

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СЫРОВ

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 04.03.01 Химия
очной формы обучения, группы 07001417
Нгуен Чан Тхао Хиен

Научный руководитель:
к.х.н, доцент
Дейнека Л.А

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	2
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	3
1.1 Общая характеристика сыров	3
1.1.1 Пищевая ценность.....	3
1.1.2 Классификация сыров.....	3
1.2 Химический состав сыров	5
1.2.1 Жирнокислотный состав сыров.....	5
1.2.2 Состав триацилглицеринов в сыре	10
1.3 Метод определения молочных жиров.....	14
1.3.1 Метод определения жирнокислотного состава	14
1.3.2 Метод определения триацилглицеринов в сыре.....	17
1.4 Метод установления подлинности сыров	19
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	24
2.1 Методика экстракции жиров	24
2.2 Объекты исследования.....	24
2.3 Методика установления подлинности сыров методом ВЭЖХ.....	26
2.3.1 Условие записи хроматограмм	26
2.3.2 Анализ хроматографического профиля.....	26
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
3.1 Определение жирности сыров	28
3.2 Установление подлинности сыров методом ОФ ВЭХЖ.....	31
3.2.1 Хроматографический профиль жира из сыров	31
3.2.2 Использование метода «отпечатков пальцев» для установления подлинности сыров	37
3.2.3 Использование метода «векторной модели» для установления подлинности сыров	39
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	44

ВВЕДЕНИЕ

Сыр – пищевой продукт, получаемый из молока некоторых животных (из коровьего, овечьего и др.). Этот продукт популярен и любим детьми и взрослыми во многих странах мира. Поэтому производство твердых сыров – весьма перспективный бизнес. Но молочный жир – недешевое сырье для настоящего сыра. Чтобы сделать свой продукт доступным для более широкого круга потребителей, производители активно используют современные технологии пищевой промышленности, а именно - вытесняют молочный жир растительными маслами. Зато цена становится более доступной, и продажи продукта растут. Недостаток дорогостоящих сыров всегда был серьезной экономической проблемой, которую решали путем частичной замены дорогостоящих жиров и масел недорогими маслами. При этом часто подмены неизвестны потребителям. И возникает соблазн полной замены животного молока растительными маслами.

Целью данной работы является аналитический контроль качества сыров.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- определение жирности сыров;
- определение хроматографического профиля сыров методом ОФ ВЭЖХ;
- использование метода «отпечатков пальцев» для установления подлинности сыров.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика сыров

Сыр – пищевой продукт, получаемый из сыропригодного молока с использованием свёртывающих молоко ферментов и молочнокислых бактерий или путём плавления различных молочных продуктов и сырья немолочного происхождения с применением солей-плавителей.

1.1.1 Пищевая ценность

Сыры отличаются высоким содержанием белков (до 25 %), молочного жира (до 60 %) и минеральных веществ (до 3,5 %, не считая поваренной соли). Белки сыра лучше усваиваются организмом, чем молочные белки. Экстрактивные вещества сыров благоприятно воздействуют на пищеварительные железы, возбуждают аппетит. Питательные вещества, содержащиеся в сыре, усваиваются организмом почти полностью (98—99 %). В сырах содержатся витамины А, D, E, B1, B2, B12, PP, C, пантотеновая кислота и другие. В зависимости от содержания жира и белка энергоценность сыра значительно колеблется. Сыр является как бы концентратом молока: белки, жиры, минеральные вещества содержатся в нём примерно в тех же пропорциях, высоко содержание в нём кальция и фосфора, которые находятся в сыре в оптимально сбалансированном соотношении.

1.1.2 Классификация сыров

Первый способ классификации сыра – по типу молока.

Гомеровский циклоп пользовался овечьим молоком, однако для этой цели прекрасно подходит и коровье, и козье молоко. Для нас наиболее привычны сыры из коровьего молока, тогда как овечьи (brebis, «овца») и козы (chevre, «коза») – редкость. Козы и овцы молока дают гораздо меньше, чем коровы, и организовать производство сыров из них под силу лишь небольшим фермерским хозяйствам с давними традициями сыроделия. Зато молоко коз и

овец значительно жирнее и калорийнее коровьего, в нем вдвое больше казеина – поэтому сыры из него получаются плотные, резкие на вкус и с долгим послевкусием, например, французские козьи сыры рокаматур, шабишу и пикодон. «Головки» овечьих и козьих сыров чаще всего небольшие, но форма их значительно разнообразнее. И, наконец, в Италии некоторые сыры, например, моццареллу, делают из молока буйволиц, которое по составу близко к коровьему молоку, но имеет повышенную жирность. То, из какого молока сделан сыр, сказывается на его вкусе и аромате (козьи, например, самые «вонючие»), на твердости, форме головки и способе употребления. Не вдаваясь в подробности, сразу оговоримся: настоящий сыр можно получить только из молока, содержащего казеин, только в этом случае оно при сквашивании становится густым – а это необходимо для производства сыра. Молоко других животных (кобылиц, оленей и ослиц) содержит альбумин, а потому при сквашивании остается жидким и больше подходит, например, для производства кумыса или сухого творога [1].

По внешнему виду сыры делятся на:

- Свежий сыр. Если сырную массу лишь слегка отжимают, иногда формуют, иногда нет, но никогда не выдерживают (такой сыр немного напоминает творог), мы получаем первую категорию — свежий сыр. Такие сыры очень популярны в Италии (маскарпоне, рикотта), Греции (фета) и Франции (прованский Brousse du Rove). Срок хранения их, естественно, очень мал — лучше съесть их сразу после изготовления.
- Мягкий сыр. Когда свежий сыр формуют, солят и отправляют на созревание, получают мягкий сыр. В результате выдержки на головке сыра образуется пикантная нежная корочка плесени, которую, как правило, съедают вместе с нежной мякотью. От характера этой корочки все мягкие сыры делят еще на две подкатегории: с «пушистой» корочкой и с отмытой корочкой.
- Мягкие сыры с «пушистой» корочкой. Корочка этих сыров образуется с помощью естественной съедобной белой плесени. Они обычно

нежные, маслянистые. К ним относятся, например, такие «королевские» сыры, как бри и камамбер. Для их производства в котел с молоком добавляют культуры плесневых грибов *Penicillium candidum*, реже *Penicillium camemberti*, или опрыскивают этими культурами головки сыра уже после формовки. В процессе созревания, который длится от 4 до 8 недель, эти грибки образуют белый пушистый слой плесени.

- Мягкие сыры с отмытой корочкой (обычно ярко-оранжевого цвета). В процессе созревания головки сыра регулярно обмывают рассолом, пивом, вином, сидром или водкой из виноградных выжимок. Эти сыры особенно популярны во Франции. Как правило, у них достаточно резкий запах и острый, но очень приятный вкус. К ним относятся, например, весьма именитые мюнстер, пон-л'эвек или бургундский эпуасс, а также немецкий лимбургский сыр [2].

1.2 Химический состав сыров

Сыры в среднем содержат 4,2% жира. В молоко жирные кислоты поступают как свободными, так и в связанной форме глицеридов или других липидов. Триацилглицериды, которые состоят из глицерола и трёх жирных кислот, составляют от 96 до 99%, в то время как натисвободные жирные кислоты приходится всего лишь от 0,1 до 0,4% молочного жира [3].

1.2.1 Жирнокислотный состав сыров

Жирные кислоты – это органические соединения, которые отличаются количеством атомов углерода и положением, а также количеством двойных связей. Так C16:0 *цис*9 – это жирная кислота с 16-ю атомами углерода и без двойных связей, C 18:1 – жирная кислота с 18-ю атомами углерода и одной двойной связью. Дополнение *цис/транс* и число за ним говорят о положении и виде двойных связей. По этим критериям жирные кислоты можно разделить на определённые группы (таблица 1.1.).

Таблица 1.1.

Классификация жирных кислот [4]

Насыщенные ЖК (SAT)	Нет двойных связей, например, C16:0
Ненасыщенные ЖК (UNSAT)	Одна или несколько двойных связей
Моноеновые ненасыщенные ЖК (MONO)	Одна двойная связь, например, C18:1
Полиеновые ненасыщенные ЖК (POLY)	Несколько двойных связей, например, C18:2
Короткоцепочные ЖК (SC)	C4 до C10
Среднецепочные ЖК (MC)	C12 до C16
Длинноцепочные ЖК (LC)	C17 до C22

Состав жирных кислот в молочных жирах изменяется за счет большого числа факторов, в том числе следующих:

- генетика молочного стада, порода коровы;
- стадия лактации коровы;
- состав рациона коровы, в том числе климатические условия, и применение дополнительных режимов кормления.

Эти факторы приводят к изменениям состава жирных кислот на протяжении периода лактации, между сезонами, и от региона к региону. Жирнокислотный состав сыров чрезвычайно сложный, в них насчитывается около 400 жирных кислот. Молочный жир содержит значительное количество жирных кислот с короткой цепью и относительно меньшее количество кислот C18, которые обнаруживаются в говяжьем и свином жире. Молоко является относительно бедным источником полиненасыщенных жирных кислот. Количество C18:2 и C18:3 в нем составляет порядка 3 и 1 % соответственно [5]. Жирные кислоты попадают в молоко частично с кормом, содержащим жирные кислоты с длинной цепью, в результате их микробного синтеза

или из запасов жира в организме. Остальные жирные кислоты синтезируются из жирных кислот с короткой цепью. Баланс между синтезом в молочной железе жирных кислот с короткой и средней цепью можно значительно изменить, манипулируя их питанием.

Насыщенные жирные кислоты большей частью содержатся в молочном жире (рис.1.1.). С14:0 и С16:0 – это две главные жирные кислоты в молоке.



Рис.1.1. Распределение жирных кислот в коровьем молоке (по Гаммеру, 1991)

Химический состав и свойства молока козы близки к составу и свойствам коровьего молока. Оно отличается лишь более высоким количеством белка, жира и кальция; содержит немало каротина, поэтому имеет бледно-жёлтую окраску. В жире козьего молока содержится больше каприновой и линолевой кислот, и шарики жира мельче, что способствует лучшему его усвоению организмом человека. Аминокислотный состав его

белков близок к аминокислотному составу белков женского молока, но мицеллы казеина крупнее, чем мицеллы казеина женского и коровьего молока и составляют 133 нм и выше. Казеин козьего молока содержит мало α -фракций (10–15 %), поэтому при сычужном свёртывании образует неплотный сгусток.

Превосходное пищевое качество молочных продуктов в значительной степени коррелирует с качеством молока: высокой концентрацией жирорастворимых витаминов и ω -3 жирных кислот, высоким содержанием конъюгированной линолевой кислоты (CLA). Доля жира в коровьем молоке типична: 3,3% - 4,4% [6]; козье и овечье молоко содержит приблизительно: 4,2% и 7,1% жира соответственно [7]. Жирность молока зависит от породы, питания, индивидуальных черт и периода лактации.

Полиненасыщенные жирные кислоты

Полиненасыщенные жирные кислоты, потребляемые жвачными животными, дегидрируются микроорганизмами в рубце. У коров, коз и овец доля молочных полиненасыщенных жирных кислот составляет всего ~ 3% от всех жирных кислот [8]; однако Strzałkowska и другие. [9] обнаружили более 4% полиненасыщенных жирных кислот в козьем молоке. В работе [10] обнаружили даже более 21% полиненасыщенных жирных кислот в молоке овец, получавших рапс. Преобладающей ω -3 жирных кислот в молочном жире большинства млекопитающих является α -линоленовая кислота. Молоко овец и коз обычно имеет меньшее значение отношения ω -6 : ω -3 и большую концентрацию CLA по сравнению с коровьим молоком.

Мононенасыщенные жирные кислоты

Доля мононенасыщенных жирных кислот (MUFA) близка в жирах овечьего, коровьего и козьего молока и может варьировать от 20% до 35%. Среди группы MUFA олеиновая кислота (C18: 1) имеет самое высокое содержание ω -9, которое характерно для молока большинства млекопитающих [11]. Коровье молоко является самым богатым источником олеиновой кислоты (24%), а содержание в козьем и овечьем молоке составляет

в среднем 18% всех жирных кислот [12]; однако некоторые авторы сообщают о более высокой концентрации (более 20% всех жирных кислот) в овечьем и козьем молоке [13]. В молоке жвачных также имеются относительно небольшие, но значительные вклады от других MUFA, таких как 14: 1 (около 1%), 16: 1 (около 1,5%) и очень нужная вакценовая кислота, которая является предшественником CLA в организме человека (1.5% -5%).

Насыщенные жирные кислоты

На насыщенные жирные кислоты в молоке жвачных приходится от 60% до 70% жирных кислот. Основным SFA в молочном жире большинства млекопитающих является C16: 0. Жир, присутствующий в овечьем и козьем молоке, является богатым источником жирных кислот средней цепи. В козьем молоке это: C6: 0, C8: 0 и C10: 0 жирные кислоты, в частности (табл. 1.2).

