Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности»

На правах рукописи

Жижин Николай Анатольевич

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА АУТЕНТИФИКАЦИИ ЖИРОВОЙ ФАЗЫ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

Специальность: 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:

кандидат технических наук,

Е.А.Юрова

Москва, 2020

Оглавление

Введение. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ 4
ГЛАВА 1 АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ВОПРОСА И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. 9
1.1 Химический состав молока 9
1.2 Состав липидов молока 11
1.3 Современные тенденции идентификации жировой фракции молока и молочных продуктов жирами не молочного происхождения…….23
1.4 Виды и свойства жиров применяемых при фальсификации молочного сырья……..26
1.5 Методы контроля жировой фазы молока и молочной продукции……...28
1.6 Анализ жирнокислотного и триацилглицеридного состава молока сырья как средство идентификации жировой фазы молочной продукции 36
1.7 Влияние жиров немолочного происхождения на состав жирных кислот и триацилглицеридов жировой фазы молока 37
1.8 Применение методик измерений для оценки жировой фазы молока и молочной продукции 38
1.9 Экстракции жировой фазы молока и молочной продукции 40
1.10 Применение методики «быстрой» газовой хроматографии для определения жирнокислотного состава 41
1.11 Анализ триацилглицеридного состава молока и молочной продукции…42
1.12 Анализ стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)…….43
Заключение по обзору литературы……45
Глава 2 МЕТОДОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 47
2.1. Организация выполнения работы 47
2.2 Объекты исследования 48
2.3 Приборы и методы 49
2.4 Методики исследования 53
2.5 Обработка результатов исследования 55
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 57

3.1 Установление диапазонов содержания жирных кислот и триацилглицеридов молока сырья для идентификации молочного жира 57

3.2 Изучение влияния технологических режимов переработки на жирнокислотный состав молока сырого с применением метода газовой хроматографии 59

3.3 Выявление тенденции изменения жирнокислотного состава при замене молочного жира жирами растительного и животного происхождения 65

3.4 Применение триацилглицеридного состава для аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции 73

3.5 Идентификация липидной фракции молока и молочной продукции по составу стеролов..... 79

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА И ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ АУТЕНТИФИКАЦИИ ЖИРОВОЙ ФАЗЫ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ..... 85

4.1 Применение метода картирования при проведении экспертизы аутентичности молочного жира 86

4.2 Практическая реализация картирования для выявления фальсификации жировой фазы молока и продуктов его переработки..... 92

4.3 Расчёт массовых долей жиров немолочного происхождения..... 94

4.4 Алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением методов газовой и жидкостной хроматографии 108

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗМЕРЕНИЯ ЖИРОВОЙ ФАЗЫ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ..... 111

5.1 Разработка метода экстракции жировой фазы молока и молочной продукции 111

5.2 Разработка методики «быстрой» газовой хроматографии для рутинных анализов состава жирных кислот в молоке и молочных продуктах..... 114

5.3 Разработка методики определения состава стеролов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)..... 121

5.4 Разработка методики определения триацилглицеридного состава молока и молочной продукции методом газовой хроматографии..... 126

5.5 ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ..... 130

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ……...……133

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…….134

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТ

Идентификация пищевой продукции является важной задачей во всем мире, в том числе это касается и молока и продуктов его переработки. Оценка жировой фазы молочных продуктов проводится по жирнокислотному составу, в отдельных случаях по составу стеринов. Но отсутствие четко обоснованных критериев оценки жировой фазы, в том числе и по жирнокислотному составу (ЖКС) приводит к спорным ситуациям.

Существующие на данный момент стандартизованные методы анализа не решают всей задачи идентификации, а позволяют лишь определить отдельный параметр. При этом полученный результат без учета состава продукта, качественных характеристик используемого молочного сырья не позволяет исчерпывающе ответить на вопрос о составе жировой фазы. Применение в настоящее время для производства молочной продукции помимо растительных жиров, жиров животного происхождения, привело к необходимости введения дополнительных параметров оценки жировой фазы. В ряде работ приводятся данные по применению анализа триацилглицеридов (TAG) для выявления жиров немолочного происхождения. Отсутствие нормированных диапазонов по количественному содержанию жирных кислот применительно к молоку и молочным продуктам (молоко сырое, простокваша, питьевое молоко, йогурты, творожные продукты и т.д.) приводит к получению недостоверных результатов измерений.

Следует подчеркнуть, что в последние годы состав жирных кислот жировой фазы продукта изменился с вторичного показателя на одну из основных качественных характеристик конечного продукта. Это обстоятельство послужило основанием для изучения жировой фазы молочного сырья по составу жирных кислот и составу стеринов, поскольку в соответствии с установленными требованиями присутствие фитостеринов является отличительным признаком присутствия растительных жиров в жировой фазе молока. Кроме того, форма холестерина и его состояние в продукте не является идентификационным

признаком, что делает метод идентификации несовершенным. В то же время интервалы, установленные для нормализации ЖКС и качественной оценки состава стеринов, не всегда приводят к однозначной оценке жировой фазы сырого молока и молочных продуктов. Поэтому для эффективного контроля жировой фазы молочного сырья и молочных продуктов необходимо разработать объективные критерии его оценки, ввести дополнительные параметры, систематизировать частоту контроля, установить требования и внедрить современные высокоэффективные методы анализа в обязательный контроль.

Большой вклад в исследование данного вопроса внесли ведущие специалисты в химии и аналитике жиров: Н.С. Арутюнян, Ф.А. Вышемирский, Г.С. Инихов, Н.И. Козин, А.П. Нечаев, И.М. Скурихин, Г.В. Твердохлеб, Е.В. Топникова, В.А. Тутельян, Б.Н. Тютюнников, D. Precht, J. Fontecha, R. Jensen.и др.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является разработка алгоритма аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции для выявления жиров немолочного происхождения.

Достижение поставленной цели было разрешено посредством решения промежуточных задач:

1. Провести анализ научной, патентной и технической информации по методам идентификации жировой фазы молока и молочной продукции;
2. Осуществить набор статистических данных по исследованию жирнокислотного состава и состава триглицеридов сырого коровьего молока с последующей оценкой полученных результатов для установления диапазонов их содержания;
3. Изучить влияние технологических процессов сквашивания и температурной обработки на состав жирных кислот сырого молока;
4. Исследовать на модельных жировых системах динамику изменения жирнокислотного состава и состава триглицеридов молочного жира при замене жирами растительного и животного происхождения;

5. Разработать алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочных продуктов с применением методов газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии;
6. Разработка методик измерений для аутентификации молочного жира с использованием методов капиллярной газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии

Научная новизна.

- Установлена сезонная и региональная вариативность содержания жирных кислот и триглицеридов в молоке сырье;
- Определены зависимости изменения жирнокислотного и триглицеридного состава молочного жира от технологических параметров его переработки и содержания жиров немолочного происхождения;
- Установлена динамика изменений жирнокислотного состава и состава триглицеридов при замене жирами растительного и животного происхождения;
- На основании предложенного методического подхода разработан алгоритм идентификации жировой фазы объектов исследования с использованием методов хроматографии.

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны и внедрены в лабораторную практику методики идентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением современных высокоэффективных методов анализа, это позволило выполнить их последующую стандартизацию. Разработаны следующие нормативные документы:

- ГОСТ 32915-2014 «Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии»;
- ГОСТ 34456-2018 «Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»;

- Проект ГОСТ «Идентификация жировой фазы молока».

В ходе выполнения работы разработана методика измерений «быстрой» газовой хроматографии для анализа состава жирных кислот, определена процедура пробоподготовки и установлены режимы хроматографирования. Обоснована практическая значимость данной методики для применения на входном контроле молока сырья на перерабатывающих предприятиях.

Методология и методы исследования. Результаты исследования основаны на экспериментальных данных, полученных с применением методов капиллярной газовой (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Научные положения, выносимые на защиту. Теоретическое обоснование, разработка и применение алгоритма комплексной оценки жировой фазы молока и молочной продукции с целью аутентификации молочного жира.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность экспериментальных исследований подтверждена многократной повторностью, полученных с использованием современных аналитических методов анализа. Осуществлена обработка полученных результатов с применением регрессионного анализа с использованием компьютерного пакета Statistika 6.0.

Исследования проводились на базе лаборатории технохимического контроля (ТХК) Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Исследования проведены на многочисленных образцах молока сырья, полученных с хозяйств Московской области, а также Воронежской, Калужской, Тульской и др. областей. Исследования молочной продукции проведены на выработанной молочной продукции, как в условиях перерабатывающих предприятий, так и в лабораторных условиях.

Основные положения и результаты исследования диссертационной работы были предметом докладов и дискуссий на семинарах, научных конференциях и форумах: Научно практическая конференция «Пути интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции в современных условиях» (Волгоград, 2012); Научно практическая конференция «Научный вклад

молодых ученых в развитие пищевой и перерабатывающей промышленности АПК» (Москва, 2013); Международная научная конференция «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2015); Научно практическая конференция «Научное обеспечение молочной промышленности» (Москва, 2015); Международная научно-практическая конференция «Современные достижения биотехнологии, актуальные проблемы молочного дела» (Ставрополь, 2015); Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук российской академии наук (Москва, 2016); Международная научно-практическая конференция «Пища, экология, качество» (Красноярск, 2016); Международная научная конференция, посвященная 175-летию К.А. Тимирязева (Москва, 2018) и др.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 статей, из них 4 – в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и перечня использованных литературных источников. Работа изложена на 141 страницах машинописного текста, содержит 34 таблиц и 39 рисунков. Список литературы включает 140 источников, из них 90 отечественных и 50 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ВОПРОСА И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 Химический состав молока

Молоко – является, поли компонентной биологической жидкостью, и состоит из многих компонентов, органического и неорганического происхождения. Таких компонентов в составе молока насчитывается более 200[19].

Наибольший удельный вес в молоке занимает вода, содержание которой от 86 до 89 %. Это растворитель для органических и неорганических молочных соединений. Как растворитель вода участвует во всех биохимических процессах в молоке [72]. Оставшаяся часть приходится на жир, который находится в молоке в виде отдельных жировых шариков, окруженных белковой оболочкой.

Белковая фракция делится на следующие компоненты: казеины, сывороточные белки, и небелковые азотистые вещества (мочевина, мочевая кислота, креатин, аминный азот, аммиак и другие промежуточные продукты распада и синтеза питательных веществ). Основной углевод молока - лактоза, содержание которой колеблется в пределах 4,6-4,7%.

Минеральный состав молока представлен макроэлементами содержащиеся в основном в виде фосфорнокислых и лимоннокислых солей кальция, калия, магния, хлористого натрия и калия. К микроэлементам молока относятся: медь, цинк, марганец, кобальт, хром, аммоний, свинец, олово, серебро, мышьяк, титан, ванадий, литий, никель, гелий, рубидий, йод, бор, фтор и др.), и прочие составные части молока (соматические и эпителиальные клетки).

