Таблиця 1

Результати розрахунку транс-ізомерів жирних кислот в жировій суміші (1), маргарині (2), олії кукурудзяній нерафінованій (3), олії кукурудзяній рафінованій (4)

№ проби	Транс-ізомери олеїнової С18:1, лінолевої С18:2, С18:3 кислот	Час виходу, хв	Висота, мВ	Площа, мВ·с	Концентрація, %
1	С18:1транс	46,24	5,53	99,10	10,43
2	С18:1транс	46,40	16,81	215,94	6,81
	С18:2транс	49,71	1,50	13,41	0,42
	С18:2транс	50,43	4,10	53,08	1,67
	С18:2транс	50,85	3,33	37,12	1,17
3	С18:3транс	56,43	0,99	102,27	0,34
4	С18:3транс	56,47	0,95	96,30	0,29

какао. В таблиці наведені результати розрахунку транс-ізомерів жирних кислот, а на рис. 1–4 – приклади хроматограм, де зафіксована наявність транс-ізомерів жирних кислот: жирової суміші (1), маргарину (2), олії кукурудзяної нерафінованої (3),

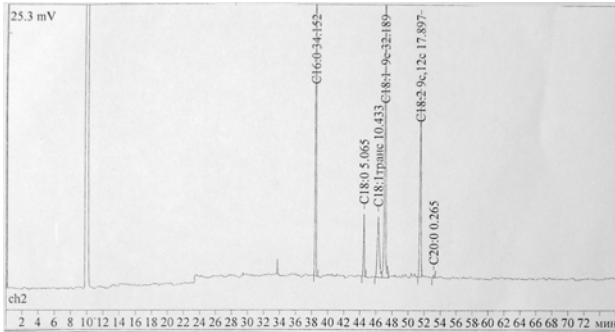


Рис. 1. Хроматограма жирової суміші

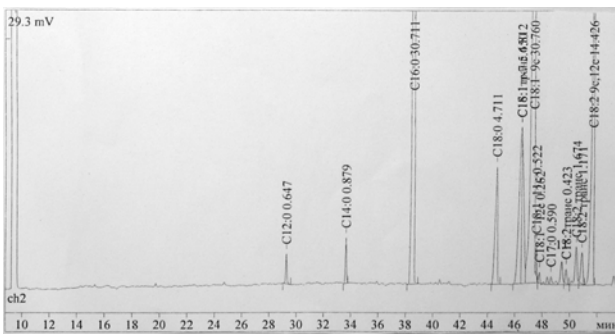


Рис.2. Хроматограма маргарину

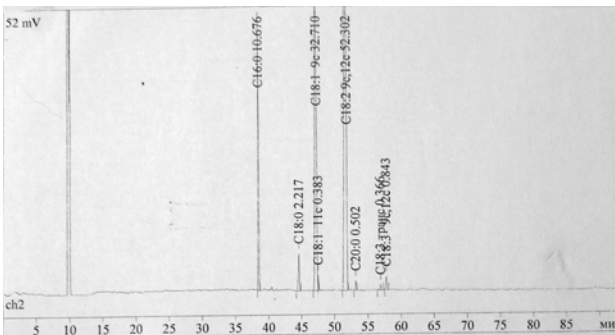


Рис.3. Хроматограма олії кукурудзяної нерафінованої

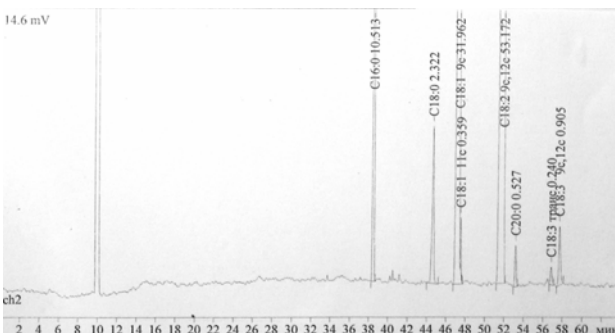


Рис. 4. Хроматограма олії кукурудзяної рафінованої

олії кукурудзяної рафінованої (4).

Обробка результатів

Відносну масу кожного компонента W (%), обчислюють за формулою

$$W_k = \frac{A_x}{A_t} 100,$$

де A_x – площа піка, відповідного компонента x , мм^2 ; A_t – сума площ всіх піків, виключаючи пік розчинника, мм^2 .

Обчислення масової частки транс-ізомерів жирних кислот

Для масел і жирів, рафінованих при високій температурі, а також для інших жирових продуктів, що не містять молочний жир, обчислюють масову частку ТІЖК як суму відносних мас С18:1 транс, С18:2 транс і С18:3 транс метилових ефірів жирних кислот. Максимально можливі піси транс-ізомерів, які можуть утворитися: С18:1 транс (1 пік), С18:2 транс (2 піки) і С18:3 транс (4 піки).