Таблица 1.2.

Профиль жирных кислот в козьем, овечьем и коровьем молоке [14]

Жирные кислоты	Коза	Овца	Корова
C4:0 бутановая	2,03	2,57	2,87
C6:0 капровая	2,78	1,87	2,01
C8:0 каприловая	2,92	1,87	1,39
C10:0 каприновая	9,59	6,63	3,03
C12:0 лауриновая	4,52	3,99	3,64
C14:0 миристиновая	9,83	10,17	10,92
C16:0 пальмитиновая	24,64	25,1	28,7
C18:0 стеариновая	8,87	8,85	11,23
18:1 –цис--9 олеиновая	18,65	20,18	22,36
18:2 цис-9, цис-12; линолевая	2,25	2,32	2,57
18:2 цис-9, транс-11; CLA	0,45	0,76	0,57
18:3 цис-9, цис-12, цис-15; - линоленовая	0,77	0,92	0,5
всего n-6	1,78	2,97	2,83
всего n-3	0,44	1,31	0,56
SFA	68,79	64,23	68,72
MUFA	24,48	29,75	27,4

Жирные кислоты	Коза	Овца	Корова
PUFA	3,7	4,82	4,05
n-6/n-3	5	2,31	6,01
AI	2,88	2,21	2,55
TI	3,17	2,49	3,22
Всего жиров	4,27	6,09	3,76

Обозначения:

SFA- насыщенная жирная кислота

AI- атерогенный индекс

PUFA- полиненасыщенные жирные кислоты

TI- тромбогенный индекс

MUFA- мононенасыщенные жирные кислоты

Доля жирных кислот, составляющих козий молочный жир, более чем в два раза выше, чем в коровьем молоке. Характерной чертой жирных кислот, отличающей козье молоко от коровьего и овечьего молока, является соотношение между лауриновой C12:0 и каприновой кислотами C10:0 (менее 0,5 и более 1 в коровьем молоке). Это важный показатель, так как он может использоваться для обнаружения фальсификаций козьего молока коровьим молоком [15]. Более высокая концентрация жирных кислот C6:0, C8:0 и C10:0 в овечьем и козьем молоке по сравнению с молоком коров придает особый аромат молоку этих маленьких жвачных животных. Кроме того, эти жирные кислоты могут оказывать благоприятное действие на здоровье человека, препятствуя росту бактерий и вирусов, а также они растворяют отложения холестерина. Существует 28 потенциальных изомеров CLA, из которых румская кислота (C18:2 цис-9, транс-11) доминирует в молочном жире. Исследования показывают, что CLA проявляет иммуностимулирующие, антигипертензивные, антиканцерогенные и антиатерогенные свойства и способствует снижению массы тела.

1.2.2 Состав триацилглицеринов в сыре

Жиры, триглицериды, триацилглицерины (сокр. ТАГ) – органические вещества, продукты этерификации карбоновых кислот и трёхатомного спирта

глицерина. В живых организмах выполняют, прежде всего, структурную и энергетическую функции: они являются основным компонентом клеточной мембраны, а в жировых клетках поддерживают энергетический запас организма. Наряду с углеводами и белками, жиры — один из главных компонентов питания.

Сто восемьдесят один вид ТАГ был идентифицирован: при этом 79 из них были насыщенными, 44 мононенасыщенными, и 58 полиненасыщенными. Большинство ненасыщенных ТАГ [16] содержало только одну ненасыщенную жирную кислоту в молекуле, 41 ТАГ содержал две и 5 ТАГ имели все три жирные ненасыщенные кислоты. *Bornaz и др.* [17] показали 26 молекулярных видов ТАГ, которые содержали линоленовую кислоту. В другой работе показано только 9 типов ТАГ. В таблице 1.3. приведены результаты точности количественного анализа ВЭЖХ образца молочного жира овцы.

Разделение ТАГ жиров коровьего, овечьего и козьего молока методом ВЭЖХ приведены на рис. 1.2 – 1.4.

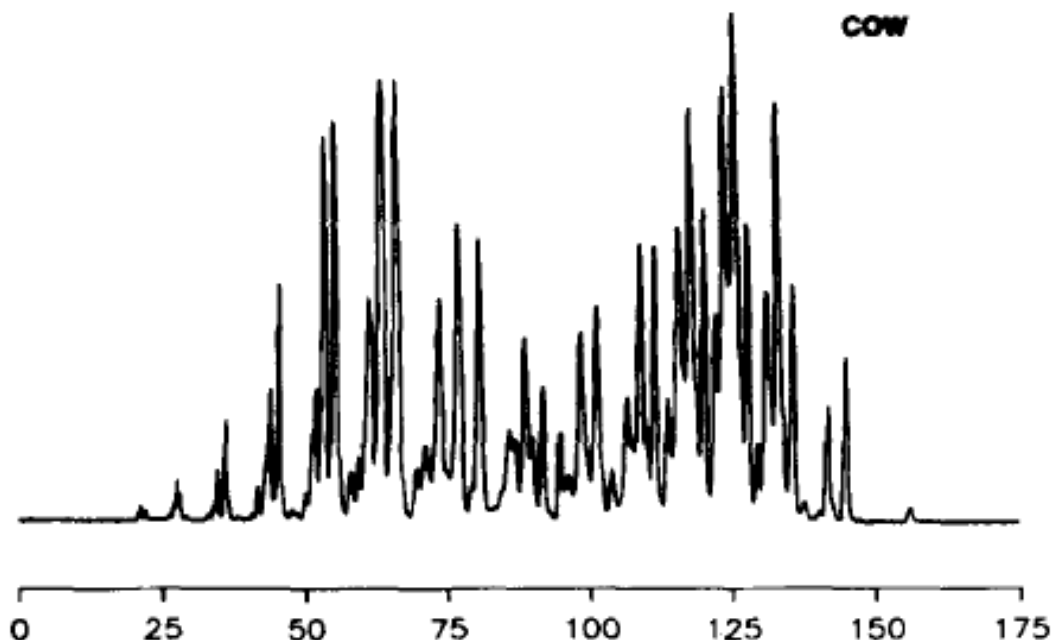


Рис 1.2. Разделение ТАГ жиров коровьего молока методом ВЭЖХ [17]

Определения триацилглицеринов в жирах молока методом газовой
хроматографии [17]

ECN	TG	%M	ECN	TG	%M	ECN	TG	%M
28	CaCaP	90,96	34	BuMP	100	37,8	CyMO	37,37
	CyCyLa	9,31		BuOO	59,18		Clao	34,83
30	CCC	54,13	35,8	CLLn	40,82	37,8	LaMLn	27,8
	BuLaM	45,87		CCO	47,56		CaPO	61,89
31,8	BuLaO	100	35,8	CMLn	26,94	38	LaMLn	17,72
32	BuMM	100		35,8	CyLaO		25,49	CyMV
			CML			9,68		
33,6	CyLLn	100	35,8	CaMO	100	38	BuPS	100
33,8	CyMLn	73,36	35,8	BuPO	100	39,8	CMO	58,24
	CCL	26,64		36	BuPP		100	CMVa
33,8	CaLaO	62	37,8	CyMO	37,37	40	CMP	64,1
	CaML	38		CLaO	34,83		LaMM	35,9
33,8	BuPL	53,38	37,8	LaMLn	27,8			
	BuMO	46,62						

Vi= масляная, *Ca*=капроновая, *Cy*=каприловая, *C*=каприновая,
La=лауриновая, *M*=миристиновая, *Pd*=n-пентадекановая
P=пальмитиновая, *Ро*=пальмитолеиновая, *S*=стеариновая, *O*=олеиновая,
Va=вакциновая, *L*=линолевая, *Ln*=линоленовая

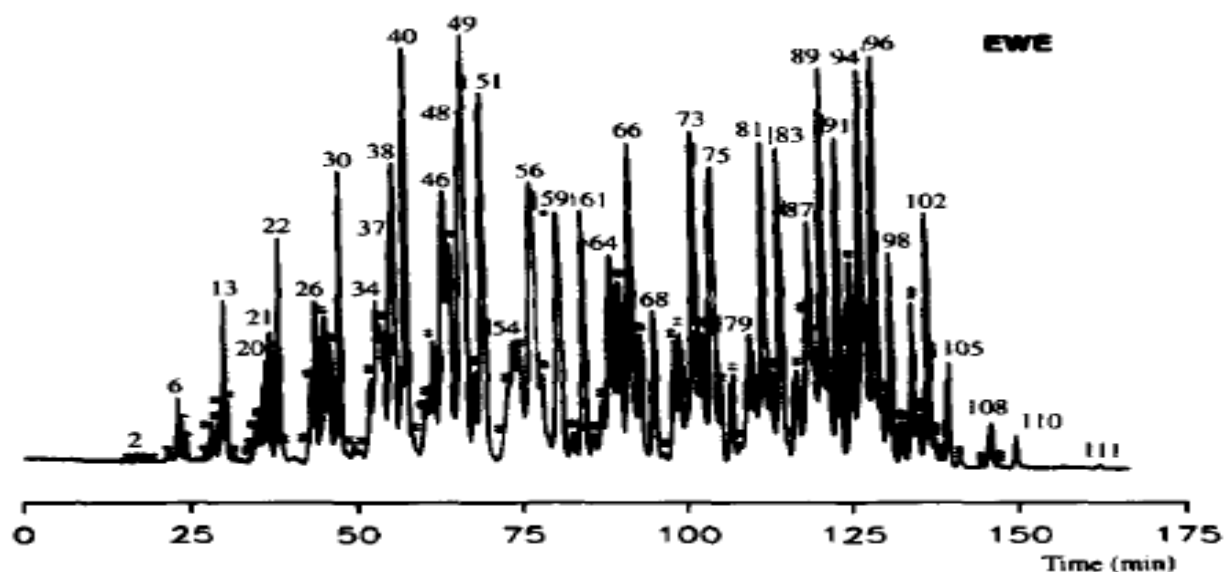


Рис 1.3. Разделение ТАГ жиров овечьего молока методом ВЭЖХ [17]

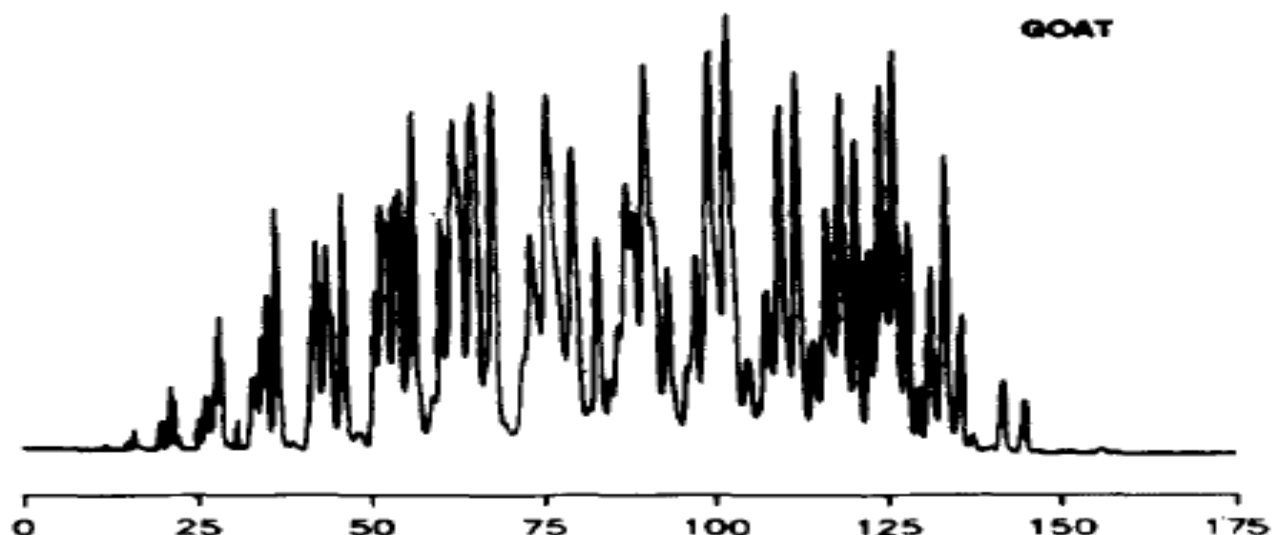


Рис 1.4. Разделение ТАГ жиров козьего молока методом ВЭЖХ

Сравнение состава ТАГ молочного жира коровы, овцы и козы.