Химический состав молока характеризуют по основным компонентам, имеющим вариативный характер в зависимости от различных факторов [72]. Основные химические компоненты молока представлены на рисунке 1.

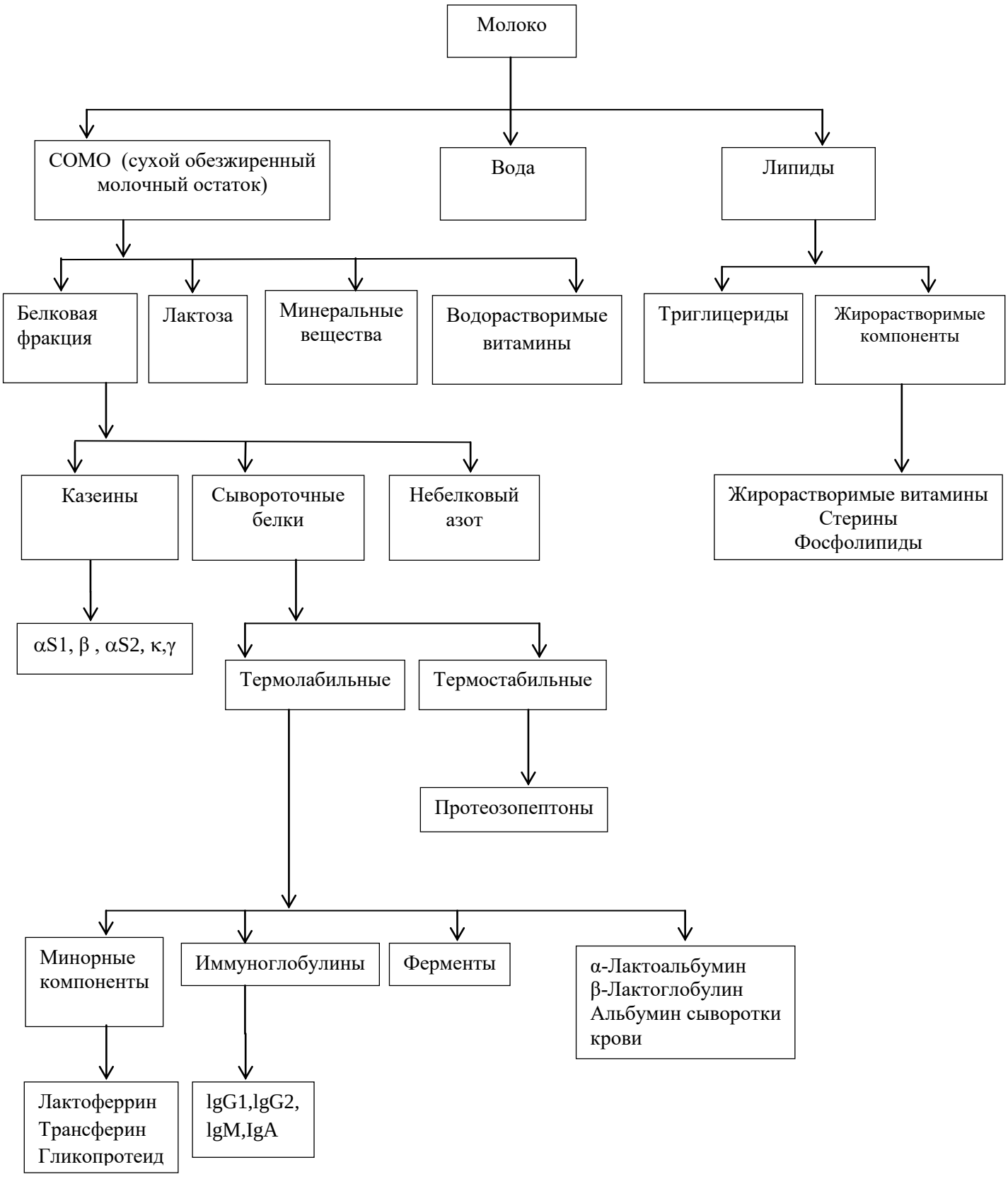


Рисунок 1- Основные химические компоненты коровьего молока

1.2 Состав липидов молока

Термин «липиды» определяется как органические соединения нерастворимые в воде и растворимые в органических растворителях (например, хлороформе, эфире), содержат углеводородные группы в качестве первичных частей молекулы [77]. Молочный жир состоит из 97-98% ТГ и 2-3% мелких липидов. Соединения, входящие в это определение, включают жирные кислоты, моно- ди- и триацилглицериды, сложные эфиры жирных кислот и изопреноидные углеводороды. Также в их состав входят такие соединения как каротиноиды, стерины и витамины A, D, E и K. Липиды, как правило, классифицируются на «простые» и «сложные», исходя из размеров и структурных деталей молекулы. Простые липиды включают в себя жирные кислоты, углеводороды и спирты, все из которых относительно нейтральны в отношении заряда. Сложные липиды, такие как фосфолипиды и гликолипиды, относительно заряда являются «полярными» [129].

Молочные липиды, называемые «молочным жиром», являются важным компонентом молочных продуктов, различных пищевых продуктов (например, хлебобулочных изделий, шоколада), а также имеют нетрадиционное применение (например, в косметике) [140].

Содержание жира в молоке сырье может варьироваться от 3,0 до 6,0%, но обычно оно находится в пределах от 3,5 до 4,7% [127]. Липиды коровьего молока сходны по структуре с липидами других видов сельскохозяйственных животных. Как правило, молочный жир в основном состоит из триацилглицеридов (ТГ), небольших количеств диацилглицеридов (ДГ), моноацилглицеридов (МГ), фосфолипидов (ФЛ), свободных жирных кислот (СЖК), холестерина и сложных эфиров холестерина (таблица 1).

Таблица 1 - Состав липидов коровьего молока

Фракции липидов	Содержание, %
Триглицериды	97,5
Диглицериды	0,3
Моноглицериды	0,027
Свободные жирные кислоты	0,027
Фосфолипиды	0,6
Холестерин	0,31

Так же известно, что существует множество влияющих факторов на концентрацию липидов в молоке. К таким факторам можно отнести породу животных, климат, генетику, стадию лактации, здоровье (маститная инфекция или другие заболевания), кормовую базу, интервал между доениями и т.д. [106].

Кроме того, молочные жиры показывают изменчивость состава жирных кислот, а также размер и стабильность глобул. Эти вариации ответственны за реологические свойства, которые, могут оказывать заметное влияние на функциональные свойства ряда молочных продуктов, химическую стабильность и питательные свойства жиросодержащих молочных продуктов, таких как молочные крема, масло и сыр. Взяв во внимание питательные свойства, липиды молока вносят уникальные характеристики во внешний вид, текстуру, вкус и насыщенность молочных продуктов, и являются источником энергии и незаменимых жирных кислот, жирорастворимых витаминов и ряда других потенциальных компонентов, способствующих укреплению здоровья [89].

1.2.1 Характеристика жирнокислотного состава молочного жира

Исследования жировой фазы молока обнаружили обширный спектр жирных кислот. Жирнокислотный состав молочного жира представлен более 400 жирными кислотами, что гораздо больше, чем в составе растительных и животных жиров [115].

Состав жирных кислот молочного жира зависит от корма и породы коров, и наибольший эффект оказывает кормление. Во время перехода от зимних к летним условиям кормления количество ненасыщенных жирных кислот может

увеличиться, а содержание насыщенных жирных кислот уменьшаться [59]. Как правило, содержание олеиновой кислоты увеличивается за счет масляной и стеариновой кислоты. Состав жирных кислот молочного жира может быть изменен за счет рационов коров, обогащенных различными жирными кислотами. Недостаток питания и дисбаланс приводят к снижению количества летучих жирных кислот: масляной и капроновой с увеличением содержания олеиновой кислоты [59]. Как правило, молочный жир у коров породы джерси имеет более высокое содержание летучих жирных кислот, чем у породы голштинская или эрширская [34].

Жирные кислоты в основном располагаются в ацилглицеридах (три-, ди- и моно-), гликолипидах, эфирах холестерина, которые составляют основную часть липидов молока, и только в небольшом количестве 0,1-0,4% они встречаются в свободной форме [123].

У жвачных животных большая часть жирных кислот образуется в качестве промежуточных продуктов во время липидного метаболизма в рубце, связанного с микробной активностью. Жирные кислоты жвачных животных синтезируются в молочной железе из ацетата и 3-гидроксибутирата, полученного из расщепления волокон рубца. Главный метаболический путь включает в себя два ключевых фермента: ацетил-CoA-карбоксилазу (АКК) и синтетазу жирных кислот [113].

Жирные кислоты можно разделить на группы по своей структуре, и физиологической роли [137]. Жирные кислоты имеют структуру углеродной цепи от 4 до 26 атомов углерода. Количество двойных связей может варьироваться от нуля до шести.

Насыщенные жирные кислоты ($C_nH_{2n}O_2$).Насыщенные жирные кислоты не содержат двойных связей и могут быть разделены на подгруппы в зависимости от их длины цепи. Насыщенные жирные кислоты с короткой цепью ($C_{4:0}$-$C_{10:0}$), жирные кислоты средней цепи ($C_{12:0}$- $C_{16:0}$) и кислоты с длинной цепью (C> 17) [128].Большая часть жирных кислот ($C_{4:\ 0}$ до C_{16}: 0), возникающая при синтезе, насыщена, поскольку дельта-9 десатураза имеет очень низкую активность с жирными кислотами с длиной углеродной цепи ниже 18, хотя небольшая часть

$C_{14:0}$ и $C_{16:0}$ ненасыщенна. Содержание насыщенных жирных кислот в коровьем молоке составляет приблизительно 57% от общего количества молочных липидов [126].

Мононенасыщенные жирные кислоты (C_nH (2_n-2) O_2).Мононенасыщенные жирные кислоты определяются как компоненты, содержащие одну двойную связь между соседними атомами углерода. Наличие выборки функциональности представляет собой две важные переменные в структуре и номенклатуре мононенасыщенных жирных кислот. Во-первых, двойная связь может присутствовать в ряде возможных местоположений вдоль углеродной цепи, что приводит к разным изомерам кислот. Во-вторых, двойная связь может быть либо в цис-, либо в транс-геометрии (рисунок 2).

