

ПРИМЕНЕНИЕ 4-МЕТИЛСТЕРИНОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДОБАВОК РАСТИТЕЛЬНЫХ ЖИРОВ В МОЛОЧНОМ ЖИРЕ

© 2015 А. В. Карташева¹, С. А. Ефанов², Е. В. Грехнева³, И. Б. Кометиани⁴

¹ магистрант каф. химии
e-mail: exotdel@kursktelecom.ru

Курский государственный университет

² начальник экспертно-исследовательского отдела №1
e-mail: exotdel@kursktelecom.ru

Филиал ЭКС ЦЭКТУ

³ канд. хим. наук, доцент каф. химии
e-mail: grekhnyovaev@yandex.ru

⁴ канд. биол. наук, зав. каф. химии
e-mail: grekhnyovaev@yandex.ru

Курский государственный университет

Для идентификации добавок растительных жиров в молочном жире использованы сведения о различиях в механизме биосинтеза растительных и животных стериннов. Методом тонкослойной хроматографии на силикагеле предложена возможность обнаружения зоны 4-метилстериннов, в которой посредством газовой хромато-масс-спектрометрии идентифицирован цитростадиенол, являющийся промежуточным продуктом биосинтеза растительных стериннов.

Ключевые слова: газовая хромато-масс-спектрометрия, тонкослойная хроматография, стеринны, цитростадиенол.

Молочный жир является одним из основных компонентов, определяющих пищевую ценность молока и молочных продуктов. Из всех природных жиров молочный жир по химическому составу является самым сложным и уникальным.

Качественный и количественный состав основных жирных кислот, входящих в состав глицеридов молочного жира, достаточно изучен и служит одним из критериев при оценке его подлинности, закрепленным на уровне ГОСТ Р 52253-2004 «Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия». Поскольку известно, что молочный жир, несмотря на свой относительно постоянный состав, имеет особенность изменяться в зависимости от времени года, используемых кормов, географических особенностей местности, породы коров, незначительные отклонения от установленных в данном стандарте диапазонов требуют дополнительной проверки другими методиками.

Одной из них является методика, изложенная в ГОСТ 31979-2012 «Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стериннов», которая позволяет выявлять добавку растительных жиров по наличию растительных стериннов, извлечение которых основано на процедуре осаждения в виде дигитонинов. Основной проблемой при использовании данного стандарта является высокая стоимость дигитонина, в связи с чем он не нашел широкого применения.

Одной из возможных альтернатив в данном случае может быть использование газовой хромато-масс-спектрометрии после предварительной пробоподготовки исследуемого жира омылением со спиртовым раствором щелочи [Карташева и др. 2014].

В литературе описано применение тонкослойной хроматографии для обнаружения и идентификации стероидов. Наиболее простым ее вариантом является использование пластин с силикагелем. В частности, описано разделение неомыляемых веществ рафинированного растительного масла в системе гексан : диэтиловый эфир (7:3). В данном варианте можно идентифицировать три зоны, образованные 4-дезметилстеринами, 4-метилстеринами, 4,4-диметилстеринами, которые располагаются в соответствии с уменьшением их полярности. Последние две группы стероидов служат в биологических объектах, как правило, «сырьем» для синтеза 4-дезметилстероидов [Abidi 2001].

В методике, изложенной в ISO 12228, предлагается использовать гексан:диэтиловый эфир (1:1) как элюент, позволяющий разделить Δ^7 стероиды, Δ^5 стероиды, метилстероиды, и тритерпены.

Вместе с тем исследование механизма биосинтеза стероидов у животных, растений и грибов показывает, что преобразование 4,4-диметилстероидов в 4-дезметилстероиды у растений происходит через стадию образования 4-метилстероидов, в то время как при биохимических превращениях у грибов и животных 4-метилстероиды не образуются [Leo 2012]. Таким образом, выявление зоны 4-метилстероидов на хроматограмме может служить маркером для выявления добавки растительного жира в молочный жир.

В результате исследования жирнокислотного состава образцов сливочного масла, реализуемого в розничной торговой сети на предмет наличия жиров немолочного происхождения по ГОСТ Р 52253-2004 для исследования были выбраны продукты, реализуемые как масло сливочное, но с имеющим место отклонением от жирнокислотного состава с массовой долей молочного жира 22,9 (объект № 1) и 66,5 % (объект № 2), и сливочное масло, удовлетворяющее требованиям ГОСТ Р 52253-2004 (объект № 3) в части жирнокислотного состава. Дополнительно исследовалось растительное масло (объект № 4).