В овечьем молоке содержится больше всего короткоцепочных жирных кислот в ТАГ по сравнению с козьим и коровьим молоком (18,23%, 15,21% и 10,83%, соответственно). Среднецепочные жирные кислоты в ТАГ в процентном соотношении для овечьего, козьего и коровьего молока убывают в той же закономерности соответственно (32,84%, 30,83% и 25,16%). Это связано с тем, что овечье и козье молоко обогащены ненасыщенными жирными кислотами, такими как олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты [18]. Коровье молоко содержит больше всего длинноцепочных жирных кислот в ТАГ (главным образом, миристиновую и пальмитиновую кислоты) до 64,01%. Коровье молоко содержит наибольшее количество ТАГ с ненасыщенными жирными кислотами, в то время как количество ненасыщенных кислот в ТАГ в козьего и овечьего молока практически равно (55,31%, 51,13% и 51,12%). Жир коровьего молока имеет самый высокий процент полиненасыщенных длинноцепочных кислот в ТАГ; однако, козий молочный жир является самым богатым в полиненасыщенными средневязкими ТАГ.

1.3 Метод определения молочных жиров

1.3.1 Метод определения жирнокислотного состава

Оптическая спектроскопия широко используется для контроля качества молока и молочных продуктов. Благодаря скорости и высокой точности анализа, спектроскопия в средней инфракрасной (ИК) области (4000–400 см⁻¹ или 2,5– 50 мкм) принимается в качестве лабораторного стандарта определения жира и общего белка в молоке для крупных молочных заводов и специализированных аналитических центров. Однако высокотехнологичная автоматизация, применяемая для проведения анализов в средней ИК области, приводит к повышению стоимости оборудования и делает данный метод недоступным для малых предприятий. Разработка новых методов анализа молока, позволяющих производить измерения со сравнимо высокой точностью и доступных для небольших предприятий и ферм, является одной из главных целей современной молочной промышленности. Анализ в области ближнего ИК (БИК) излучения от примерно 780 до 2500 нм (0,78–2,5 мкм) может служить экономически эффективной альтернативой средней ИК-области. Однако характерные для компонентов молока полосы поглощения здесь проявляются на фоне сильно доминирующего поглощения воды и эффектов рассеяния света, что осложняет анализ и снижает его точность. Анализ молока в диапазоне видимого света и прилегающей коротковолновой БИК-области (Вид/КВ-БИК, 400–1100 нм) весьма привлекателен, благодаря широкой доступности недорогих источников света, детекторов и оптики, что существенно снижает стоимость спектральных анализаторов. В то же время, анализ молока в этой области осложняется сильным эффектом рассеяния света коллоидными частицами жира и белка, более чем на два порядка преобладающим над интенсивностью их полос поглощения [19].

Исследователи обычно пытаются устранить наблюдаемые в спектрах эффекты рассеяния с помощью математической корректировки данных, но из-за чрезвычайной слабости полос поглощения молока в Вид/КВ-БИК этот

подход не приносит желаемой точности анализа. В связи с этим, спектроскопия Вид/КВБИК в настоящее время практически не применяется для анализа молока и молочных продуктов, а научные публикации на эту тему очень редки. В то же время, спектрально наблюдаемое рассеяние света в области от 400 до 1100 нм несет в себе информацию как о количестве, так и о размере коллоидных частиц, которая может быть использована для количественного анализа жира и белка.

В случае сырых жиров обычно достаточно сведений о содержании в них триглицеридов, жирных кислот, токоферолов, стерина. Распределение указанных компонентов является важным критерием, определяющим различия между жирами. Оценка продуктов их переработки должна включать также определение полярных веществ и продуктов окисления. Для глубокого анализа используют спектроскопические, хроматографические и рентгеноструктурные методы. За рубежом методики анализа с помощью газовой или жидкостной хроматографии утверждены в качестве стандартных.

Основное преимущество газовой хроматографии перед жидкофазной в следующем: благодаря во много раз большей скорости диффузии молекул разделяемых компонентов в газовой фазе и соответственно большей скорости сорбции и десорбции можно значительно ускорить продвижение проявителя и тем самым ускорить процесс разделения. Так, анализ пятикомпонентной смеси летучих углеводородов, спиртов, жирных кислот, эфиров и т. д. на газовом хроматографе с высокочувствительным детектором (например, с пламенно-ионизационным) может быть проведен за пять минут. Для этого определяют качественный и количественный состав жирных кислот (или их эфиров), образующихся после гидролиза жирного масла, с приложением типичной хроматограммы и с указанием допустимых пределов содержания каждого из компонентов (в процентах от суммы). Если в фармакопейной статье не приведены иные условия, метиловые эфиры жирных кислот могут быть получены одним из следующих методов:

Метод 1. В колбу вместимостью 25–50 мл с конусовидным дном и притертой пробкой помещают 2–3 капли испытуемого жирного масла, добавляют 1,0 мл метанола и 1 каплю ацетилхлорида. Смесь аккуратно перемешивают и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Растворитель удаляют на роторном испарителе до объема смеси 0,1–0,15 мл, к остатку добавляют 0,2 мл гексана и перемешивают.

Метод 2. В пробирку вместимостью 5–10 мл с притертой пробкой помещают 2–3 капли испытуемого масла, прибавляют 1,9 мл гексана. В фармакопейной статье может быть указан другой растворитель или смесь растворителей. Растворение рекомендуется проводить при температуре от 40 до 60 С, если в фармакопейной статье не указано иначе. К раствору добавляют 0,1 мл 2 М раствора натрия метилата в метаноле. Смесь интенсивно перемешивают в течение 2 мин и дают отстояться. 1 мкл приготовленного раствора метиловых эфиров жирных кислот вводят в испаритель подходящего газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором и проводят анализ в следующих условиях: колонка стеклянная или из нержавеющей стали длиной 2–3 м с внутренним диаметром 2–4 мм, заполненная диатомитовым носителем для газовой хроматографии, промытым кислотой (типа хроматон N-AW) с размером частиц 125–200 мкм с нанесенными 5–15 % полиэтиленгликольсукцината или полиэтиленгликольадипината; температура термостата колонок – 180⁰–190⁰С; для анализа жирных масел, содержащих низкомолекулярные (С6 – С12) жирные кислоты, производят градиентный нагрев термостата колонок от 100⁰ до 185⁰С со скоростью 6–8 С/мин.; температура испарителя 250⁰С; температура детектора 200⁰С; скорость потока газа-носителя (азота или гелия) – около 30 мл/мин.

Хроматографическая процедура может быть также выполнена с использованием капиллярной стеклянной или кварцевой колонки длиной от 10 до 30 м и внутренним диаметром от 0,2 до 0,8 мм с неподвижной фазой полицианопропилметил-фенилметилсилоксан или полиэтиленгликоль 20М

(толщина пленки от 0,1 до 0,5 мкм); температура термостата колонок – от 160⁰ до 200⁰С или градиентный нагрев от 170⁰ до 230⁰ С со скоростью 3 С/мин.; температура испарителя и детектора 250⁰С; скорость газа носителя (гелия) – от 1 до 1,3 мл/мин.; деление потока 1:100 или 1:50 (с учетом внутреннего диаметра используемой колонки). Время анализа – около 50 мин (примерно в 2,5 раз превышающее время удерживания пика метилолеата), рис. 1.5.

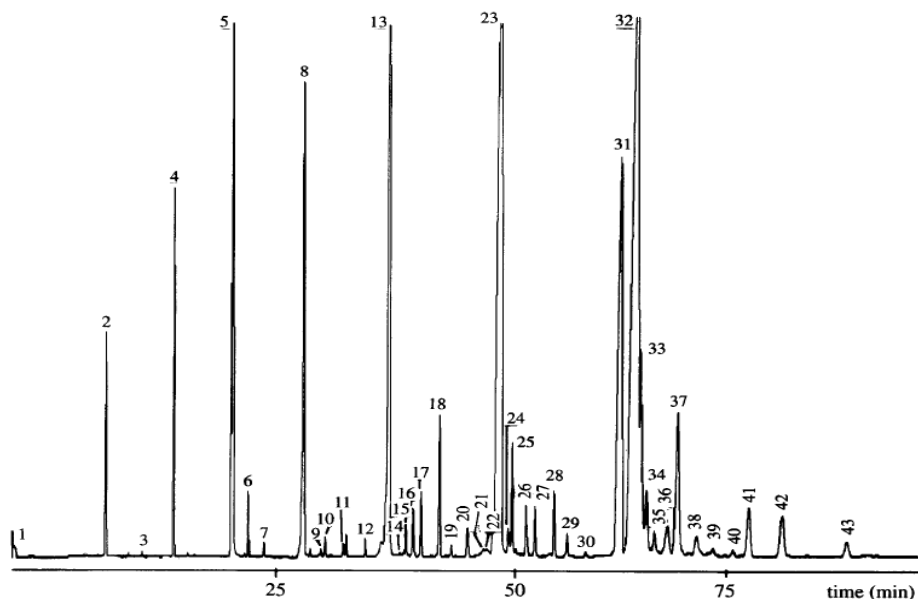


Рис 1.5. Газо-жидкостной хроматографический анализ метиловых эфиров молочной кислоты овечьего молока [20]

1.3.2 Метод определения триацилглицеринов в сыре

При анализе «профиля липидов» масел достаточно широко используются как газовая хроматография (ГХ), так и жидкостная (ВЭЖХ). Разделение липидов в ВЭЖХ можно проводить и без предварительной пробоподготовки и омыления липидов, используя вариант с обращенными фазами (ОФ ВЭЖХ) и неполярным растворителем. Единственным затруднением этого метода является то, что для идентификации пиков приходится использовать неселективные детекторы, в частности, испарительный детектор светорассеяния (ELSD). Такой детектор не обладает линейностью отклика, и с целью устранения этого недостатка используются добавки в образец холестерина, образующего молекулярные ассоциаты с

триглицеридами, а также нитрата серебра для повышения чувствительности анализа. В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C4, C8, C18 и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

Как правило, система растворителей в ОФ-ВЭЖХ содержит слабый компонент, ацетонитрил и сильный компонент, либо хлороформ (9), ацетон (8), изопропанол (10), пропионитрил (12), дихлорметан / дихлорэтан (4: 1) (7), этанол/гексан (4), воду (13) или трет-бутилметилловый эфир (14). В стационарной фазе была использована C18 колонна.

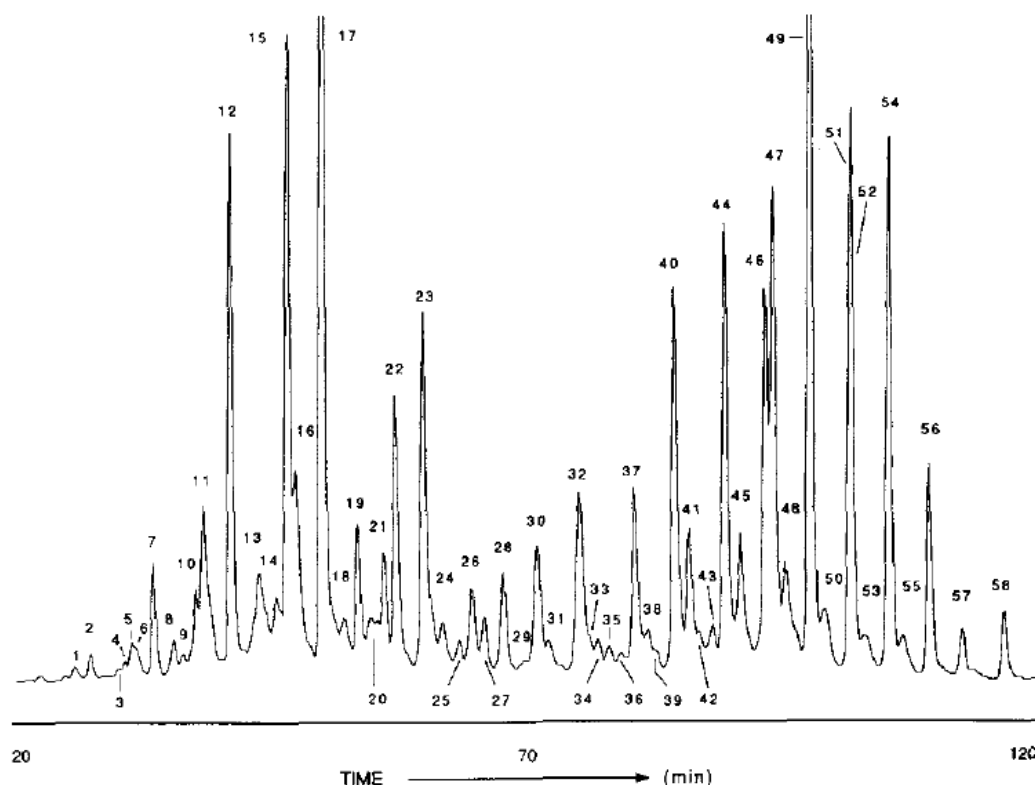


Рис. 1.6. Разделение триацилглицеринов методом ОФ-ВЭЖХ с использованием испарительного светорассеяния детектирования молочного жира [21].