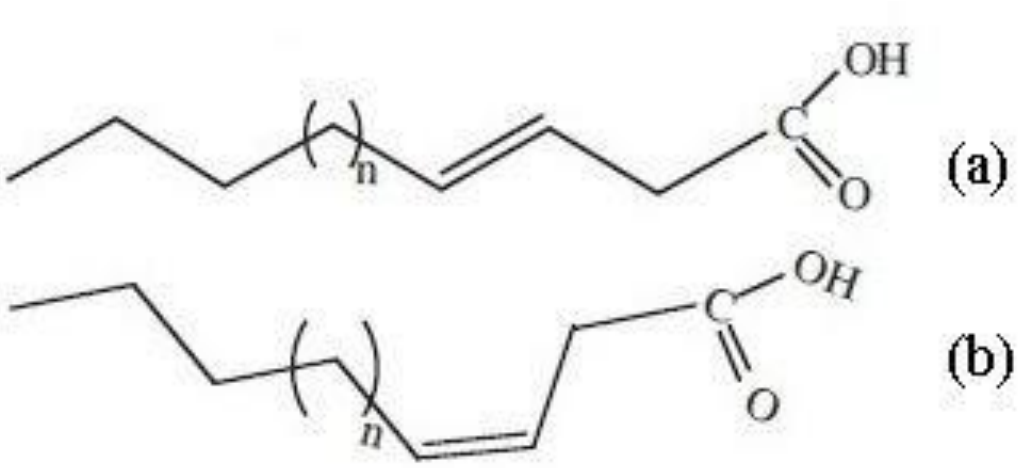
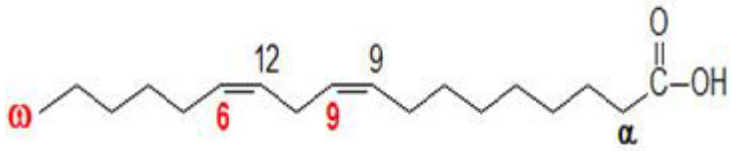
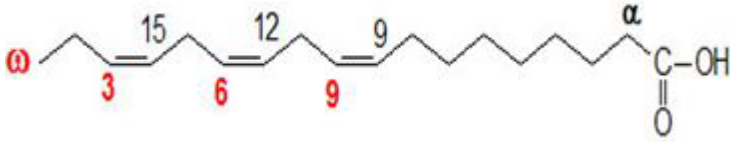
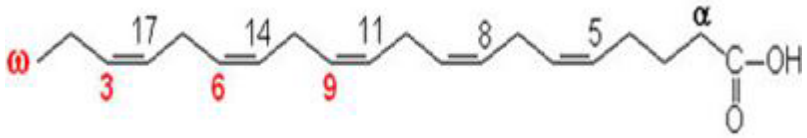
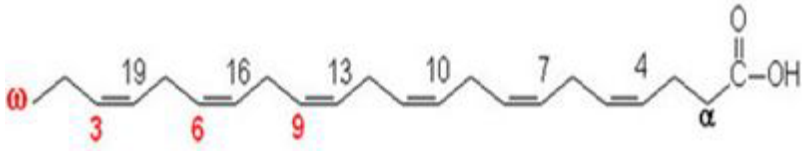


Рисунок 2- Общая структура различных типов жирных кислот:
(а) транс-мононенасыщенные, (б) цис-мононенасыщенные

В природе подавляющее большинство всех двойных связей жирных кислот находится в цис-геометрии. Среднее содержание мононенасыщенных жирных кислот в молочном жире составляет около 30%. Геометрические и позиционные изомеры являются главным образом результатом биогидрирования полиненасыщенных жирных кислот в рубце. Олеиновые кислоты (цис-$_9$ $C_{18:\ 1}$) преобладают в молочном жире и являются основными позиционными цис-изомерами октадеценовой кислоты. Молочный жир также содержит трансизомеры, в основном транс-$C_{18:\ 1}$ и транс-$C_{16:\ 1}$, в количестве примерно 2,8% и 0,17% соответственно [123].

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Полиненасыщенные жирные кислоты это жирные кислоты с длинной цепью, которые содержат 18 или более атомов углерода и от 2 до 6 двойных связей. Полиненасыщенные жирные кислоты описаны с использованием структурного обозначения, которое идентифицирует жирные кислоты по количеству атомов углерода, а также количеству и положению ненасыщенных двойных связей (таблица 2).

Таблица 2 - Репрезентативная структура общих полиненасыщенных жирных кислот

Формула	Номеклатура
18:2Δ9,12	Линолевая кислота 
18:3Δ9,12,15	α-Линоленовая кислота 
20:4Δ5,8,11,14	Арахидоновая кислота
20:5Δ5,8,11,14,17	Эйкозапентаеновая кислота 
22:6Δ4,7,10,13,16,19	Докозагексаеновая кислота 

В зависимости от положения первой двойной связи вблизи метильного конца, жирные кислоты классифицируются как n-9, n-6 или n-3 (также

называемые ω-9, ω-6, ω-3) с первыми двойными связями между атомами углерода 9 и 10, атомами углерода 6 и 7 и углеродами 3 и 4 соответственно. Двумя доминирующими типами полиненасыщенных жирных кислот являются n-3 и n-6. Видовое разнообразие наблюдается среди полиненасыщенных жирных кислот. Таким образом, n-6 полиненасыщенная жирная кислота является линолевой кислотой ($C_{18:\ 2\ n-6}$) и первичная n-3 представляет собой α-линоленовую кислоту ($C_{18:\ 3\ n-3}$), тогда как эйкозапентаеновая кислота ($C_{20:\ 5\ n-3}$) и докозагексаеновая кислота ($C_{22:\ 6\ n-3}$), являются количественно незначительным компонентом общего количества полиненасыщенных жирных кислот [110].Все три класса полиненасыщенных жирных кислот метаболизируются с помощью общей серии ферментных систем. $C_{18:\ 0}$ (стеариновая кислота) Δ9-десатураза $C_{18:\ 1\ н-9}$ (олеиновая кислота) Δ9-десатураза $C_{18:\ 2\ н-6}$ (линолевая кислота). Линолевая кислота и α -Линоленовая кислота метаболизируются одной и той же ферментной системой, чередуя десатурацию и удлинение, генерируя два разных пути последующих продуктов метаболизма до 22 или больше атомов углерода, называемых n-6 и n-3 длинноцепочечной полиненасыщенной жирной кислотой (рисунок 3). Линолевая кислота является предшественником биоактивной n-6 полиненасыщенной жирной кислоты, такой как арахидоновая кислота ($C_{20:\ 4\ n-6}$); α-Линоленовая кислота является предшественником n-3 серии полиненасыщенных жирных кислот, включая эйкозопентатеновую и докозагексаеновую кислоты. Оба метаболических пути n-3 и n-6 приводят к синтезу родственных, но уникальных биоактивных соединения, которые регулируют многие важные биологические процессы. Абсолютные значения и относительные пропорции линолевой кислоты и α-линоленовой кислоты влияют на соответствующий метаболизм каждой жирной кислоты. Поэтому для определения основного влияния на метаболизм полиненасыщенных жирных кислот, изменениям количества и соотношения n-6 и n-3 жирных кислот уделяется больше внимания. Эти изменения важны, потому что наибольшая польза для здоровья связана с потреблением этих кислот [110].

В коровьем молоке полиненасыщенные жирные кислоты не синтезируются в ткани жвачных, поэтому их концентрация в молоке тесно связанна с

веществами, поглощенными в кишечнике, следовательно, веществами, выходящими из рубца.

Эти количества могут быть увеличены за счет потребления кормов насыщенных полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) и факторами, которые снижают биогидрогенацию рубца [101]. Коровье молоко содержит ПНЖК ~ 5% от общего количества жирных кислот в основном включает линолевую (1,5-2%) и α - Линоленовую кислоты (0,3-0,9%) и их позиционные и геометрические изомеры [114]. Молочный жир также содержит транс-$C_{18:2}$ изомеры в средних количествах приблизительно 0,5% [140].

В последние годы наблюдается значительный интерес к положительным эффектам ПНЖК за счет их участия в нескольких биохимических и физиологических процессах обмена веществ. Причина, которого в исследованиях о положительном эффекте полиненасыщенных жирных кислот на здоровье человека [130,109,134].

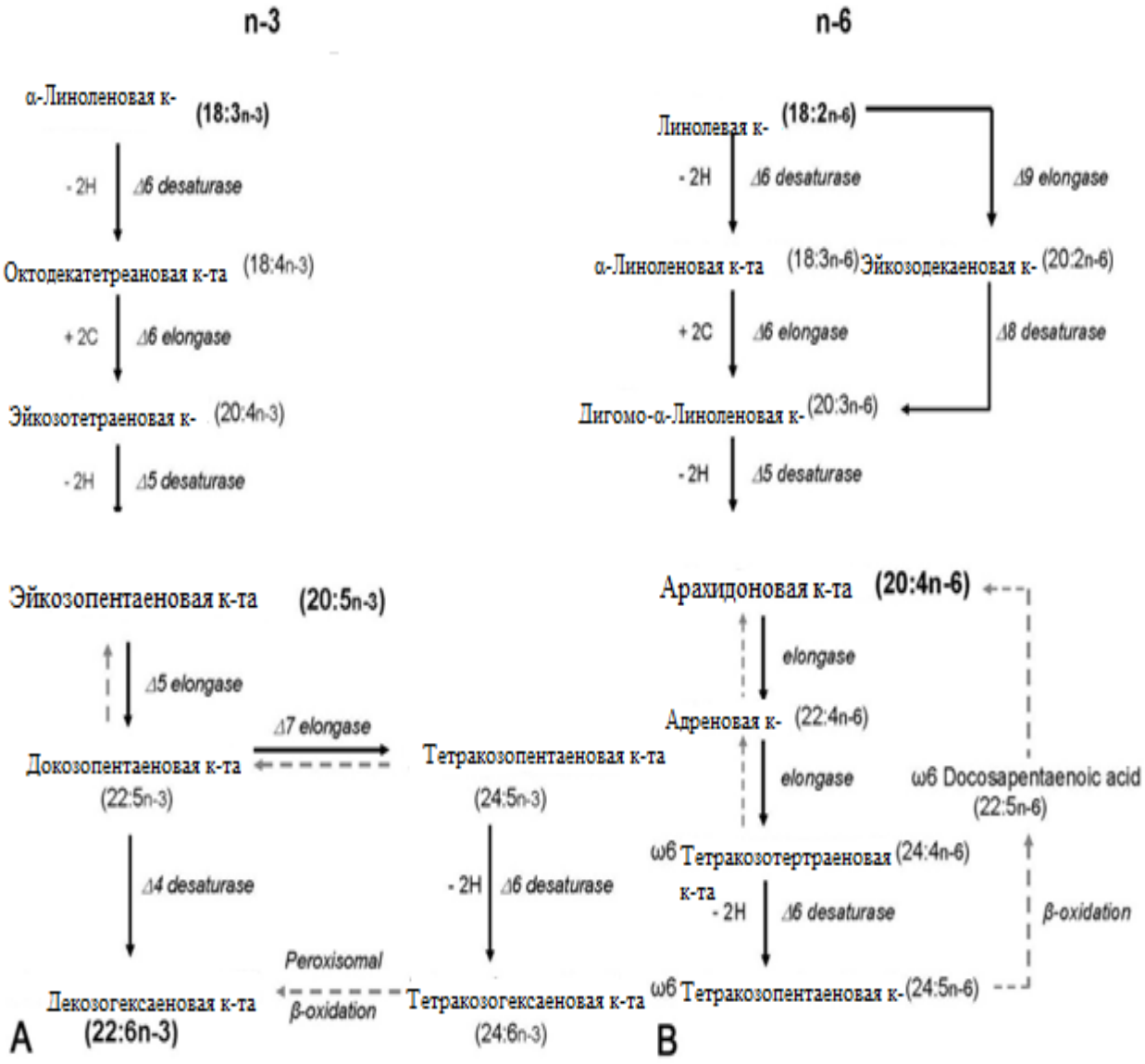


Рисунок 3- Метаболические пути для n-3 (A) и n-6 жирных кислот (B)