Извлечение неомыляемых веществ объектов № 1, 2, 3 проводили при помощи щелочного гидролиза с использованием спиртового раствора гидроксида калия с концентрацией 1 моль/л. Для анализа брали навеску массой около 10 г. В колбу с навеской вносили 50 см³ раствора щелочи и кипятили с обратным холодильником 1 час, охлаждали, добавляли 100 см³ дистиллированной воды и экстрагировали в делительной воронке неомыляемые вещества гексаном (трижды по 50 см³). Гексановый экстракт упаривали до 1 мл. Для растительного масла (образец № 4) использовали пробоподготовку с дигитонином по ГОСТ 31979-2012.

Разделение стероидов осуществляли на пластинах для тонкослойной хроматографии с алюминиевой подложкой, покрытых слоем силикагеля марки Silica gel 60 F254 (MERCK) без предварительной активации в системе растворителей гексан:диэтиловый эфир (1:1).

В качестве проявителя использовали раствор хлорного железа. 50 мг FeCl₃·6H₂O растворяли в 90 мл воды, прибавляли 5 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл концентрированной серной кислоты. Через 2–3 мин. полученную хроматограмму нагревали до 100°C. Стероиды при такой обработке дают пятна розово-сиреневого цвета [Кейтс 1975].

Исследование состава хроматографических зон проводили методом хроматомасс-спектрометрии (ГХ-МС) с использованием газового хроматографа Agilent 6850 с масс-селективным детектором Agilent 5975С в следующем режиме: колонка –

кварцевая капиллярная HP -5MS; температура колонки: начальная 100 °С, подъем до 280 °С, со скоростью 15 град/мин, выдержка 40 минут; температура интерфейса 290 °С; температура инжектора 290 °С; газ-носитель – гелий; постоянный расход газа через колонку 1,0 мл/мин.

Запись хроматограмм и регистрацию масс-спектров проводили в режиме по полному ионному току в диапазоне масс 50–450 атомных единиц. Идентификацию веществ осуществляли путем прямого сравнения спектров, зарегистрированных в вершинах хроматографических пиков, с библиотечными масс-спектрами и с учетом информационно-справочной таблицы ISO 12228.

Для исследования состава хроматографических зон неомыляемых веществ объектов № 1, 2, 3, экстракты, содержащие неомыляемые вещества, наносили в виде тонкой линии на стартовую линию пластины Sorbfil ПТСХ-П-А. По причине недостаточной толщины слоя сорбента на имеющихся пластинах использовали 3–4 пластины с целью получения нужного количества идентифицируемых веществ. Нахождение положения пятен на пластинах велось с использованием значения величин R_f , определенных после проявления.

Десорбцию идентифицируемых веществ проводили по методике, изложенной в ISO 12228.

В результате исследования неомыляемых веществ объектов, полученных после омыления со спиртовым раствором щелочи, а также стеиринов растительного масла, полученных осаждением дигитонином, тонкослойной хроматографией на силикагеле обнаружены от одного до четырех хроматографических зон (пятен). Наличие зоны с соответствующим значением величины $R_f \cdot 10$ для каждого объекта представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты исследования анализируемых веществ методом тонкослойной хроматографии

Объект, №	Зоны на хроматограммах в порядке возрастания $R_f \cdot 10$			
	1,6	2,0	2,7	3,4
1	–	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	–	+
4	+	+	+	–

Как видно из таблицы, в продуктах, реализуемых как масло сливочное, но с имеющим место отклонением в жирнокислотном составе от молочного жира (объекты № 1, 2), а также в растительном масле (объект № 4) присутствует зона с $R_f \cdot 10$ 2,7, которая не обнаруживается в образце сливочного масла (объект № 3).

Соединения, идентифицированные методом газовой хромато-масс-спектрометрии и располагающиеся на месте хроматографических зон объектов № 2, 3, приведены в таблице 2. Исследование первой и второй зоны проводилось совместно по причине близкого расположения на хроматограмме. Полученные хроматограммы приведены на рисунках 1, 2.