Для жирових продуктів, що містять молочний жир і/або частково гідрогенізовані масла і жири, масову частку ТІЖК обчислюють як суму відносних мас всіх метилових ефірів жирних кислот, що містять подвійні зв'язки в транс-конфігурації.

Висновки

Запропонована методика хроматографічної ідентифікації якості масложирової продукції на вміст транс-ізомерів, що включає стадію пробопідготовки метилюванням жирних кислот з газохроматографічним детектуванням або в тонкому шарі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дмитриченко М., Пилипенко Т. Экспертиза пищевых жиров, молока и молочных продуктов. – С.Пб.: Питер, 2003. – 352 с.
2. Павлова И.В., Долганова Н.В. Получение и применение заменителей молочного жира // Молочная промышленность. – 2006. – № 2. – С.54-55.
3. ГОСТ Р 25336-06 «Определение массовой доли изолированных трансизомеров жирных кислот». – 2006. – 24 с.
4. ISO 15304 2002 (E) Animal and vegetable fats and oils – Determination of the content of trans fatty acid isomers of vegetable fats and oils – Gas chromatographic method., 2002. – 20 p.
5. Ratnayake N.W.M. Overview of methods for the determination of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography, silver-ion liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry // J. of AOAC international. – 2004. – Vol.87. – № 2. – P.523-539.
6. Elaidic acid in rat liver identified by gas chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy / Sabarense C.M., Gonzalves M.I. de Almeida, Filho J.M. and others // European J. of Lipid Science and Technology. – 2006. – Vol.108. – № 5. – P.404-410.

7. *Methods* for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography / Cruz-Hernandez C., Deng Z., Zhou J. and other // *J. of AOAC International*. – 2004. – Vol.87. – № 2. – P.545-562.
8. *A rapid method for trans-fatty acid determination using a single capillary GC*/ Shirasawa S., Sasaki A., Saida Y. and others // *J. of Oleo Science*. – 2007. – Vol.56. – № 2. – P.53-58.
9. *Delmonte P., Rader J.I.* Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of trans fat // *Anal Bioanal Chem*. – 2007. – Vol.389. – № 1. – P.77-85.
10. *Determination of trans fatty acids and fatty acid profiles in margarines marketed in Spain.*/ Alonso L., Fraga M.J., Juarez M. and others // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* – 2000. – Vol.77. – № 2. – P.131-136.
11. *Influence of milk for presence on the determination of trans fatty acids in fats used for infant formulae* / Dioni-ci F., Golay P.A., Fay L.B. and others // *Anal. Chim. Acta*. – 2002. – Vol.465. – № 1–2. – P.395-407.
12. *Gas chromatography–mass spectrometry determination of metabolites of conjugated cis-9, trans-11,cis-15 18:3 fatty acid* / Destailatsa F., Sébédio J.-L., Berdeaux O. and others // *J. of Chromatography B*. – 2005. – Vol.820. – № 1. – P.15-22.
13. *ГОСТ Р 51486-99. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот.* – 1999. – 12 с.
14. *Muller A., Steinhilber H.* Recent developments in instrumental analysis for food quality // *Food Chem.* – 2007. – Vol.101. – № 3. – P.1136-1144.
15. *Buchgraber, M., Ulberth F.* Determination of trans octadecenoic acids by silver-ion chromatography-gas liquid chromatography: an intercomparison of methods // *J. AOAC-Int.* – 2001. – Vol.84. – № 5. – P.1490-1498.
16. *Johnson D.W., Trinh M.U.* Analysis of isomeric long-chain hydroxy fatty acids by tandem mass spectrometry application to the diagnosis of long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* – 2003. – Vol.17. – № 2. – P.171-175.
17. *Pierr. J.J.* Utilisation of reversed-phase high-performance liquid chromatography as an alternative to silver-ion chromatography for the separation of cis- and trans-C18:1 fatty acid isomers // *Chromatogr. A*. – 2002. – Vol.954. – № 1–2. – P.285-289.
18. *Rapid determination of total trans fat content by attenuated total reflection infrared spectroscopy: an international collaborative study* / Adam M., Mossoba M.M., Lee T. and others // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* – 2000. – Vol.77. – № 5. – P.457-462.
19. *Trans determination of edible oils by fourier transform near-infrared spectroscopy* / Hui Li, Van de Voort F.R., Ismail A.A. and others // *J. of the American Oil Chem. Soc.* – 2000. – Vol.77. – № 10. – P.1061-1067.

Надійшла до редакції 16.12.2011