1.2.2 Триацилглицериды (ТАГ) жировой фракции молока

В составе молочного жира триглицериды (ТГ) составляют около 98%. Они состоят из глицерина, к которому этерифицированы три жирных кислоты. Состав ТГ обычно определяется по видам и количествам присутствующих жирных кислот. Однако структура триглицеридов также включает распределение жирных кислот внутри триглицеридной молекулы, а также идентификацию отдельных молекулярных видов ТГ. Триглицериды молочного жира состоят из широкого спектра жирных кислот. Согласно общему числу углеродных атомов, триглицериды молочного жира начинаются от C_{24} до C_{54}, и бывают

короткоцепочечными (C_{24}-C_{34}), среднецепочечными (C_{36}-C_{44}) и длинноцепочечными (C_{46}-C_{54}) [130]. Питание, сезон, стадия лактации и отдельные факторы влияют на долю отдельных типов ТГ. Состав жирных кислот и их позиционное распределение глицериновой основе ТГ (рисунок 4) отражает механизм биосинтеза молочного жира. Кроме того, физические свойства, такие как температура кристаллизации и температура плавления, которые играют важную роль в структуре и вкусе молочного жира, не могут быть полностью объяснены свойствами отдельных жирных кислот, но они зависят от свойств триглицеридной композиции [109].

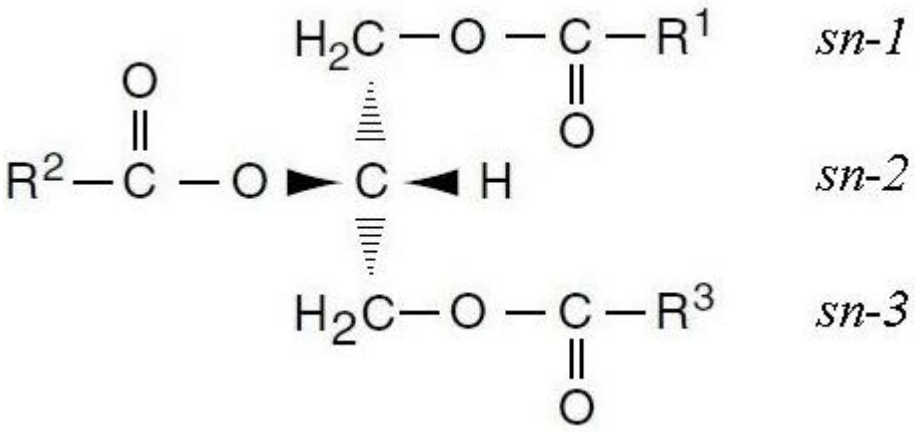


Рисунок 4-Строение триацилглицеридов. R обозначает алифатическую цепь. R1, R2 и R3 обозначает стереоспецифическое число (sn) три ацильных положения

Известно, что распределение жирных кислот в трех стерео-положениях (sn) в триглицеридах не является случайным. Обычно распределение жирных кислот в соответствующих стереоположениях оценивается на основе выборочных проверок. Данные исследований показывают, что $C_{4:0}$, $C_{6:0}$ и $C_{8:0}$ жирные кислоты почти полностью этерифицированы в позиции sn-3. $C_{10:0}$, $C_{12:0}$ и $C_{14:0}$ предпочтительно находятся в положении sn-1 и sn-2. $C_{18:0}$ предпочтительно этерифицируют в положении sn-1, тогда как $C_{18:1}$ позиционируется в sn-1 и sn-3 положении. Транс - мононенасыщенные жирные кислоты включены в состав триглицеридов таким же образом, как и их цис-изомеры [136].

1.2.3 Стерины (Стеролы)

Стерины (или стеролы) - это природные органические соединения, производные стероидов. По содержанию их в различных видах жиров стерины делятся на группы: зоостерины (содержатся в жирах животного происхождения - холестерин), фитостерины (стерины жиров растений – β-ситостерин, брассикастерин, кампестерин и стигмастерин) и микостерины (содержатся грибах). Холестерин и β- ситостерол являются полициклическими стероидными соединениями со сходной химической структурой. Холестерин является типичным животным стеролом, т.е. его содержание в молочном жире составляет 95-98%, β- ситостерол относится к так называемым фитостеринам. Как холестерин, так и фитостеролы встречаются в свободных и этерифицированных формах [98]. Стеролы могут образовывать различные молекулярные соединения и трансформироваться в другие соединения. Так фитостерол - эргостерол является провитамином D_2, холестерол в аналогичных условиях образует биологически активный препарат D_3.

1.2.4 Составные липиды

Составные липиды, также называемые полярные липиды, поскольку они содержат заряд, то есть кислотные и / или основные группы. Они обладают сильно амфиполярными свойствами и практически нерастворимы в воде, а также в масле. Являются поверхностно активными веществами и образуют бислои, которые являются основной структурой клеточной мембраны. В молоко они в основном присутствуют в мембране жировой глобулы и в липопротеиных частицах. Наиболее важными полярными липидами являются фосфолипиды. Фосфолипиды представляют собой амфифильные молекулы с гидрофобным хвостом и гидрофильной головной группой. Они подразделяются на две основные группы: глицеролфосфолипиды и сфинголипиды. На рисунке 5

представлена химическая структура фосфолипида (а) и упрощенный способ получения фосфолипида (б).

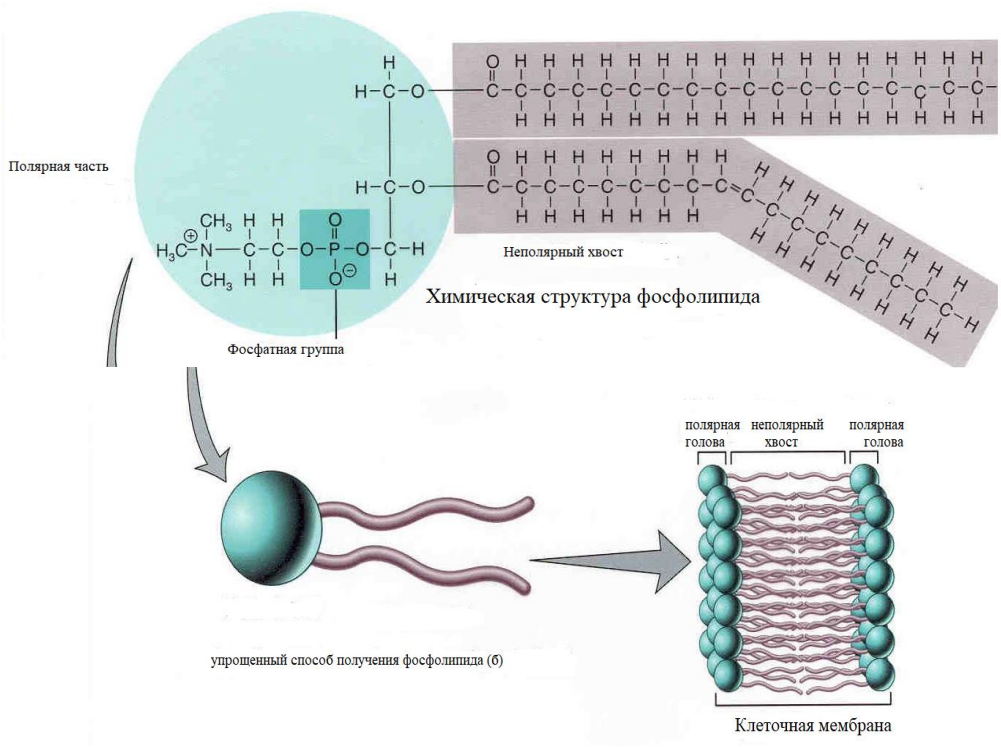


Рисунок 5-Химическая структура фосфолипида

Глицеролфосфолипиды (рисунок 6) состоят из глицерина, основной цепи, на которой этерифицировано две жирных кислоты и фосфатный остаток с различными органическими группами (например, холин, этаноламин, серин, инозит) может связанный по третьей гидроксильной группе. Жирные кислоты, этерифицированы в sn-1 и sn-2 положении глицериновой основы.

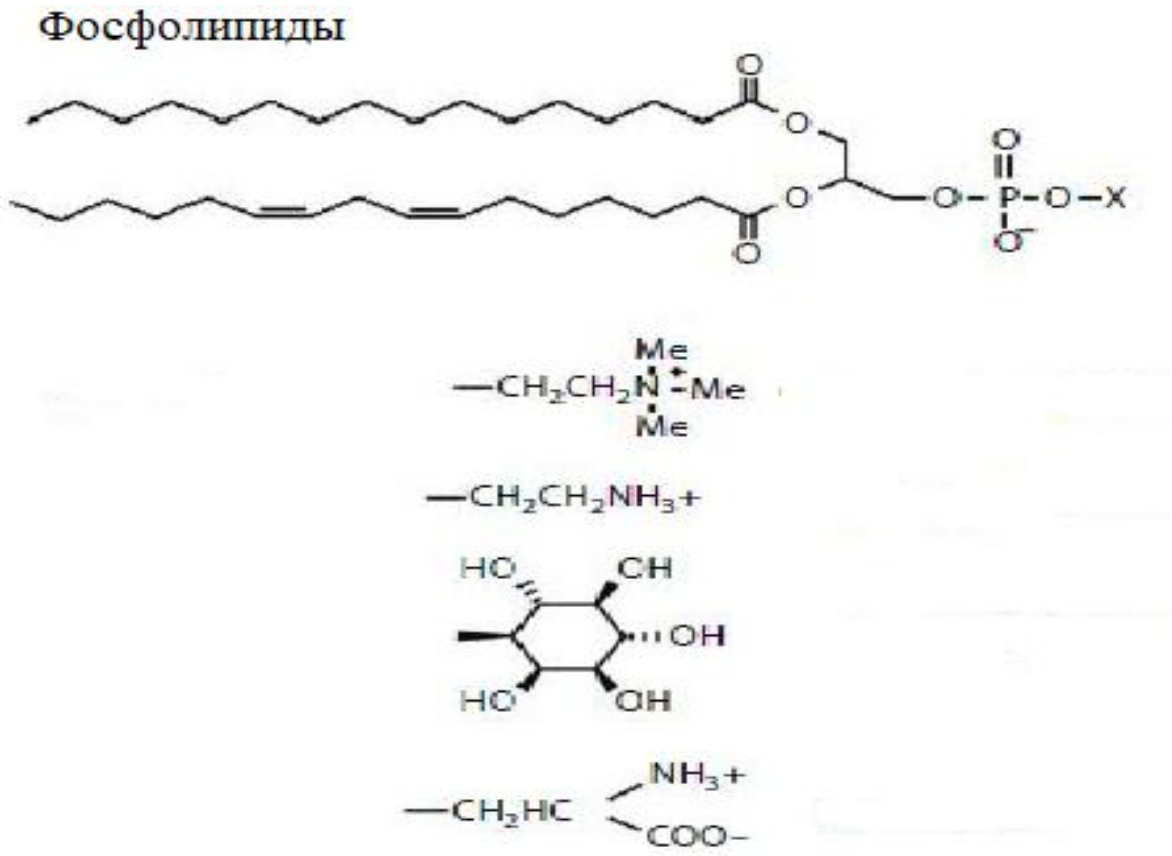


Рисунок 6-Структура основных глицеролфосфолипидов в молочном жире

Сфинголипиды образуются из сфингозина; сфингомиелин встречается наиболее часто, и состоит из группы фосфорилхолина и жирной кислоты, связанной с амином азота сфингоидов длинной цепью (рисунок 7). Церамид образуется, когда аминогруппа этого сфингоида длинной цепью связана с жирной кислотой. На этом церамидном блоке органофосфатная группа может быть связана с образованием сфингофосфолипида (например, фосфохолин в случае сфингомиелина) или сахарид формы сфингогликолипидов (гликозилцерамидов).