Результаты исследования хроматографических зон объектов № 2 и № 3
методом газовой хромато-масс-спектрометрии

Rf*10	Группа соединений	№	Время выхода, мин	Идентифицированные соединения	
				Объект №2	Объект №3
1,6	4,4-дезметилстерины	1	19,2	Холестерин	Холестерин
2,0		2	21,4	Кампастерин	
		3	22,1	Стигмастерин	
		4	23,5	β-ситостерин	
2,7	4-метилстерины	5	27,5	Цитростадиенол	Не обнаружено
3,4	4,4-диметилстерины	6	24,0	Ланостерин	Ланостерин
		7	24,0	Циклоартебол	

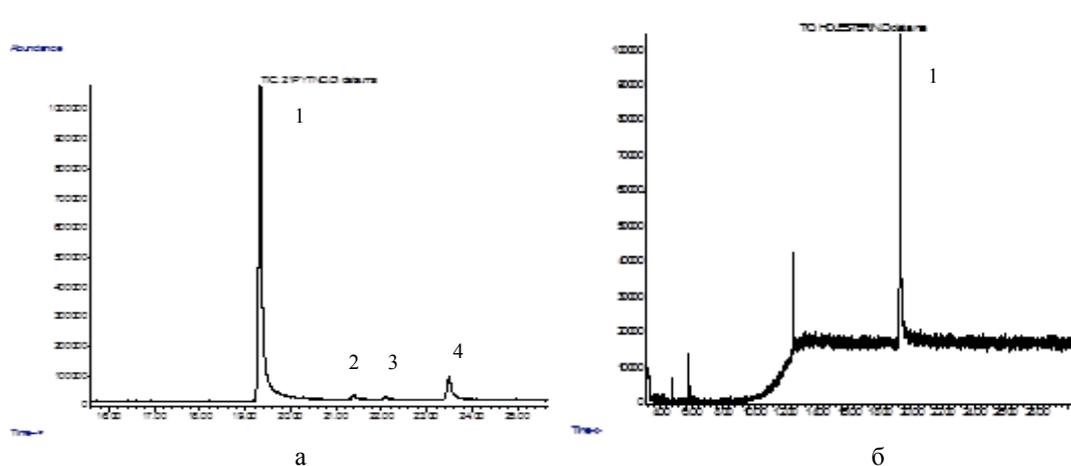


Рис 1. Хроматограммы экстрактов хроматографических зон (пятен): (а) зон с Rf*10 1,6 и 2,0 объекта №2, (б) зон с Rf*10 1,6 и 2,0 объекта №3.

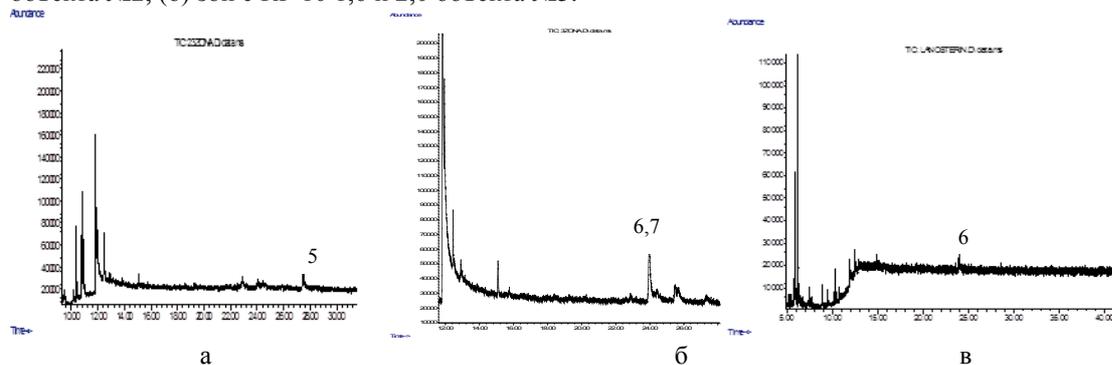


Рис 2. Хроматограммы экстрактов хроматографических зон (пятен): (а) зоны с Rf*10 2,7 объекта №2, (б) зоны с Rf*10 3,4 объекта №2, (в) зоны с Rf*10 3,4 объекта № 3

Для уточнения времени выхода были исследованы стерины, выделенные из растительного масла пробоподготовкой с дигитонином. Время выхода стерина, обнаруженного в растительном масле и их идентификация приведены в таблице 3, хроматограмма – на рисунке 3.