1.4 Метод установления подлинности сыров

Исторические исследования для выявления примесей:

- число омыления (или Число Кэттстерфера) – связано со средним молекулярным весом жирных кислот;
- йодное число – связано со степенью ненасыщенности жирных кислот;
- показатель преломления – зависит от степени ненасыщенности жирных кислот;
- значение по методу Поленске – относится, как правило, к жирным кислотам с соотношением концентраций C8:0, C10:0 и C12:0;
- число Рейхерта-Мейссля – связанное, в основном, с жирными кислотами с соотношением концентраций C4:0 и C6:0;
- значение Киршнера – C4:0

Результаты испытания считаются удовлетворительными, если используются образцы чистого молочного жира и есть примеси. Однако на результаты этих испытаний влияет значительное естественное изменение в молочных жирах, что приводит к их неточности. Так как не было других доступных методов исследования, по результатам которых можно было бы получить результаты лучше, последние и стали основой для раннего пищевого законодательства.

С появлением газовой хроматографии стало возможным использовать более сложные методы исследования для обнаружения примесей (фальсификации).

Изначально показатель содержания масляной кислоты использовался для обнаружения примесей в молоке коров, овец, коз, крупного рогатого скота, и, в меньшей степени, верблюдов. Однако, для уровней масляной кислоты в молочных жирах характерны большие естественные различия, так что только значительные примеси будут находиться вне естественного диапазона изменения. Кроме того, такая методика означает, что уровни масляной

кислоты могут быть занижены, если анализ проводится недостаточно тщательно.

Можно провести анализ полного профиля жирных кислот, в то время как для определения растительных масел, где есть явные изменения в концентрации ненасыщенных жирных кислот, это очень удобно, то обнаружить частично гидрогенизированные растительные масла со степенью ненасыщенности подобно молочному жиру – очень трудно. Кроме того, трудно определить источник примеси из-за возможно разной степени гидрирования масел. Это также касается животных жиров, которые по составу больше похожи на молочные жиры.

Это стало причиной разработки стандарта IDF и ISO, основанного на анализе неповрежденных (интактных) триглицеридов, а не на компонентах жирных кислот (Международный стандарт ISO 17678, IDF 202 (2010)). За счет использования интактных триглицеридов анализируется, каким образом три жирных кислоты. Поскольку синтез триглицеридов не является случайным процессом, но обусловлен специфичностью ферментов, получаемые триглицериды будут характеризовать источник. Кроме того, используемые короткие колонны показывают разделение на основе числа атомов углерода (сумма углеродов в трех жирных кислотах), а насыщенные и ненасыщенные триглицериды с тем же числом атомов углерода не отличаются. Это означает, что натуральные масла и гидрогенизированные масла имеют такие же характеристики по реакции и не будут усложнять анализ.

На основе метода газовой хроматографии специалистами ВНИИМСа разработана и включена в ГОСТ Р 52253–2004 "Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия" методика установления фальсификации жировой фазы масла и масляных паст растительными жирами по соотношению массовых долей некоторых эфиров жирных кислот и их сумм, характерных только для молочного жира. Фальсификацию жировой фазы масла из коровьего молока жирами немолочного происхождения

устанавливают по результатам сравнения полученных соотношений массовых долей метиловых эфиров жирных кислот с соотношениями, представленными в таблице 1.4.

Следует отметить, что для осуществления хроматографических методов установления фальсификации жировой фазы молочных продуктов требуются дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный персонал. Как правило, такие методы - прерогатива специализированных лабораторий или испытательных центров.

При организации технического контроля на предприятии, где вырабатывают продукты, содержащие растительный жир, целесообразно использовать более простые методы, воспроизводимые в условиях производственной лаборатории. Наиболее приемлемые для этих целей методы, основанные на определении констант (чисел) молочного жира. Одно из них – число Рейхарта-Мейсля, которое характеризует содержание в 5 г жира низкомолекулярных водорастворимых летучих жирных кислот.

Таблица 1.4.

Границы соотношения массовых долей метиловых эфиров жирных кислот в молочном жире

Пальмитиновой (C16:0) к лауриновой (C12:0)	От 5,8 до 14,5
Стеариновой (C18:0) к лауриновой (C12:0)	От 1,9 до 5,9
Олеиновой (C18:1) к миристиновой (C14:0)	От 1,6 до 3,6
Линолевой (C18:2) к миристиновой (C14:0)	От 0,1 до 0,5

Суммы олеиновой и линолевой к сумме лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой должны быть равны от 0,4 до 0,7. Молочный жир в отличие от растительных содержит большое количество масляной и капроновой кислот и потому имеет высокое значение числа Рейхарта-Мейсля. Оно варьирует от 20 до 37 и зависит от климатических зон, сезона года, условий содержания и кормления животных, породы коров, периода лактации. Но, несмотря на существенные колебания, число Рейхарта-Мейсля у

молочного жира значительно выше, чем у любого растительного жира (таблица 1.5.), что позволяет использовать этот показатель для определения фальсификации жировой фазы молочных продуктов.

Определение числа Рейхарта-Мейсля положено в основу методик, разработанных специалистами ВНИИМСа: методика выполнения измерений массовой доли немолочных жиров в разновидностях коровьего масла (сливочного и топленого) с комбинированной жировой фазой, методика выполнения измерений содержания растительного жира в сырном продукте. Методика выполнения измерений содержания растительного жира в плавленом сырном продукте [22]

Таблица 1.5.

Параметры нескольких источников жиров

Жир	Число Рейхарта-Мейсля, мг КОН
Молочный:	От 20 до 37
Растительное масло:	
Подсолнечное	До 0,6
Рапсовое	До 0,8
Кукурузное	От 0,3 до 2,5
Соевое	От 0,5 до 0,8
Кокосовое	От 6,0 до 9,0
Пальмовое	От 0,1 до 1,5
Пальмоядровое	От 4,0 до 7,0
Арахисовое	От 0,3 до 1,8
Оливковое	От 0,2 до 1,0
Хлопковое	От 0,2 до 1,0

Эти методики аттестованы, внесены в Федеральный реестр и рекомендуются к использованию при производственном контроле сырных, плавленых сырных продуктов, спредов.

Еще одна константа, по которой молочный жир отличается от растительных жиров, - йодное число (таблица 1.6.). Оно характеризует содержание ненасыщенных жирных кислот в жире и выражается в граммах

йода, присоединенного по месту разрыва двойных связей в молекулах жирных кислот, в 100 г жира.

Таблица 1.6.

Значение йодного числа

Жир	Йодное число, г йода/100 г жира
Молочный	От 25 до 46
Растительное масло:	
Подсолнечное	От 125 до 136
Соевое	От 120 до 140
Рапсовое	От 84 до 103
Кокосовое	От 7 до 12
Пальмовое	От 46 до 58
Пальмоядровое	От 15 до 20

Однако тот факт, что наиболее распространенные в последнее время так называемые тропические масла наиболее близки по йодному числу к молочному жиру (пальмовое масло), несколько обесценивает этот метод оценки. Тем не менее, эффективность использования йодного числа с целью идентификации молочного жира может быть повышена, если применять показатель соотношений йодного числа и числа Рейхарта-Мейсля. В этом случае учитываются два признака отличия растительных жиров от молочного жира - количество непредельных соединений, которое в растительных жирах больше, чем в молочном жире, и содержание водорастворимых летучих жирных кислот, которое в растительных жирах меньше, чем в молочном жире. Благодаря этому соотношения данных показателей по своим значениям существенно удаляются от контрольных значений, получаемых для молочного жира.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Методика экстракции жиров

Для экстрагирования жиров из сыра мы взяли 500 мг сыра в химическом стакане. Добавили немного натрия сернокислого безводного. Потом добавили 20 мл ацетона. С помощью стеклянной палочки мы перемешали и измельчили сыр до однородного состояния в ультразвуковой бане в течении 15 минут (осторожно, чтобы вся вода не выпарилась в стакане).

После этого мы отфильтровали получившуюся смесь с помощью фильтровальной бумаги. Из полученного раствора мы отогнали ацетон на вакуумном ротационном испарителе. После того как мы отогнали ацетон, взвесили получившийся жир. Зная массу сыра, мы посчитали процентное отношение жира в сыре.

$$\% \text{oils} = \frac{m_{\text{oils}}}{m_{\text{cheese}}} * 100$$

Сравнили с результатом на этикетке продукта

2.2 Объекты исследования

В работе были исследованы 19 сортов сыра, которые представлены в таблице 2.1.

Таблица.2.1.

Объекты исследования

№	Типа сыра	Место покупки	Цена (руб)
1	Костромской	Мираторт	506
2	Гильзитер премиум	Лента	412
3	Брынза	Рынок	-
4	Пармезан	Рынок	-
5	Ламбер	Линия	590

№	Типа сыра	Место покупки	Цена (руб)
6	Российский	Лента	300
7	Василенко	Линия	239
8	Тильзитер ольденбургер	Линия	620
9	Эдам карлов двор	Линия	429
10	Голландский	Лента	393
11	Белебеевский	Лента	524
12	Топленое молоко	Лента	350
13	Пармезан 45% карлов двор	Лента	576
14	Пошехонский	Лента	649
15	Российский молодой	Лента	700
16	Российский доры	Лента	275
17	Масдам	Лента	929
18	Качиотто	Линия	540
19	Российский классический	Лента	720

ТАГ обозначали по общепринятой схеме, указывая буквами радикалы кислот без дифференциации их положения в молекуле. Буквенные обозначения радикалов кислот: М – миристиновая (C18:0), Л – линолевая (C18:2^{9Z12Z}), О – олеиновая (C18:2^{9Z}), П – пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0). Формула, например, Л₂О обозначает ТАГ с двумя радикалами линолевой кислоты и с одним радикалом олеиновой кислоты.

Для расчета факторов удерживания триглицеридов прежде всего необходимо использование величины мертвого времени (t_0). «Мертвое» время колонки рассчитывали по удерживанию серии ТАГ, предполагая, что факторы удерживания (k) в ряду М₃ – М₂П – МП₂ – П₃ увеличиваются на одну и ту же величину (инкремент) в логарифмических единицах.

2.3 Методика установления подлинности сыров методом ВЭЖХ

2.3.1 Условие записи хроматограмм

Для записи хроматографического профиля использовали:

- Хроматографическую систему, состоящую из насоса Altex 110А, крана-дозатора Rheodyne 7740 с петлей объемом 20 мкл и рефрактометрического детектора RI 410 (Waters).

- Хроматограф *Agilent 1200* с рефрактометрическим детектором

- Колонка: 4.6*250 мм *Kromasil 100-5C18* и 4.0*250 мм *Kromasil 100-5C18*

- Подвижная фаза: ацетон 100%

- Скорость подвижной фазы: 0.8 мл/мин

- Температура термостата: 35°C

- Масло растворяли в элюенте с концентрацией 10мг/мл

Хроматограммы регистрировали, хранили и обрабатывали ПО Мультихром 1.5 для детальной обработки использовали ПО *MagicPlot student*

2.7.1

2.3.2 Анализ хроматографического профиля

А. Визуально

На хроматограмме сыра (стандартный образец) видно три диапазона пиков, характеристических для жира сыров или молока. С помощью этой характеристики мы можем установить подлинность анализируемого образца.

В. Векторная модель

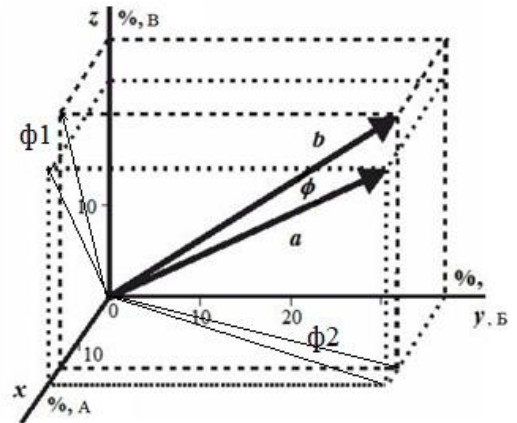
В спорных ситуациях применение расчетных методов обязательно. Можно предложить схему, в которой в трехмерном пространстве (измерения в котором соответствуют долям основных ТАГ из трех диапазонов (А-х, Б-у и В-з). Строится реперный вектор (по заведомо достоверному образцу); затем строится другой вектор, - с координатами, соответствующими доле площадей

этих пиков в исследуемом образце. Степень несовпадения двух векторов может быть оценена по углу между ними, определяемому по формуле:

$$\phi = \arccos \frac{x_i x_0 + y_i y_0 + z_i z_0}{\sqrt{(x_i^2 + y_i^2 + z_i^2) \cdot (x_0^2 + y_0^2 + z_0^2)}}$$

$$\phi_1 = \arccos \frac{x_i x_0 + z_i z_0}{\sqrt{(x_i^2 + z_i^2) \cdot (x_0^2 + z_0^2)}}$$

$$\phi_2 = \arccos \frac{x_i x_0 + y_i y_0}{\sqrt{(x_i^2 + y_i^2) \cdot (x_0^2 + y_0^2)}}$$



3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Определение жирности сыров

В работе для экстрагирования жира из сыра мы исследовали 2 варианта экстракции: ацетоном (рис. 3.1) и петролейным эфиром (рис. 3.2) различными порциями растворителей.