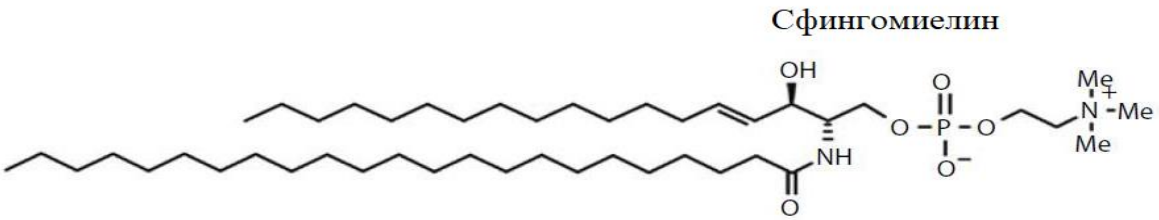


Рисунок 7- Структура сфингомиелина

Глицеролфосфолипиды и сфинголипиды являются количественно наиболее важными полярными липидами в молоке. Они составляют около 0,5-1%

молочного жира и около 60-70% полярных липидов в молоке находятся в данных формах, размещенные главным образом во внешней двухслойной мембране [135].

Состав жировой фракции молочного жира представляет собой сложную и разнообразную систему, состоящую из множества компонентов, каждый из которых отвечает за определенную функцию. Жирные кислоты и триацилглицерины самые представительные составляющие жиров и составляют порядка 98% от всех компонентов липидов. И, следовательно, будут подвергаться наибольшему влиянию при внесении инородных компонентов.

1.3 Современные тенденции идентификации жировой фракции молока и молочных продуктов жирами не молочного происхождения

Идентификация – это отождествление, установление совпадения чего-либо с чем-либо. Применительно к товару под идентификацией следует понимать установление соответствия наименования товара, указанного на маркировке или в сопроводительных документах, предъявляемым к нему требованиям [75].

Согласно ГОСТ Р 51293-99 «Идентификация продукции. Общие положения». Идентификация продукта проводится для защиты потребителя; обеспечения безопасности товара для окружающей среды, жизни, здоровья потребителя, его имущества и подтверждение соответствия товара предъявляемым к нему требованиям [5].

В техническом регламенте ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» говорится о следующих методах идентификации пищевой продукции:

1) по наименованию - путем сравнения наименования и назначения пищевой продукции, указанных в маркировке на потребительской упаковке и (или) в товаросопроводительной документации;
2) визуальным методом - путем сравнения внешнего вида пищевой продукции с признаками, изложенными в определении такой пищевой продукции;

3) органолептическим методом - путем сравнения органолептических показателей пищевой продукции с признаками, изложенными в определении такой пищевой продукции в настоящем техническом регламенте или в технических регламентах Таможенного союза на отдельные виды пищевой продукции. Органолептический метод применяется, если пищевую продукцию невозможно идентифицировать методом по наименованию и визуальным методом;
4) аналитическим методом - путем проверки соответствия физико-химических и (или) микробиологических показателей пищевой продукции признакам, изложенным в определении такой пищевой продукции в настоящем техническом регламенте или в технических регламентах Таможенного союза на отдельные виды пищевой продукции. Аналитический метод применяется, если пищевую продукцию невозможно идентифицировать методом по наименованию, визуальным или органолептическим методами.

Понятие идентификации зачастую связано с понятием фальсификации. Фальсификация – подделка, подмена в процессе изготовления продукции определенного качества другой, менее ценной, не соответствующей своему названию, и реализация её в корыстных целях [76].

Для оценки ситуации сложившейся в настоящее время в молочной отрасли необходимо учитывать множество факторов влияющих на нее за последние годы. Нехватка молока сырья, прежде всего, сказывается на производстве таких продуктов как сыр или масло. И как следствие появление фальсификата на рынке молочных продуктов [12].Фальсификация молока и молочных продуктов жирами не молочного происхождения является современной тенденцией с все более увеличивающимися оборотами. Согласно сообщениям последних лет о случаях фальсификации продуктов питания, молоко и молочные продукты входят в число ведущих категорий подвергающихся мошенническим действиям со стороны не добросовестных производителей [116].

Потребитель всегда заинтересован в молочных продуктах соответствующих стандартам качества. Это означает, что большинство потребителей предпочитают натуральные молочные продукты без заменителей молочного жира. В разных странах отношение к продуктам переработки молока с заменителями молочного жира различно, есть страны, где это допустимо, но есть и такие где таковые продукты полностью запрещены.

Молоко является очень дорогим сырьем, поэтому с экономической точки зрения является крайне привлекательным объектом фальсификации для недобросовестных производителей [87]. В этом случае крайне важно чтобы вносимые ингредиенты не молочного происхождения выносились на этикеточную надпись при маркировке продуктов. Постановлением Правительства Российской Федерации от 28.01.2019 г. № 50 внесены изменения в Правила продажи отдельных видов товаров, согласно которым Правила дополняются новым пунктом 33^1 следующего содержания: «В торговом зале или ином месте продажи размещение (выкладка) молочных, молочных составных и молокосодержащих продуктов должна осуществляться способом, позволяющим визуально отделить указанные продукты от иных пищевых продуктов, и сопровождаться информационной надписью «Продукты без заменителя молочного жира»[76].

Это требование предназначено для того, чтобы помочь потребителям выбрать правильные продукты путем дополнительной визуализации раздельного распределения молочных продуктов в зависимости от их типа и состава ингредиентов, при котором те виды молочной продукции, которые соответствуют определениям «молочный продукт», «молочный составной продукт», «молокосодержащий продукт», приведенном в техническом регламенте Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013), будут сгруппированы таким образом, чтобы их локальное размещение исключало смешивание, прежде всего, с теми видами молочной продукции, которые относятся к «молокосодержащему продукту с заменителем молочного жира», определение и виды которого также указаны в ТР ТС 033/2013[78]. Не смотря на требования закона, остаются производители,

выпускающие явные подделки или продукты заниженного качества в целях получения сверхприбыли за счет обмана потребителей, что ведет к возможному вреду здоровья населения Российской Федерации. Также со вступлением России в ВТО, где к пищевым продуктам предъявляются высокие требования по показателям качества и безопасности, исследования, направленные на безопасность пищевой продукции можно считать наиболее актуальными.

1.4 Виды и свойства жиров применяемых при фальсификации молочного сырья

Согласно литературным данным молочные продукты фальсифицируются как жирами растительного происхождения (пальмовое, кокосовое), так и животного (говяжий) [87]. Разнообразие состава жировой продукции можно привести к некой условной классификации по различным признакам характерным для пищевых жиров (рисунок 8)[79].

Жиры животного происхождения получают из жировых тканей некоторых животных. По назначению их делят на пищевые, медицинские и технические жиры. Животные жиры в промышленном объеме вырабатывают следующих видов: говяжий, бараний, свиной и конский. Качество животных жиров регламентируется в соответствии требованиям ГОСТ 25292-82. Жиры животного происхождения в отличие от жиров растительных содержат большое количество насыщенных жирных кислот (таблица 3)[32].

Таблица 3-Состав основных жирных кислот животных жиров, %

Наименование жиров	Насыщенные жирные кислоты			Ненасыщенные жирные кислоты		
	Миристиновая $C_{14:0}$	Пальмитиновая $C_{16:0}$	Стеариновая $C_{18:0}$	Пальмитолеиновая $C_{16:1}$	Олеиновая $C_{18:1}$	Линолевая $C_{18:2}$
Свиной	0,8-1,4	27-30	13-18	1,7-2,5	37-44	8-9
Говяжий	3,0-3,4	24-29	20-24	2,1-3,0	35,5-42	2-5
Бараний	2,2-3,2	23-30	20-31	12-13	35-41	3-4

Рисунок 8 – Классификация жиров

Растительные жиры – продукты, извлеченные из растительного вещества и состоящие в основном из триглицеридов высших жирных кислот. Основными источниками растительных масел являются масличные растения. Растительные масла на 94-96% состоят из смесей триглицеридов высших жирных кислот. Остальные состоят из незначительных компонентов, таких как фосфолипиды, стерины и другие компоненты. В зависимости от триглицеридного состава растительные жиры поделены на твердые (пальмовое, кокосовое, пальмоядровое и какао) и жидкие (подсолнечное, кукурузное и др.) [81,70]. Также в зависимости от преобладания фракции жирных кислот растительные жиры делятся на несколько групп (таблица 4) [32].

Таблица 4 - Классификация жиров по фракционному составу жирных кислот

Лауриновая (>2% низкомолекулярных жирных кислот)	-Кокосовое -Пальмоядровое
Эруковая (>2%высокомолекулярных жирных кислот C_{20}-C_{22})	-Масла крестоцветных культур
Линоленовая (в составе содержится2-20% линоленовой кислоты)	-Соевое -Рапсовое -Горчичное и др.
Пальмитиновая(>17% пальмитиновой кислоты)	-Пальмовое -Какао
Олеиновая	-Подсолнечное -Оливковое
Линолевая	-Кукурузное -Подсолнечное

Биологическая ценность растительных масел, богатых полиненасыщенными жирными кислотами, может быть выше, чем у жиров животного происхождения. Они являются источником незаменимых ненасыщенных жирных кислот – линоленовой,арахидоновой и линолевой. Но при этом разнообразие жирных кислот беднее и состав их не сбалансирован [49]. Важной составляющей растительных масел является наличие фитостеринов. Характерным стерином растительных жиров является β - ситостерин – предшественник витамина Д. Холестерин, содержащийся в жирах животного происхождения, в растительных маслах практически не содержится[76].Все фитостерины имеют туже структурную основу, как и холестерин. Отличаются они только на концевых цепях, что, однако значительно меняет их биологическую функцию [85]. Так фитостерины способны снижать уровень холестерина в крови путем ингибирования всасывания в кишечнике экзогенного и эндогенного холестерина, тем самым уменьшая риск возникновения сердечнососудистых заболеваний [112].