Таблица 3

Время выхода стеридов выделенных из растительного масла

№	Время выхода, мин.	Стериды	
1	21,4	кампастерин	24-метил холест-5-ен-3 β -ол
2	22,1	стигмастерин	24-этил холеста-5,22-диен-3 β -ол
3	23,5	β -ситостерин	24-этил холест-5-ен-3 β -ол
4	23,9	Δ 5 авеностерин	24(28)-этилиден холест-5-ен-3 β -ол
5	25,0	Δ 7 стигмастерин	24-этил холест-7-ен-3 β -ол
6	25,5	Δ 7 авеностерин	24(28)-этилиден холест-7-ен-3 β -ол
7	27,5	цитростадиенол	4-метилстигма-7,24(28)-диен-3-ол

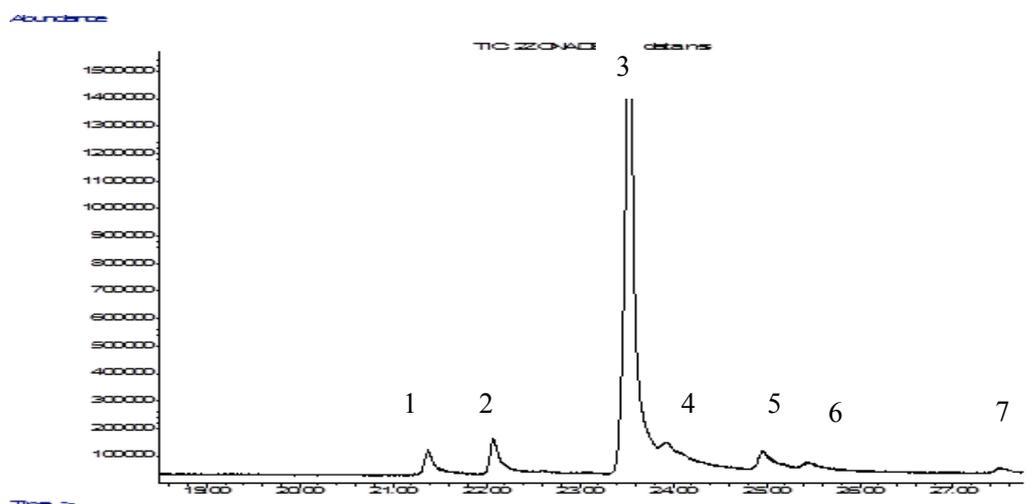


Рис. 3. Хроматограмма растительного масла

Таким образом, характерной чертой исследованных объектов, в состав которых входили как растительные, так и животные жиры, является наличие хроматографической зоны с R_f^*10 , равной 2,7, в составе которой идентифицирован 4-метилстерин – цитростадиенол, являющийся промежуточным продуктом биосинтеза ситостерола и стигмастерола из циклоартенола путем поэтапного удаления двух метильных групп при C4. Данный факт позволяет использовать наличие зоны 4-метилстеринов на пластине с силикагелем в качестве маркера, при исследовании сливочного масла на предмет фальсификации жирами растительного происхождения.

Библиографический список

- Abidi S.L.* Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils // *J. Chromatogr. A.* 2001. 935. P. 173–201 (Elsevier).
- Leo M. L.* *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods* / ed. by: Leo M. L. Nollet, Fidel Toldra- CRC Press, 2012.
- ISO 12228 «Animal and vegetable fats and oils – Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method».

ГОСТ 31979-2012 «Жир молочный. Метод обнаружения растительных жиров газожидкостной хроматографией стеринов».

ГОСТ Р 52253-2004 «Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия».

Карташева А. В., Ефанов С. А, Грехнева А. В., Кометиани И. Б. Исследование стеринов сливочного масла и спреда методом хромато-масс-спектрометрии // Auditorium: электронный научный журнал Курского государственного университета. 2014. №3. URL: auditorium.kursksu.ru/pdf/003-002.pdf (дата обращения: 14.03.2015).

Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / пер. с англ. докт. хим наук В.А. Вернера. М.: МИР, 1975.