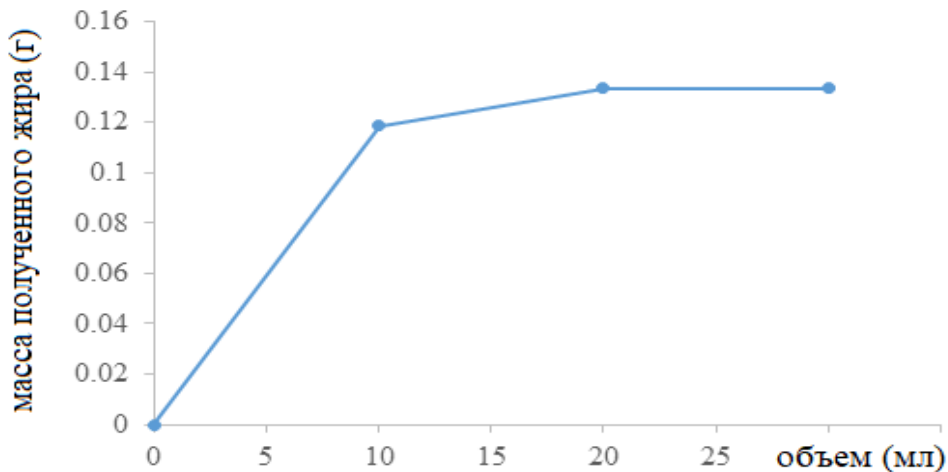


Рис. 3.1. Экстракция жира из сыра ацетоном порциями по 10мл

Полученные результаты показывают, что при экстрагировании жира из сыра ацетоном порциями по 10 мл для полной экстракции жира достаточно использовать 20 мл растворителя. Такие же результаты можно получить при экстракции петролейным эфиром.

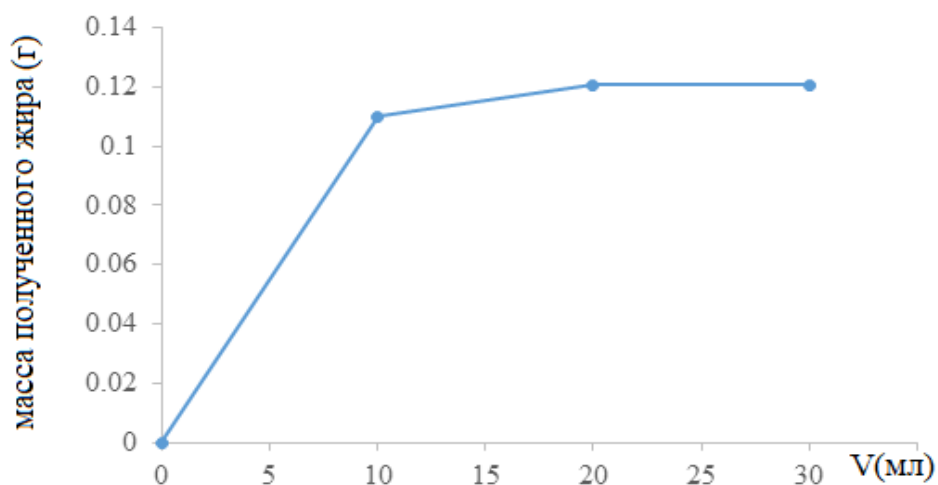


Рис. 3.2. Экстракция жира из сыра петролейным эфиром порциями по 10мл

Видно, что эффективность в обоих случаях одинакова. Однако при использовании петролейного эфира полученное масло более прозрачное и его легче использовать при фильтровании. Это не удивительно, поскольку при экстракции жира ацетоном вода в сыре может быть экстрагирована в масло. Поэтому мы выбрали петролейный эфир для экстрагирования жира из сыра. В итоге было установлено, что экстракции двумя порциями растворителя петролейным эфиром достаточно для практически полного извлечения жира из навески сыра. Полученные результаты при определении 19 сортов сыров представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Определение жирность различных сортов сыров

№	Сорт сыра	Масличность (на этикетке)	Масличность (%), среднее значение (n=5)
1	Костромской	26,3	26,00
2	Гильзитер премиум	25	24,12
3	Брынза	-	33,15
4	Пармезан	-	37,28
5	Ламбер	30	32,84
6	Россиский	29	28,09
7	Василенко	29	29,48
8	Тильзитер ольденбургер	28	27,07
9	Эдам карлов двор	26	25,99
10	Голландский	26	24,18
11	Белебеевский	26,5	25,87
12	Топленое молоко	23,4	25,08
13	Пармезан 45% Карлов двор	28	27,51
14	Пошехонский	27	26,44

№	Сорт сыра	Масличность (на этикетке)	Масличность (%), среднее значение (n=5)
15	Российский молодой	28	27,07
16	Российский доры	30	32,43
17	Масдам	27	27,21
18*	Качиотто	26	24,26
19*	Российский классический	29	28,17

Статистические параметры методики

Для контроля воспроизводимости параллельных результатов по определению жирности одного и того же сыра было выполнено 5 последовательных экстрагирований. В результате было определено, что максимальный доверительный интервал для масличности не превышал 0.20% для среднего значения из пяти параллельных результатов. При сопоставлении таких данных для различных растворов, приготовленных из различных навесок размолотых семян плодов одного растения, расхождения оказались немногим больше – до 0.9 % (указано в таблица 3.2.), оставаясь в целом довольно воспроизводимыми характеристиками. Наконец, для различных партий масличности одного сыра доверительный интервал жирности оказался менее 1.2 %.

Таблица 3.2.

Статистические параметры методики определения жирности

№	1	2	3	4	5	Среднее значение	±CV
жирность	26.1	25.8	26.0	25.9	26.2	26.0	

Таким образом, параметр жирности в 19 сортах сыра составил от 24 до 37% и был близок к параметру, указанному производителем.

3.2 Установление подлинности сыров методом ОФ ВЭХЖ

3.2.1 Хроматографический профиль жира из сыров

В настоящей работе мы использовали удерживания ТАГ, образованных насыщенными жирными кислотами по уравнению

$$lgk_{(i)} = a * CN + b \quad (1) \quad (CN - \text{число углеродов радикала})$$

при трех различных составах подвижной фазы. Для этого триглицериды с насыщенными жирнокислотными радикалами получали этерификацией глицерина смесями миристиновой или миристиновой с пальмитиновой кислотами. При этом получали четырехкомпонентные смеси триглицеридов, которые элюировались четырьмя основными пиками на хроматограммах. Идентификацию жирнокислотного состава индивидуальных триглицеридов проводили сравнением хроматограмм с известными литературными хроматографическими профилями, для подтверждения использовали анализ жирных кислот в гидролизате масел, рис. 3.3.

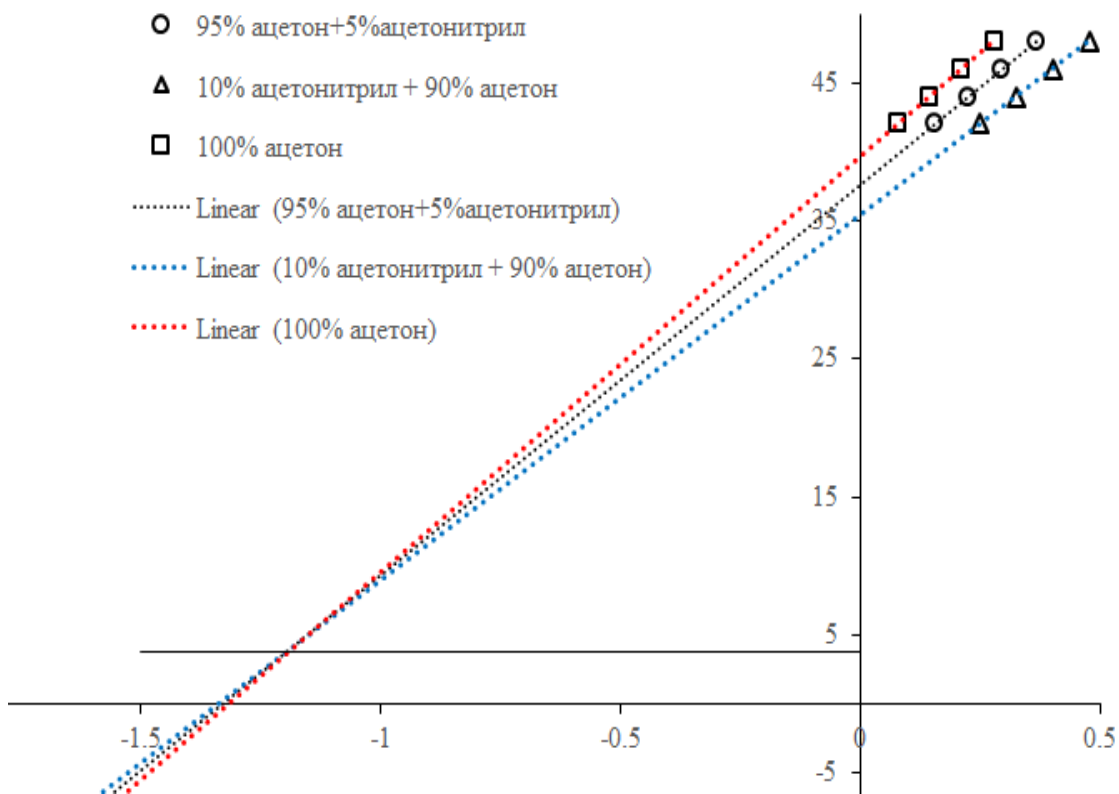


Рис. 3.3. Карта разделения стандартных ТАГ (M_3 , M_2P , MP_2 , P_3)

В выбранных условиях анализа регистрируются хроматограммы триглицеридов, образованных насыщенными жирными кислотами. Оказывается, что между логарифмами факторов удерживания $lgk_{(i)}$ и суммой чисел атомов углерода в трех жирнокислотных радикалах триглицеридов типа i , $CN(i)$ обнаруживается прямолинейная зависимость.

Если затем в тех же условиях записать хроматограмму анализируемого масла, то для каждого пика триглицерида по его времени удерживания в соответствии с уравнением (1) можно рассчитать конкретную величину $CN(i)$. Однако полученное численное значение $CN(i)$ при наличии непредельных связей, по крайней мере, в одном из радикалов триглицерида не будет указывать точно на суммарное число атомов углерода в радикалах, поскольку требуется введение поправки на наличие двойных связей. Точная поправка при этом зависит от типа (*цис*- или *транс*-) связи, ее положения в углеродной цепи и хроматографических условий. Но по грубой оценке замена одинарной связи на двойную уменьшает $CN(i)$ примерно на две единицы. Понятно, что $CN(i)$ переименовывается в случае непредельных триглицеридов в $ECN(i)$. Этот параметр предлагается в качестве простого и удобного способа обозначения компонентов смесей. В действительности параметр ECN может быть использован только лишь в качестве приблизительной характеристики триглицеридов, поскольку эта величина непостоянна и зависит от состава подвижной фазы. В настоящей работе приведено экспериментальное подтверждение этого положения.

Для удерживания триглицеридов, образованных насыщенными жирными кислотами в настоящей работе была получена линейная зависимость по уравнению (1) при трех различных составах подвижных фаз (рис.3.2). При этом прямые линии пересекаются в одной точке с ординатой, близкой к трем ($y_0=4,4$). Это не удивительно, поскольку в молекуле триглицерида имеются три (карбокисильных) атома углерода трех жирнокислотных радикалов, которые не вносят вклад в гидрофобное удерживание триглицеридов.

При определении параметров удерживания триглицеридов с радикалами насыщенных кислот параллельно записывали хроматограммы молочных жиров, в которых, кроме насыщенных, присутствуют и радикалы высших ненасыщенных жирных кислот.

Типичная хроматограмма настоящих сыров и молока, по хроматографическому профилю подобная приведенным в опубликованных статьях, представлена на рис.3.4.