1.5 Методы контроля жировой фазы молока и молочной продукции

Для оценки основных показателей, характеризующие свойства сливочного масла, а также применяемые для аутентификации исследуемой жировой фазы используются методы анализа представленные в таблице 5[37].

Таблица 5-Методы оценки жировой сливочного масла

Показатели	Характеристика методики оценки
Число омыления	количество гидроксида калия, используемого для омыления связанных и свободных жирных кислот, составляющих тестируемый жир. Количество омыления является стабильным показателем, который варьируется в узких пределах для одного и того же типа масла или жира. Число омыления напрямую связано с составом жировой фазы. Например, чем больше моно- и диглицеридов в жирах, тем ниже этот показатель
Йодное число	-варьируется в определенных пределах и является важным показателем, характеризующим ненасыщенность жира. Йодное число варьируется в зависимости от длины углеродной цепи жирных кислот и их молекулярной массы. По мере увеличения молекулярной массы йодное число уменьшается с тем же числом двойных связей. По мере увеличения числа двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах оно увеличивается
Число Рейхерта-Мейссля	указывает на содержание низкомолекулярных жирных кислот (масляной и капроновой), которые растворяются в воде и испаряются при нагревании. По значению этого показателя можно судить о природном характере молочного жира, поскольку он, в отличие от других жиров, имеет высокое число Рейхерта-Мейссля
Число Поленске	характеризуется наличием летучих нерастворимых в воде низкомолекулярных жирных кислот (каприновой и каприловой) в жирах. Суть этого метода заключается в определении объема раствора гидроксида натрия, используемого для нейтрализации летучих водонерастворимых жирных кислот, содержащихся в жире, после процедуры омыления

Описанные методы имеют свои положительные стороны, но являются узконаправленными. Применение этих методов позволяет анализировать отдельные составляющие жиров, без возможности оценить состав жирных кислот целиком.

1.5.1 Хроматографические методы анализа

Среди применяемых в настоящее время методов контроля качества и состава жировой фракции особое место занимают хроматографические методы. Традиционные химические показатели являются достаточно простыми в определении, но часто являются недостаточными для полноценной оценки качества и проверки подлинности жиров. Для решения этой проблемы необходимо широкое внедрение современных высокоточных инструментальных методов, и таковыми являются методы хроматографического анализа, позволяющие получать наиболее полную информацию о составе жировой фракции. Наиболее современным и информативным методом в настоящий момент

является хромато – масс спектрометрия. В этом методе сочетаются хроматографическое разделение с получением масс- спектров компонентов.

Анализ структуры жирных кислот хорошо воспроизводим с применением метода газовой хромато-масс спектрометрии (ГХ-МС). Однако особенности данного метода не позволяют определять важные структурные показатели жирных кислот: изомеризация углеродной цепи, расположение - ОН групп, и расположения двойных связей [113].

Дериватизация жирных кислот в их метиловые эфиры позволяет определять некоторые виды разветвления углеродных цепей, расположение двойных связей или другие виды ненасыщенности жирных кислот, так как структурная информация, получаемая из масс спектров, не позволяет получить достаточную информацию о данных структурах. Это связано и с ионизацией двойных связей, в ненасыщенных жирных кислотах возникающей при электронном ударе. Для того чтобы преодолеть проблему миграции можно провести реакцию карбоксильной группы с соединениями азота с образованием амида. В результате которой, амидные производные приобретают множество сайтов с положительным зарядом, в результате чего удается минимизировать ионизацию двойной связи [139].

В то же время основной проблемой при разработке хроматографических методов является поиск условий, позволяющих разделить компоненты в оптимальных условиях, обеспечивая адекватное решение в течение разумного времени и затрат ресурсов. Хроматографический метод - масс-спектрометрия в этом случае не только требует нескольких подходов к решению проблемы, но и является довольно дорогостоящим, что ограничивает его использование в рутинных анализах. Аналогичный вывод можно сделать из высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании со спектрометрией ядерного магнитного резонанса (ВЭЖХ-ЯМР). Этот гибридный метод в основном используется в научных целях при изучении состава жиров из нетрадиционного сырья.

Для контроля состава и подлинности жиров в рутинных анализах, капиллярная фазовая хроматография (ГХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в комплексе могут быть более предпочтительными,

обеспечивая полную оценку состава жирных кислот, состава триацилглицеридов (ТАГ) и фракции стеролов [68].

Газовая хроматография (ГХ) - хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара - инертный газ (газ-носитель). Неподвижной фазой является высокомолекулярная жидкость, закрепленная на пористый носитель или на стенки длинной капиллярной трубки, или только твердое пористое вещество, заполняющее колонку. В результате чего газовая хроматография разделяется на газо-жидкостную и газо-твердофазную. Газовая хроматография - это универсальный метод разделения смесей различных веществ, которые испаряются без разложения. В этом случае компоненты разделяемой смеси перемещаются вдоль хроматографической колонки с потоком газа-носителя. Во время движения общая смесь многократно распределяется между газом-носителем (подвижная фаза) и неподвижной фазой [68]. Принцип разделения заключается в неодинаковом сродстве веществ к летучей подвижной фазе и стационарной фазе в колонне. Компоненты смеси селективно задерживаются последними, поскольку их сродство к этой фазе различно и, таким образом, разделяется (компоненты с высоким сродством требуют более длительного времени для выхода из стационарной фазы, чем компоненты с более низким сродством). Вещества затем выходят из колонки и регистрируются детектором. Сигнал детектора записывается в виде хроматограммы и записывается компьютером [93]. Общая схема газового хроматографа представлена на рисунке 9.

Метод капиллярной газовой хроматографии - современный метод многокомпонентного анализа, который характеризуется, высокой точностью, чувствительностью и автоматизацией процесса анализа. Метод используется для решения многих аналитических задач.

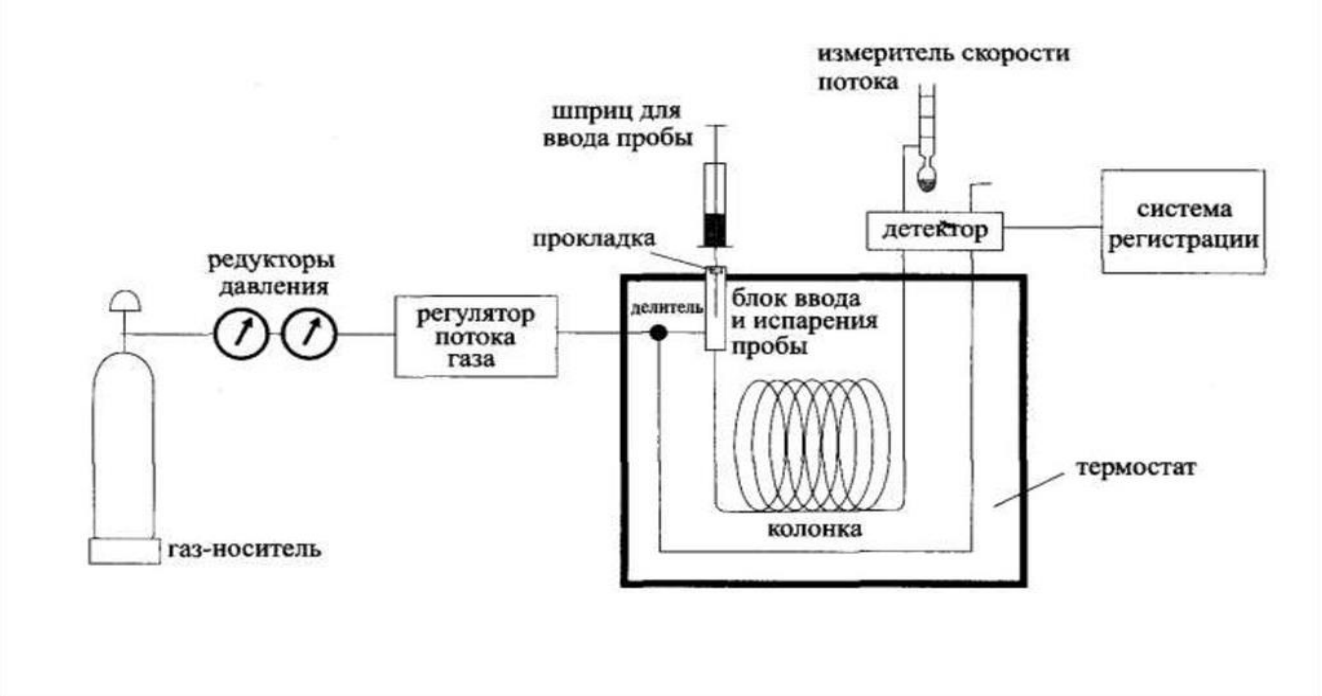


Рисунок 9 - Общая схема газового хроматографа

Количественный газохроматографический анализ, эффективно используется при разделении веществ, относящихся к родственным классам соединений (спирты углеводороды, органические кислоты, и т.д.). Метод капиллярной газовой хроматографии успешно применяется для анализа сложных многокомпонентных смесей.

Так же использование реакционной газовой хроматографии для исследования нелетучих и термонеустойчивых соединений посредством химических превращений на входе или на выходе из капиллярной колонки существенно расширяют возможности применения этого метода.

При изучении жирнокислотного состава жиров учитывают жирные кислоты с составом от 4 до 26 атомов углерода, которые включают как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты с разветвленным углеродным скелетом, и жирные кислоты с большим количеством геометрических и позиционных изомеризаций. Состав жирных кислот молочного жира долгое время использовался в качестве критерия для выявления фальсификации немолочными жирами, главным образом потому, что молочный жир характеризуется жирными кислотами с короткой цепью, в то время как растительные масла содержат в основном жирные кислоты со средней и длинной цепью [136].

Основываясь на этих знаниях, исследования, связанные с обнаружением и количественной оценкой немолочных жиров в молоке и молочных продуктах, постоянно развиваются. Destaillats и другие [32]установили, что немолочные жиры в молочном жире могут быть обнаружены путем анализа триацилглицерина (ТАГ) с помощью газожидкостной хроматографии. В связи с тем, что жирнокислотный состав молочного жира достаточно вариативен и имеет широкие границы содержания жирных кислот, зависящие от времени года, условий кормления и лактации, то определение состава ТАГ было предложено в качестве средства для обнаружения смесей чужеродных жиров в молочном жире и было рассмотрено Европейским сообществом в качестве официального метода оценки чистоты жира в коровьем молоке [108].Данный метод был разработан D.Precht, который в своих работах предлагал для разделения триацилглицеридов (ТАГ) использовать насадочную колонку, которая позволяла разделять триглицериды по количеству атомов углерода [103].

В последние годы были разработаны несколько альтернативных методов основанных на методе Прехта с использованием коротких капиллярных колонок, которые обеспечивают тот же результат, но с большей эффективностью за счет увеличения количества и скорости газа носителя, что приводит к оптимальной производительности при разделении триглицеридных семейств [92,98]. Принцип данного метода заключается в экстракции жировой фракции из анализируемого продукта с последующим прямым определением с применением метода газожидкостной хроматографии. Для определения триацилглицеридов используются высокотемпературные газовые хроматографы способные работать в температурном режиме до 450^0C. Разделение проводится посредством капиллярной колонки длиной 30м с нанесенной неполярной фазой. Идентификацию ТАГ проводят путем сравнения времен удерживания компонентов аналита с временами удерживания стандартного образца триглицеридов состава C_{24}-C_{54}. Количественный расчет проводится аналогично жирнокислотному составу путем нормализации [107].

Один из вариантов жидкостной хроматографии, применяемый в анализе липидов, - обращено-фазовая хроматография. Метод обращено-фазовой (ОФ) хроматографии является в настоящее время доминирующим в применении методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Причины такого широкого использования метода в том, что для него налажено производство различных вариантов сорбентов, а используемые растворители, позволяют работать с оптическими детекторами. Пределы прозрачности растворителей лежат в области 190-220нм, что при использовании наиболее доступного УФ - детектора делает возможным анализ сложных эфиров, жиров и других компонентов [68].

Пределы прозрачности растворителя находятся в диапазоне 190-220нм, что при использовании самого дешевого УФ - детектора позволяет анализировать сложные эфиры, жиры и другие компоненты.

Ввиду того, что жиры и их производные интенсивно поглощают ультрафиолетовое излучение в широком диапазоне длин волн 200-800нм, спектрофотометрические детекторы чаще всего используются для анализа высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Детектор рассеяния света (ELSD) также используется для определения состава триацилглицеридов. Принцип его работы основан на разности давлений пары хроматографических растворителей, содержащихся в составе элюента и аналитов. Элюент образца на выходе из колонки вводится в распылитель, смешивается с газом (азотом или воздухом) и в виде мелкого аэрозоля попадает в нагретую испарительную трубку (30-160 °C), в которой подвижная фаза испаряется, образуя тонкий туман из высушенных частиц образца. Поток частиц нелетучих аналитов рассеивает световой поток в рассеивающей камере, в которой находится стеклянный стержень, расположенный перпендикулярно световому потоку на расстоянии 2-5 мм от него. Стержень служит коллектором рассеянного света, через который часть рассеянного света попадает в фотоумножитель.

В качестве источника света в этом типе устройства чаще всего используется светодиодная или полихромная лампочка. Показания детектора прямо

пропорциональны массовому расходу вещества, что особенно важно при использовании колонок малого диаметра, тогда как вклад детектора в не колоночную эрозию составляет 0,1-0,2мкл. Нулевая линия стабильна даже при высоком градиенте концентрации. Это учитывает высокие пределы обнаружения. Например, в случае глюкозы предел обнаружения составляет менее 20нг [74].

Основным требованием при работе с детектором светорассеяния является условие, чтобы анализируемые вещества не были летучими при рабочей температуре испарительной трубки температуре детектора.

Как и рефрактометрический детектор, испарительный детектор светового рассеяния является универсальным детектором. Он позволяет обнаружить в принципе любое вещество, менее летучее, чем подвижная фаза. При этом детектор светорассеяния более чувствителен, чем рефрактометрический. Сигнал зависит не от оптических свойств пробы, а от типа функциональных групп и состава подвижной фазы, отсутствует температурная зависимость. Использование данного типа детектирования позволяет проводить качественное разделение триацилглицеридов для анализа масел и жиров[132].Данный метод с успехом применяется для выявления фальсификации в какао масле [124]. Принцип данного метода также основан на разделении триацилглицеридов по количеству атомов углерода без рассмотрения их внутренней структуры.

Развитие метода газовой хроматографии позволяет решить эту проблему, и провести оценку структуры триацилглицеридов.

Применение методов газовой и жидкостной хроматографии широко используется для анализа жиров. Но использование этих методов следует применять с учетом их особенностей, чтобы проводить анализ компонентов жировой фазы с максимальной эффективностью.

1.6 Анализ жирнокислотного и триацилглицеридного состава молока сырья как средство идентификации жировой фазы молочной продукции

Свойства молочного жира в основном зависят от структуры и состава жирных кислот. Молочный жир содержит много жирных кислот, гораздо больше, чем растительные и животные жиры. Состав жирных кислот связан со многими факторами. Это могут быть факторы, связанные с самим животным - генетические особенности, стадия лактации, рубцовая ферментация и т.д.

Наиболее сильное влияние на жирнокислотный состав, оказывается, посредством рациона кормления, особенно это отмечается при переходе от летних условий кормления к зимним [60]. Все это обуславливает вариативность состава жировой фазы молока и влияет на состав жирных кислот и триацилглицеридов.

Нормативной документацией зафиксированы значения жирнокислотного состава только для таких объектов как масло и паста масляная из коровьего молока приведенные в таблице 6[54].

Таблица 6-Диапазоны содержания жирных кислот масла и пасты масляной

Жирные кислоты	Диапазоны содержания жирных кислот, % по ГОСТ Р32261-2013
Масляная ($C_{4:0}$)	2,4-4,2
Лауриновая ($C_{12:0}$)	2,0-4,4
Миристиновая ($C_{14:0}$)	8,0-13,0
Пальмитиновая($C_{16:0}$)	21-35
Стеариновая ($C_{18:0}$)	8-13,5
Олеиновая($C_{18:1Cis}$)	20-32
Линолевая ($C_{18:2\ Cis}$)	2,2-5,5

Тогда как нормирование состава жирных кислот молока сырья, как отправной точки производства молочной продукции, нигде не зафиксировано. Отсутствие стандартов относительно содержания жирных кислот в молочном сырье приводит к отсутствию информации об изменении состава молочных жирных кислот под влиянием различных факторов, таких как качество сырого молока и методы технологической обработки. Что в свою очередь приводит к недостоверной оценке жирно-кислотного состава готовой молочной продукции (простокваша, питьевое молоко, творожные продукты и т.д.)[19].

Вариативность жирнокислотного состава, вносит определенную сложность при идентификации молочного жира и зачастую является недостаточной. Для получения дополнительной информации об аутентичности жировой фазы молока необходимо вводить дополнительные параметры анализа компонентов жировой фазы молока и молочной продукции. Такие сведения можно получить, анализируя состав триацилглицеридов жировой фазы молока. Этот критерий оценки жировой фазы применяется только на территории Европейского союза и поэтому информация о составе триацилглицеридов молока сырья характерного для территории России отсутствует. Изучение состава триацилглицеридов позволит установить нормативы их содержания в молоке сырье и в дальнейшем использовать их для идентификации жировой фазы молочной продукции.

1.7 Влияние жиров немолочного происхождения на состав жирных кислот и триацилглицеридов жировой фазы молока

В настоящее время распространенной практикой является фальсификация молочного жира жирами как растительного, так и животного происхождения.
В основном фальсификация жировой фазы молочной продукции осуществляется путем внесения жиров растительного происхождения (пальмовое и кокосовое масла), однако последние годы нарастает тенденция к внесению жиров животного происхождения, которые по ряду причин гораздо труднее обнаружить контролирующим органам [87]. К одной из таких причин можно отнести низкую информированность и отсутствие параметров изменения состава молочного жира в процессе фальсификации такими жирами.

Пальмовое масло на протяжении многих лет остается ведущим жиром, применяемым при фальсификации молочной продукции. Среди импорта тропических растительных масел оно занимает в России первое место по закупкам [51]. Объем поставок этого продукта на Российский рынок увеличивается ежегодно и за последнее время увеличился в несколько раз [37]. Быстрый рост потребления пальмового масла обусловлен широким использованием в различных отраслях пищевой промышленности и сравнительно

низкой стоимостью.

Кокосовое масло, как правило, редко используется при подмене жиров молока. В пищевых целях обычно используют только рафинированное и дезодорированное кокосовое масло. Быстрый переход от твердого состояния к жидкому в рамках узких интервалов температур является характерной особенностью данного жира. В связи с этим его часто применяют в производстве комбинированных жировых продуктах и, как правило, это мороженое.

Как уже отмечалось ранее, в последние годы участились случаи фальсификации молочной продукции жирами животного происхождения и в частности говяжьим жиром. Эта тенденция связана с достаточно проработанной базой обнаружения растительных жиров и отсутствием методологии выявления жиров животных. На сегодняшний день в России не существует методик обеспечивающих теоретическую и практическую базу по выявлению подобной фальсификации. В связи с этим данное направление исследования является наиболее актуальным в данный момент.

1.8 Применение методик измерений для оценки жировой фазы молока и молочной продукции

Современные аналитические методы позволяют получать полноценную информацию об исследуемом объекте. Однако при работе с биологическими объектами следует учитывать тот факт, что их состав подвержен изменчивости под влиянием различных факторов. Отсутствие четко обоснованных критериев о составе значительно усложняет процесс идентификации. В состав жировой фазы молока входит множество компонентов делающих его состав и структуру многомерной. Проводя аутентификацию подобной структуры только по одному показателю, возможно получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Поэтому подходя к анализу столь сложной структуры необходимо учитывать как можно больше переменных, использование которых позволить сократить возможность ошибки при интерпретации полученных результатов. В частности, последовательный анализ может быть

использован для идентификации молочного жира с использованием современных методов жидкостной и газовой хроматографии. Полученный комплекс данных может быть использован для построения модели идентификации, которая позволит идентифицировать отклонения в составе молочного жира с последующей интерпретацией.

Методы высокоэффективной газовой и жидкостной хроматографии используются для идентификации молочного жира. Они имеют методологическую основу, установленную в России в виде государственных стандартов, методик измерений и директив. В настоящее время следующие нормативные документы используются для определения подлинности молочного жира:

- «ГОСТ 31663-2012 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот»;
- «ГОСТ 31665-2012 Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот»;
- «ГОСТ 31979-2012 «Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринов»;
- «ГОСТ 33490-2015 «Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием».

При изучении этих стандартизованных методик измерений были выявлены некоторые недостатки. Так, использование контролирующими органами данной документации, позволяет проводить анализ жирно-кислотного состава только в ограниченном списке продуктов переработки молока, тогда как современные реалии требуют проведение контроля жировой фазы всей молочной продукции.

Так же применение данных методик достаточно трудоемко и требует длительного времени для проведения анализа, что делает их применение

затруднительным для рутинных анализов, требующих быстрого ответа. Например, при контроле входного сырья на предприятиях по переработке молока.