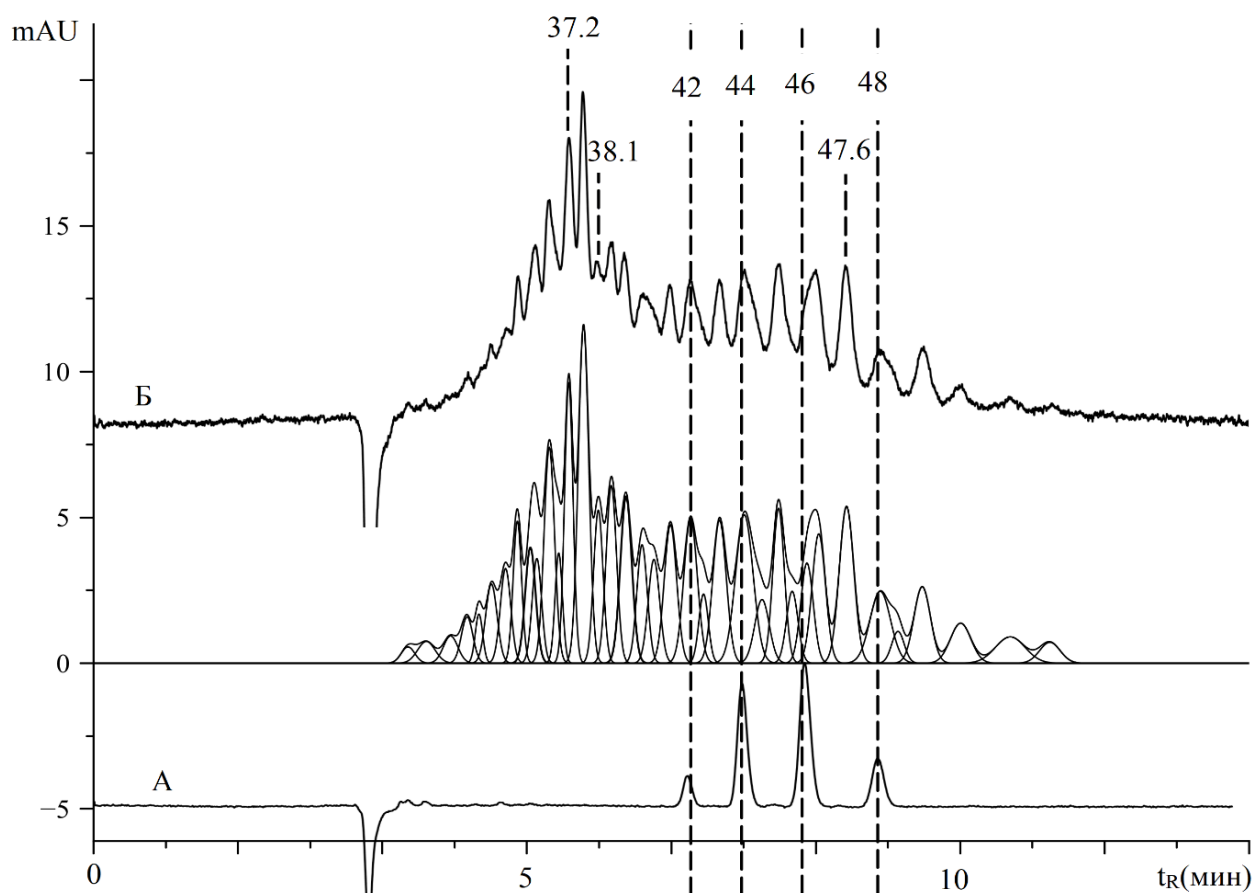


Рис. 3.4. Разделение триацилглицеринов молочного жира по эквивалентным углеродным числам

А- стандартные ТАГ (тримиристинат ECN=42, димиристинат-пальмитат ECN=44, миристинат-дипальмитат ECN=46 и трипальмитат ECN=48), Б- молочный жир

В использованном в работе составе подвижной фазы (100% ацетон) нельзя разделить все ТАГ. Хотя разделение проблемных пиков лишь незначительно улучшается при использовании существенно более медленного способа с использованием ацетонитрила в качестве модификатора, но при

этом имеют место два недостатка: во-первых, анализ занимает больше времени; во-вторых при добавление ацетонитрила снижается растворимость объектов в подвижной фазе. Поэтому предложенные в работе хроматографические условия можно считать быстрыми и удобными для установления подлинности сыров. В настоящей работе мы использовали удерживания ТАГ, образованных насыщенными жирными кислотам для определения по уравнению $lgk_{(i)} = a * CN + b$ (CN - число углеродов радикала) при трех различных составах подвижной фазы. Из полученного уравнения с любого пика мы можем рассчитать значения ECN этого пика (хроматограммы Б, рис.3.5.) На рисунках 3.5 - 3.9 приведены хроматограммы некоторых сортов сыров.

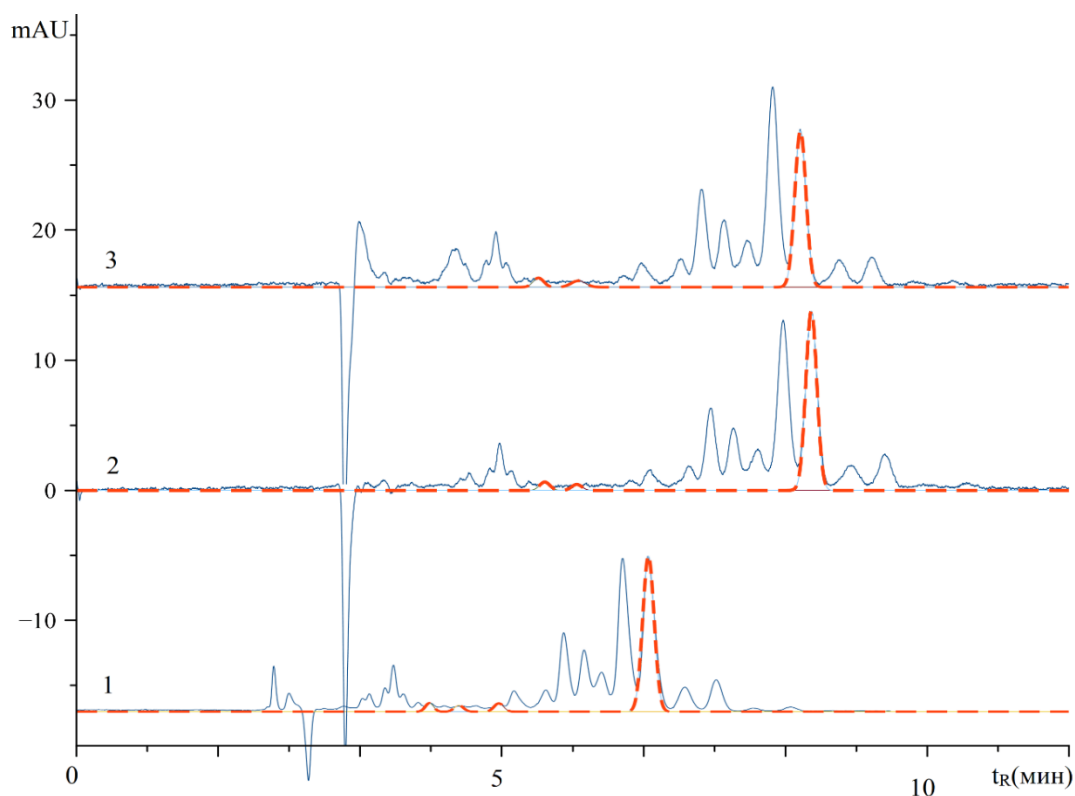


Рис. 3.5. Хроматограммы некоторых сортов сыров

1-Голландский(29.11.17) 2- Голландский(20.2.18) 3- Голландский(25.2.18)

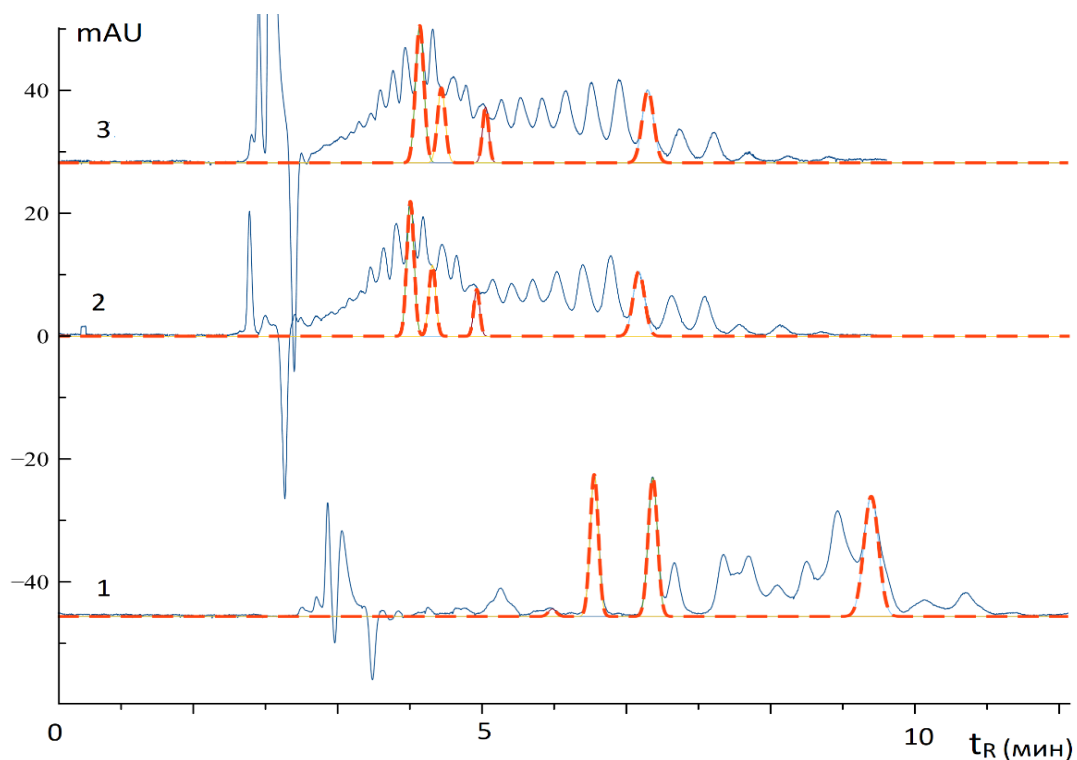


Рис. 3.6. Хроматограммы некоторых сортов сыров

1- *Российский молодой* 2- *Российский доры* 3- *Российский*

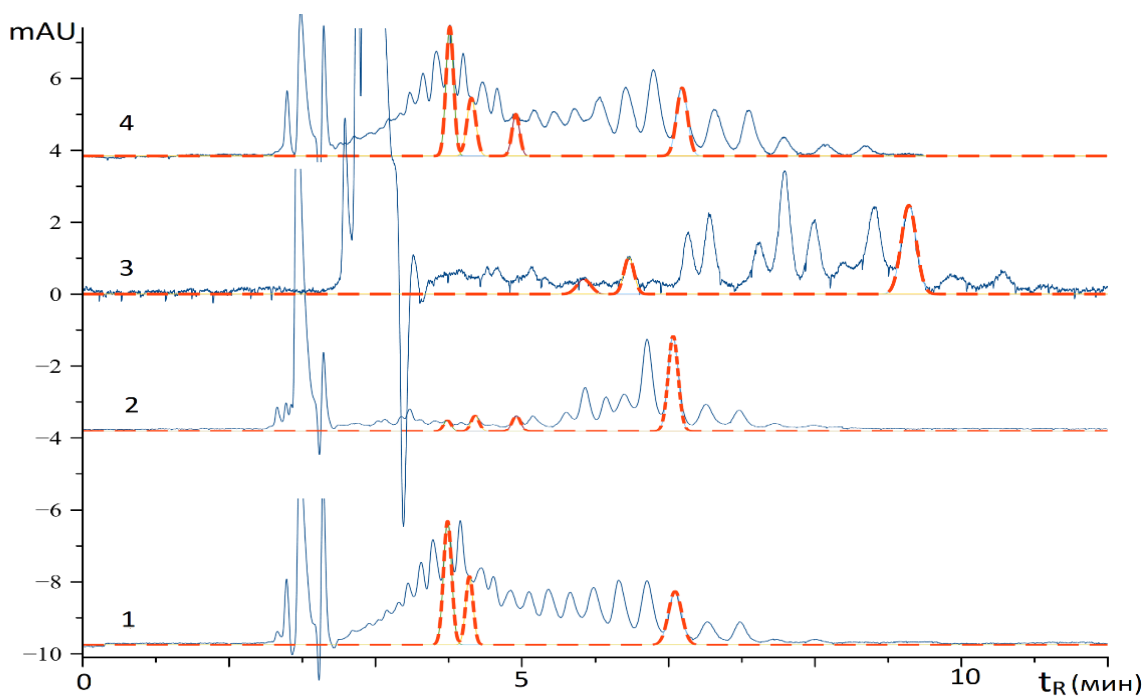


Рис. 3.7. Хроматограммы некоторых сортов сыров

1- *Василенко* 2- *Костромской* 3- *Гильзитер премиум*

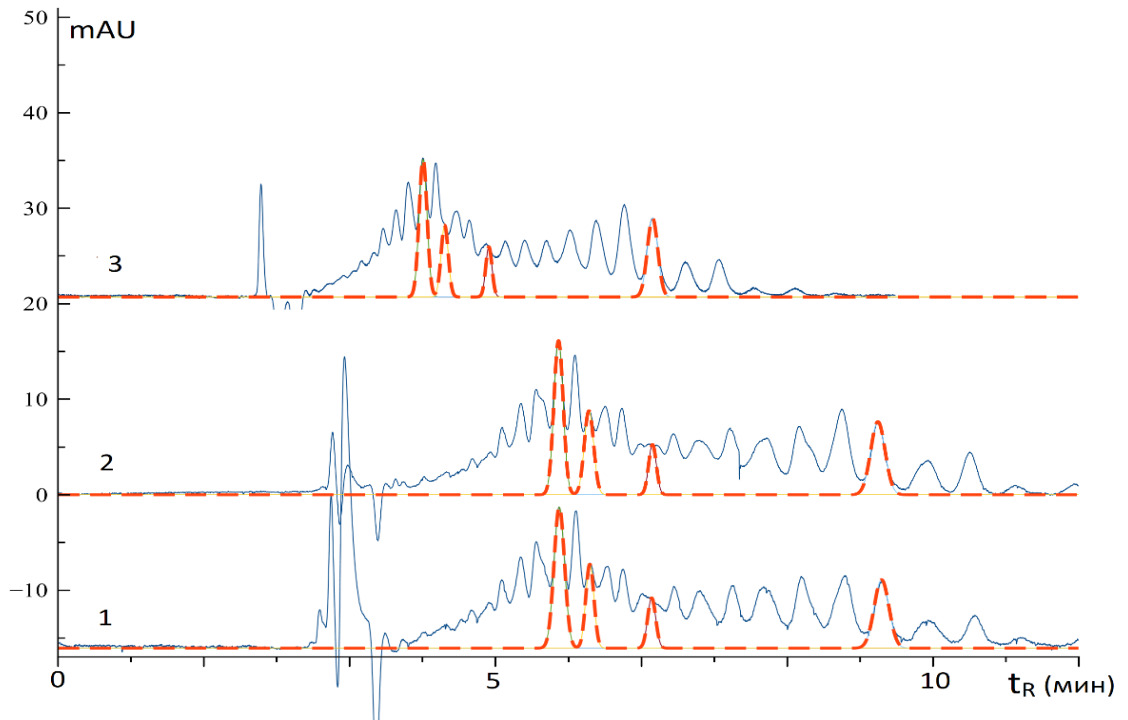


Рис. 3.8. Хроматограммы некоторых сортов сыров

1- Эдам карлов двор 2-Тильзитер ольденбургер 3- Белебеевский

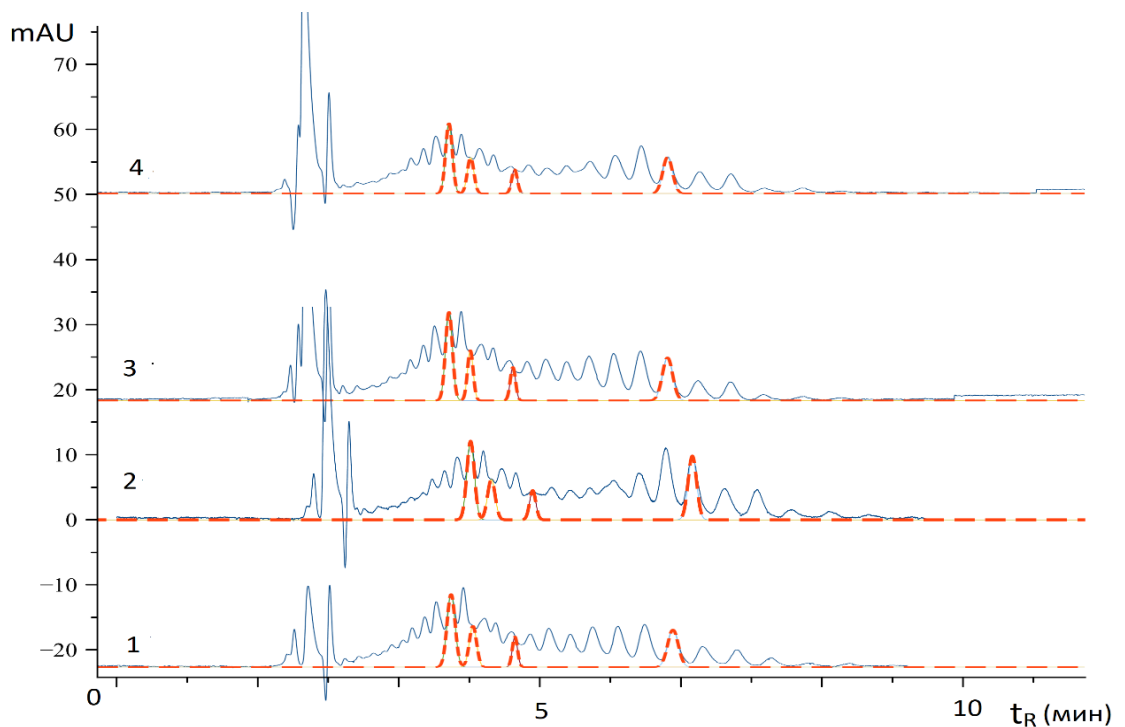


Рис. 3.9. Хроматограммы некоторых сортов сыров

1- Пармезан 45% каолов двор 2- Топленое молоко
3- Масдам 4- Пармезан

3.2.2 Использование метода «отпечатков пальцев» для установления подлинности сыров

По данному методу, называемому иногда «методом отпечатков пальцев», сопоставляют хроматографические профили анализируемого образца и некоторого стандарта. Сравнение может быть чисто качественным (по совпадению времен удерживания пиков) или условно количественным (по сопоставлению высот основных пиков или отношения высот пиков).

Хроматограммы стандартного сыра на фоне масла подсолнечного и пальмового представлены на рис 3.10.

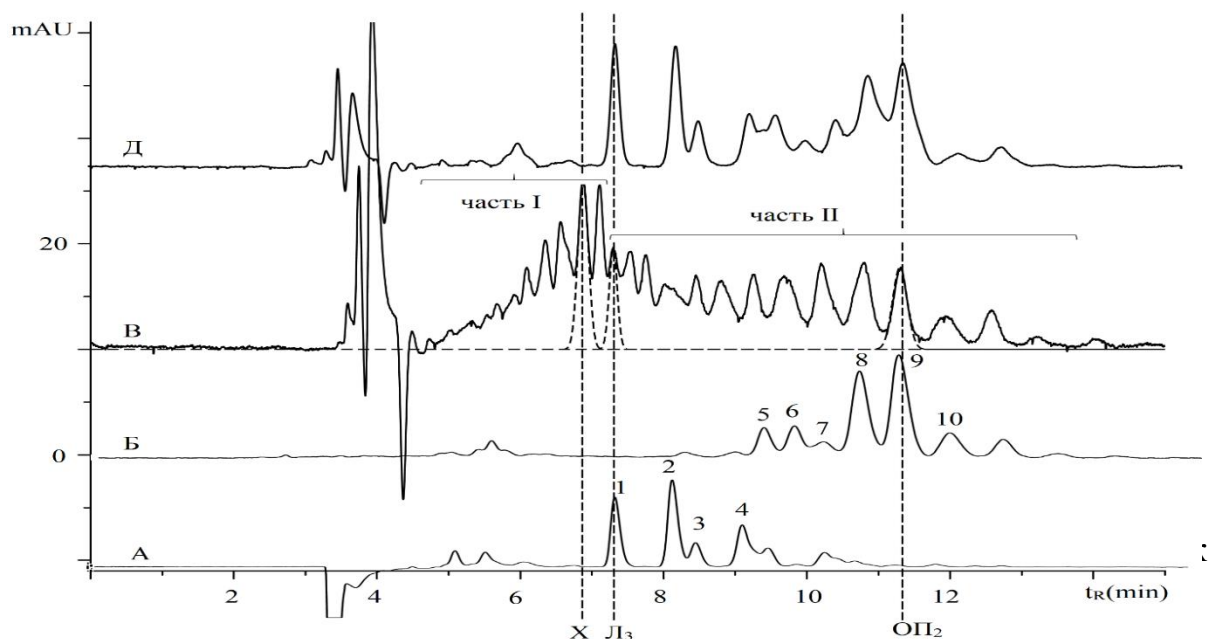


Рис. 3.10. Стандартный профиль сыров на фоне масел подсолнечного (А) и оливкового (Б) и фальсификат (Д). 1-Л₃, 2-Л₂О, 3-Л₂П, 4-ЛО₂, 5-ЛОП, 6-ЛП₂, 7-О₃, 8-О₂П, 9-ОП₂, 10- О₂С

Хроматографический профиль можно разделить на две части. Первая часть - эта часть представляет собой триацилглицерины, содержащие один растительный радикал и два коротких радикала (значения эквивалентных углеродных чисел (ENC) меньше 38). Эта часть элюированна ранее (часть I). Другая часть (часть II) - эта часть содержит обычные ТАГ растительных масел.

Выполненный в работе анализ большого числа сыров различных марок показал, что в ряде случаев для оценки происхождения использованного для их изготовления масла достаточно качественного анализа хроматограмм, рис. 3.11.

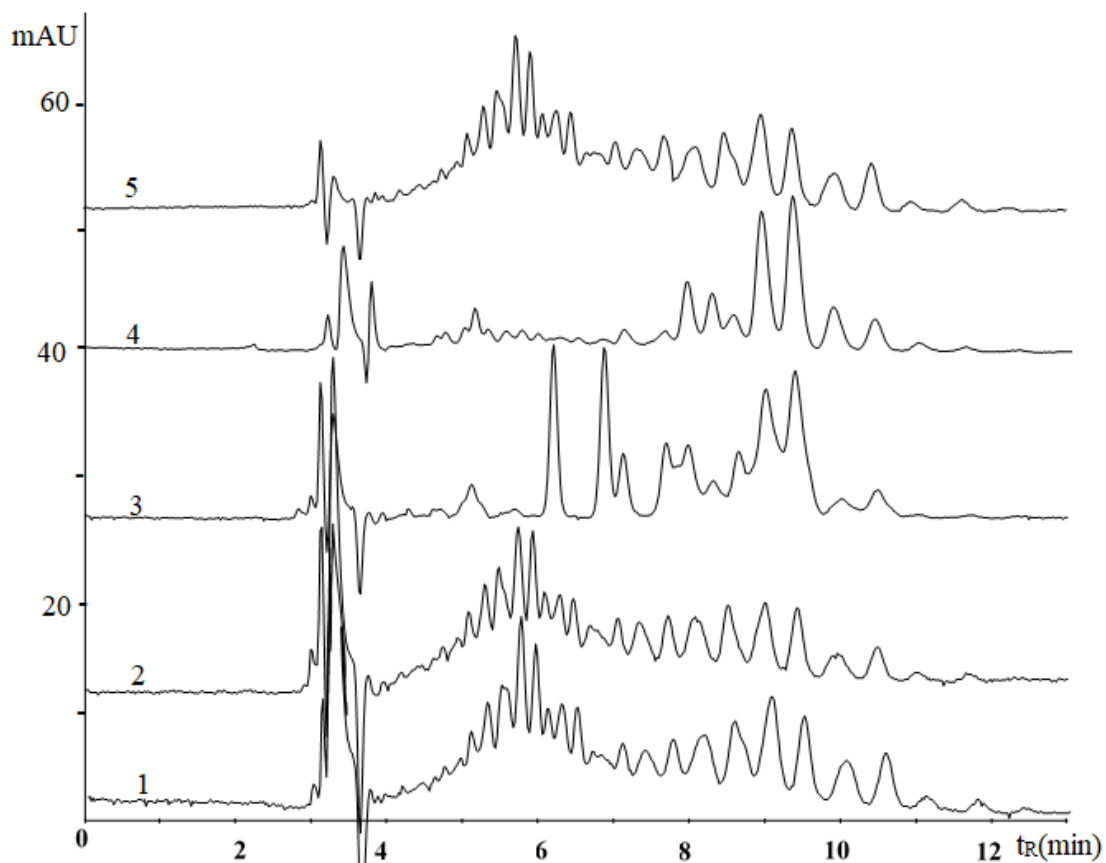


Рис. 3.11. Хроматограммы ацетоновых экстрактов некоторых сыров
1- Сыр «Ламбер», 2-Сыр «Эдам карлов двор», 3- Сыр «Василенко», 4- Сыр
«Качиотто», 5- Сыр «Тильзитер ольденбургер»

Например, сыр «Ламбер» (рис.3.11.), как и многие другие, содержит масло, не отличающееся от экстрагированного масла молока «белый город», как стандартный сыр (рис.3.10.). Но хроматограммы масла сыра «Василенко» и сыра «Качиотто» не имеют первую часть хроматографического профиля по сравнению с профилями стандартного образца. Особенно это видно на хроматограмме сыра «Василенко» - появляется пара пиков L_3 и L_2O , и они в большом количестве. И хроматографический профиль имеет пары пиков L_3 и L_2O , как основные компоненты. Кроме этого, хроматограмма сыра «Качиотто» полностью совпадала с хроматограммой масла пальмового

(хроматограмма Б, рис.3.10.). Это объясняется тем, что существуют замены компонентов коровьего молока на растительные масла, например, подсолнечное, пальмовое масла или др.

3.2.3 Использование метода «векторной модели» для установления подлинности сыров

В спорных ситуациях применение расчетных методов обязательно. Можно предложить схему, в которой в трехмерном пространстве (измерения в котором соответствуют долям ТАГ: $x - X$, $y - Л_3$ и $z - ОП_2$) строится реперный вектор (по заведомо достоверному образцу); затем строится другой вектор, - с координатами, соответствующими доле площадей этих пиков в исследуемом образце масла. Степень несовпадения двух векторов может быть оценена по углу между ними.

По физическому смыслу угла Φ характеризуются общие различия между стандартными и анализируемыми векторами. Кроме этого Φ_1 характеризует различие между стандартным данным компонентом и анализируемыми векторами. При этом угол Φ_1 оценивает степень отличительных компонентов $Л_3$ в анализируемом образце, $\Phi_2 - ТАГ ОП_2$ и $\Phi_3 - ТАГ X$. Как уже упоминалось выше, при подвижной фазе 100% ацетона ТАГ сыров не полностью разделяются. Поэтому для графического разделения смежных пиков использовали программу *Magicplot student 2.7.2*, с аппроксимацией пиков не модифицированными Гауссианами (хроматограмма В, рис.3.10). Результаты исследования сыров различных марок приведены в таблице 2.1.

Из представленных данных в таблице 3.3 следует, что примерно для 6 образцов сыров нет оснований считать, что молочные жиры были заменены, или что в него введено стороннее масло. Следовательно, в качестве ориентировочного критерия достоверности молочных жиров в сыре можно использовать не превышение угла между векторами в 6 градусов. Рост угла до 10 градусов, по-видимому, следует воспринимать как подозрение на

добавление к сырам сторонних масел, хотя точной оценки сделать невозможно, поскольку хроматографический профиль добавки заведомо не известен. Кроме этого сыр домашней «Пармезан» имеет значеия углы необычное большое (по сравнению коровье сыр). Эта разница предлагает из-за неодинакова количество жиров молоко козы и коровье.

Таблица 3.3.

Результаты исследования масел некоторых марок сыров

№	Название сыров	Доля ТАГ, %			α, град.			
		X	L ₂ O	OP ₂	Φ	Φ ₁	Φ ₂	Φ ₃
	Молоко «белый город»	7.09	3.63	5.18	0	0	0	0
1	Костромской	7.08	3.52	5.41	1.45	0.67	1.21	0.03
2	Тильзитер премиум	7.03	3.56	5.07	0.37	0.48	0.59	0.22
3	Брынза	6.8	4.07	4.8	3.71	2.82	2.11	1.09
4	<i>Пармезан</i>	7.39	4.82	3.87	10.77	6.97	7.41	0.99
5	Ламбер	6.78	3.55	5.43	2.33	0.51	1.29	1.24
6	Российский	2.41	4.37	15.71	43.09	4.69	16.21	15.56
7	Василенко	0.5	9.65	14.65	46.64	4.84	3.53	23.88
8	Тильзитер ольденбургер	7.01	3.85	5.14	1.42	1.38	0.22	0.31
9	Эдам Карлов двор	7.57	3.5	5.14	2.4	0.8	0.23	1.77
10	Голландский	2.02	1.66	50.93	54.07	21.42	19.02	5.65
11	Белебеевский	7.22	3.4	5.43	1.98	1.5	1.26	0.51
12	Топленое молоко	6.84	3.51	6.21	5.87	0.8	5.09	0.99
13	Пармезан 45% карлов двор	7.31	3.74	4.95	2.02	0.7	1.25	0.85
14	Пошехонский	6.99	3.47	5.19	0.79	1.02	0.012	0.36
15	Российский молодой	7.13	3.62	5.04	0.85	0.08	0.76	0.16
16	Российский доры	1.71	2.64	21.16	49.73	7.66	13.63	13.89
17	Масдам	7.43	3.43	5.35	1.93	1.23	0.85	1.28
18	Качиотто	2.71	3.84	21.77	46.4	1.5	20.51	10.93
19	Российский ровеньки	0.41	3.3	14.49	50.4	0.64	2.93	24.43

Пальмовое масло является, пожалуй, самой распространенной примесью, добавляемой к молочным жирам, так как физические свойства смеси близки к молочному жиру. Чтобы не полагаться на прогнозируемые результаты, нами были составлены смеси молочного жира и пальмового масла, и уже затем проанализированы хроматографические профили и параметры векторных моделей. Результаты приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4.

Параметры векторной модели в смесях пальмового масла и сыра (указан % пальмового масла в молочных жирах)

% пальмовое масло	0	3	5	10	15	20	30	40	50	100
А	7.35	7.34	7.09	6.81	6.37	5.90	5.07	4.85	4.75	1.05
Л ₃	3.36	3.69	3.40	3.46	3.62	3.82	2.96	2.68	2.11	0.72
ОП ₂	5.08	5.44	6.62	7.51	7.87	9.67	11.05	13.54	16.74	26.79
Ф	2.35	0.59	7.15	11.42	14.12	21.31	29.03	34.69	39.73	54.25
Ф ₁	1.72	0.35	1.51	1.11	0.08	1.32	5.34	7.90	13.40	39.56
Ф₂	0.53	1.31	6.87	10.51	11.87	17.31	19.73	23.39	26.66	9.19
Ф ₃	1.00	0.95	0.00	1.13	3.03	4.83	8.02	7.91	7.11	12.58

Из представленных данных видно, что при добавлении пальмового масла в молочные жиры, чем больше количество пальмового масла, тем больше значение угла Φ . При этом метод «отпечатков пальцев» с использованием хроматографического профиля и векторной модели можно установить подлинность сыров с добавлением более 5% пальмового масла.

Метод установления подлинности настоящих сыров проводился следующим образом:

1. Применяли хроматографическую систему с рефрактометрическим детектированием и колонкой размером 250 × 4.6 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом (например, Кромасил 100-С18, 5мкл) в подвижной фазе 100% ацетон, 0.8 мл/мин.

2. Готовили раствор «стандартного» и анализируемые образцы: 500 мг сыра (для стандартного можно либо использовать молочный жир коровьего молока, либо стандартный сыр) экстрагированы ацетоном с помощью натрия сернокислого безводного в ультразвуковой ванне. После этого отфильтровали

получившуюся смесь с помощью фильтровальной бумаги. Из полученного раствора отгоняли ацетон на вакуумном ротационном испарителе. Полученные масла растворили в подвижной фазе с концентрацией 10 мг/мл.

3. Записали хроматограммы сыров, масла пальмового и масла подсолнечного в одном и том же условии. Использовали программу *Magicplot student* чтобы определить площади пиков трех компонентов: X-это ТАГ самого высокого пика в первой части (рис 1), Л₃ (определение маслом подсолнечными) и ОП₂ (определение маслом пальмовыми).

4. Рассчитали три ТАГ и углы векторных моделей Φ , Φ_1 , Φ_2 и Φ_3 . Использовали эти параметры для установления подлинности сыров.

ВЫВОДЫ

В выпускной квалификационной работе были получены следующие результаты:

- В работе разработаны методы анализа и проведен анализ 19 различных сортов сыров.
- Экстракционным методом с интенсификацией экстракции под действием ультразвука определена масличность жиров.
- Записаны хроматографические профили всех исследованных масел и выполнен их анализ сопоставлением с хроматограммами молочного жира, подсолнечного, оливкового и пальмового масел.
- С использованием метода «отпечатков пальцев» установлены образцы, при производстве которых использовали не молочные жиры.

В ходе выполнения выпускной квалификационной работы были приобретены практические и теоретические знания и навыки в области химии. Таким образом, задачи, поставленные в выпускной квалификационной работе, были выполнены, а цель – достигнута.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boryś W.* Słownik etymologiczny języka polskiego. Wydawnictwo Literackie-Kraków, 2005. 542 с
2. Johnson M.E., Lucey J.A. Major technological advances and trends in cheese // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 56. P. 89.
3. Дмитриченко М.И., Пилипенко Т.В. Товароведение и экспертиза пищевых жиров, молока и молочных продуктов. СПб.: Питер, 2010. 352 с.
4. Портал промышленного скотоводства [Электронный ресурс]// Статьи о содержании КРС на Korovainfo.ru
URL:
http://www.korovainfo.ru/article/?SECTION_ID=116&ELEMENT_ID=36281&spphrase_id=26651 (дата обращения 8.05.18)
5. Рудаков О.Б., Пономарёв А. Н., Полянский К.К., Любарь А.В. Жиры. Химический состав и экспертиза качества. М.: ДеЛи принт, 2005. 312 с.
6. Jozwik A., Strzalkowska N., Bagnicka E., Polawska E., Horbanczuk J.O. The effect of feeding linseed cake on milk yield and fatty acid profile in goats // *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2010. V. 28. P. 245–251.
7. Cieslak A., Kowalczyk J., Czauderna M., Potkanski A., Szumacher-Strabel M. Enhancing unsaturated fatty acids in ewe's milk by feeding rapeseed or linseed oil // *Czech. J. Anim. Sci.* 2010. V. 55. P. 496–504.
8. Devle H., Rukke E.O., Naess-Andresen C.F., Ekeberg D. A GC-magnetic sector. MS method for identification and quatification of fatty acids in ewe milk by different acquisition modes // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32, P. 3738–3745.
9. Strzalkowska N., Jozwik A., Bagnicka E., Krzyzewski J., Horbanczuk K., Pyzel B., Horbanczuk J.O. Chemical composition, physical traits and fatty acid profile of goat milk as related to the stage of lactation // *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2009. V. 27. P. 311–320.
10. Jozwik A., Stralkowska N., Bagnicka E., Grzybek W., Krzyzewski J., Kolataj A., Horbanczuk J.O. Relationship between milk yield, stage of lactation, and some

- blood serum metabolic parameters of dairy cows // *Czech. J. Anim. Sci.* 2012. V. 57. P. 353–360.
11. Butler G., Sttergiadis S., Seal C., Eyre M., Leifert C. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England // *J. Dairy. Sci.* 2011. V. 94. P. 24–36.
 12. Szumacher- Strabel M., Cieslak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E., Bielinska S., Stanis M., Wojtowski J. Camelina sativa cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk // *J. Sci. Food.* 2011. V. 91. P. 2031–2037.
 13. Mayer H.K., Fiechter G. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria // *Int. Dairy J.* 2012. V. 24. P. 57–63.
 14. Schmidely P., Andrade P.V.D. Dairy performance and milk fatty acid composition of dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with soybeans or canola seed supplementation // *Small Ruminant Res.* 2011. V. 99. P. 135–142.
 15. O'Donnell A.M., Spatny K.P., Vicini J.L., Bauman D.E. Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in claims based on production management practices // *J. Dairy Sci.* 2010. V. 93. P. 1918–1925.
 16. Laakso P., Christie W.W. Combination of Silver Ion and Reversed-Phase Hight-Performance Liquid Chromatography in the Fractionation of Herring Oil Triacylglycerols // *Ibid.* 1991. V. 68. P. 213–223.
 17. Bornaz. S., Novak G., and Parmentier M. Seasonal and Regional Variation in Triglyceride Composition of French Butterfat // *J. Am. Oil Chem Soc.* 1992. V. 69. P. 1131–1135.
 18. Perrin J.L., Prevot A. Use of a Laser Light Scattering Detector in HPLC Analysis of Fats and Oils. II. Analysis of Triglycerides // *Rev. Fran. Corps Gras.* 1986. V. 33. P. 437–445.
 19. Ramos M., Juarez M. Chromatographic, Electrophoretic and Immunological Methods for Detecting Mixtures of Milks from Different Species // *Bull. IDF.* 1986. V. 202. P. 175–190.

20. Perrin J.L., Prevot A., Traitler H., and Bracco U. Analysis of the Triglyceride Species of Blackcurrant Seed Oil by HPLC Via a Laser Light Scattering Detector // *Rev. Fran. Corps Gras*. 1987. V. 34. P. 221–223.
21. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе растительных масел. Метод контроля подлинности и установления фальсификации облепихового масла// *Химико-фармацевтический журнал*. Том 43. № 1. 2009. С. 33–36.
22. ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1998. 216 с.