Тенденция замены молочного жира, жирами немолочного происхождения указывает на то, что производство заменителей молочного жира становится все более технологичным и состав композиций подбирается с учетом установленного нормирования жирных кислот в жировой фазе молока. Это приводит к усложнению идентификации молочного жира только по жирнокислотному составу и требует внедрение дополнительных методик, которые позволят выявлять не заявленное использование подобных жировых смесей. В качестве такой методики возможно применение анализа состава триацилглицеридов молочного жира.

Для выявления фитостеринов в составе жировой фазы молока и молочной продукции необходимо использовать реакционную газовую хроматографию для получения производных стеролов. Для проведения реакции солюбилизации применяют детергент дигитонин.

Использование этого реагента значительно увеличивает время анализа и его стоимость. А анализ возможностей метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, показывает возможность разработки альтернативной методики без использования данного реагента.

Приведенные данные говорят о необходимости доработки методической базы, что позволит в полном объеме обеспечивать контроль жировой фазы молока и молочной продукции.

1.9 Экстракции жировой фазы молока и молочной продукции

Методы экстракции жировой фазы можно разделить на три группы:

1. Методы основанные на экстракции липидов путем экстрагирования неполярными растворителями, такие как диэтиловый эфир, гексан, петролейный эфир и т.д.;

2. Экстракция жировой фазы с применением смеси полярного и не полярного растворителей. Наиболее часто в качестве таких смесей применяют спиртоэфирные смеси. Минусом при использовании бинарных смесей является то, что при этом дополнительно извлекается значительное количество не липидов. В связи с этим необходимо проводить дополнительную стадию очистки полученного экстракта жировой фазы молока и молочной продукции;

3. Экстракция после кислотного или щелочного гидролиза. Для проведения данного процесса экстракции необходимо провести этап гидролиза исследуемого образца с последующим извлечением жирных кислот петролейным или диэтиловым эфиром.

Изучение аспектов экстракции жировой фазы молока и молочной продукции говорит о том, что применение второго и третьего вариантов подразумевает под собой многостадийную подготовку образца. Поэтому для выделения жировой фазы молока из молочной продукции наиболее применим метод первой группы с использованием неполярных растворителей.

Проведение эксперимента для установления метода выделения жировой фазы молока и продуктов его переработки позволит определить максимально эффективную методику экстракции.

1.10 Применение методики «быстрой» газовой хроматографии для определения жирнокислотного состава

Состав жирных кислот молочного жира широко изучается из-за его важности в питании и здоровье человека [123].На сегодняшний день в молочных продуктах выявлено более 400 различных жирных кислот: от 4 до 26 атомов углерода, разветвленных и нет, насыщенных и ненасыщенных (до шести двойных связей), конъюгированных и с большим количеством позиционных и геометрических изомерных характеристик [115].

Газовая хроматография (ГХ), объединенная с длинными высокополярными капиллярными колонками, на сегодняшний день является наиболее подходящей

аналитической методикой для анализа этой сложной композиции. В частности, цианопропилсилоксановые стационарные фазы являются наиболее эффективными капиллярными колонками для разрешения критического разделения цис- и транс-, а также конъюгированных изомеров [104]. Этот хорошо разработанный аналитический подход имеет недостаток в трудоемкости, требующий более 60 минут времени анализа для каждого образца, и этот фактор становится особенно важным, когда требуется регулярный анализ, и требуется быстрый ответ.

Технологические инновации за последние годы для ускорения времени анализа в ГХ привели к эволюции аналитических приборов, которые поддерживают большие скорости потока, высокое давление на входе, быстрые темпы программирования температуры и чувствительную систему обнаружения.

Кроме того, введение капиллярных колонок нового поколения дало преимущество для сохранения эффективности разделения пиков, увеличивая интерес к исследованию разделения жирных кислот быстрой ГХ в сложных биологических матрицах, таких как молоко, и на их аналитические характеристики при оптимизации метода по сравнению с обычными колонками [95,122].

Основной целью «быстрой» ГХ является достижение желаемого разрешения соединений в кратчайшие сроки. Применение этого решения дает возможность установить конкретный, точный, экономящий время и надежный метод ГХ для определения метиловых эфиров жирных кислот в молоке и молочных продуктах. Это позволит применять его для рутинных анализов при контроле молока сырья на входном контроле молокоперерабатывающих предприятий.

1.11 Анализ триацилглицеридного состава молока и молочной продукции

Использование состава триацилглицеридов для идентификации молочного жира использовал в своих работах D.Precht. Его работы основываются на изучении семейств триацилглицеридов по количеству атомов углерода. Полученные данные по составу триацилглицеридов D.Precht применил для

создания методики применяемой в настоящее время в Европейском союзе для идентификации молочного жира. Однако полученные данные, приводимые в данной методике, не позволяют использовать ее для идентификации таких жиров как пальмовый и говяжий. Это связано с тем, что их состав практически идентичен. А с учетом того что данные жиры наиболее часто встречаются при выявлении в жировой фазы молочной продукции жиров не молочного происхождения. Это делает применение данной методики затруднительным.

Применение современных высокотехнологичных капиллярных колонок для определения триацилглицеридного состава, предоставляет возможность изучения структуры каждого отдельного триацилглицерида. Изучение структуры триацилглицеридов различных жиров, может дать ключ к нахождению идентификационных признаков, применение которых даст возможность проводить их идентификацию.

1.12Анализ стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Наиболее важная роль методу ВЭЖХ отведена в тех случаях, когда возникает необходимость проведения не рутинных, а специальных анализов, когда необходимо исключить деструкции определяемых липидов из-за высокой температуры характерной для газохроматографического анализа.

Стерины (или стеролы) представляют собой природные органические соединения, полученные из стероидов. По содержанию жиров различных типов стеролы можно разделить на три группы: зоостеролы (которые содержатся в животных жирах - холестерин), фитостеролы (растительные жирные стеролы - β-ситостерол, брассикастерол, кампестерол и стигмастерол) и микостеролы (содержащиеся в грибах). Холестерин и β-ситостерин являются полициклическими стероидными соединениями со сходной химической структурой. Холестерин является типичным животным стеролом, то есть его содержание жира в молоке составляет от 95 до 98%, β-ситостерин относится к так

называемым фитостеролам. Холестерин и фитостеролы находятся в свободной и этерифицированной форме [98].

Определение состава стеролов в молоке и молочной продукции, во-первых используют для измерения количества холестерина, а во вторых для выявления фальсификации жирами не молочного происхождения. Так как в животных жирах содержится только холестерин, данный метод определения подходит только для выявления жиров растительных, содержащих фитостерины не характерные для молочного жира.

Для определения фальсификации жирами растительного происхождения контрольные организации пользуются следующими методами: ГОСТ 31979-2012 «Метод определения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринов», а также «ГОСТ 33490-2015 «Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием». Оба этих метода имеют как положительные свойства, так и некоторые недостатки. Если рассматривать ГОСТ 31979-2012, то существенным недостатком данного метода является время проведения измерений. Процедура осаждения стеринов в виде дигитонинов и последующие стадии пробоподготовки занимают порядка 12-15 ч, что в некоторых случаях может быть не приемлемо. Наряду с этим реактив дигитонин применяемый для проведения химической реакции является крайне дорогостоящим реагентом, что делает проведение данного измерения в рутинном использовании не рентабельным. ГОСТ 33490-2015 подразумевает использование масс-спектрометрического детектора для проведения измерений состава стеринов. Данный вид детектирования, несмотря на свои положительные качества в виде чувствительности и точности, так же является очень дорогим оборудованием, в связи с чем, мало представлен в контролирующих органах. Изучая возможности методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было определено, что данный метод так же возможно использовать в качестве контрольного для выявления содержания фитостеринов в молочном жире. Разработка быстрого и надежного метода, альтернативного газовой

хроматографии для определения содержания холестерина и фитостеролов в молоке и молочных продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии позволит сократить время пробоподготовки и не требует применения дорогостоящих реагентов.

Заключение по обзору литературы

Отсутствие нормативов по составу жирных в молоке сырье, ведет к отсутствию идентификационных показателей, которые необходимо использовать при аутентификации молочного жира. Молоко сырье является отправной точкой при технологическом процессе создания молочной продукции. Не имея информации о вариативности жирнокислотного состава молока сырья, невозможно оценить влияние технологических процессов на состав жирных кислот. А, следовательно, применять данную методику для аутентификации жировой фракции продуктов переработки молока.

Современные технологии производства пищевых продуктов активно применяются в молочной промышленности. Молочный жир как дорогостоящее сырье, является объектом пристального внимания со стороны разработчиков пищевых ингредиентов, в том числе и различных жиров или жировых смесей которые возможно применять в качестве частичной или полной замены молочного жира. В связи с тем, что контроль жировой фазы молока в России осуществляется в основном посредством анализа жирнокислотного состава, именно этот показатель достаточно хорошо изучен и применяется для составления жировых композиций, в том числе и посредством математических моделей. Это позволяет вносить эти компоненты на уровне, который либо не определяется, либо существенно затрудняет экспертизу подлинности молочного жира. Для решения данной задачи необходимо внедрение дополнительных факторов контроля. В первую очередь это методическое обеспечение, использование которого, даст возможность исследователю получить дополнительную информацию о составе жировой фазы анализируемого объекта, и сделать правильный вывод о его подлинности. В качестве таковой методики

возможно использование метода газовой хроматографии для анализа состава триацилглицеридов. Исследование триацилглицеридного состава молока сырья позволит, так же как и жирнокислотный состав, использовать эту методику для проведения идентификации молочного жира.

Изучение влияния замены жирами не молочного происхождения на состав жирных кислот и триацилглицеридов молочного жира, можно использовать для определения идентификационных признаков характерных как для жиров растительных, так и для животных жиров, применяемых для полной или частичной замены молочного жира. Что в свою очередь можно будет использовать для идентификации жиров и построения расчетных моделей не только для выявления таких добавок, но и для контроля их количества.

Использование узконаправленных методик для контроля многокомпонентных систем приводит к увеличению ошибки интерпретации полученных данных о составе в целом. Поэтому при рассмотрении таких систем следует учитывать максимальное количество факторов образующих данную систему. Наибольший вклад в образование многокомпонентной системы жиров вносят жирные кислоты и триацилглицериды как самая широко представленная составляющая. Так же в качестве идентификационного признака происхождения жиров используется состав стеринов, являющийся специфическим для растительных и животных жиров. Применение таких современных аналитических методов как газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография, позволяет создать комплекс методик, охватывающих многомерную структуру жировой фазы молока. Этот комплекс можно применить для определения алгоритма аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции.

ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Организация выполнения работы

Экспериментальная часть работы выполнялась на базе лаборатории технохимического контроля Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ ВНИМИ).

Информационный блок сформирован на основе литературного поиска по фондам библиотек ФБГНУ ЦНСХБ, электронным научным библиотекам, базам данных и др.

Первоначальный этап работы был представлен в виде анализа отечественных и зарубежных источников литературы, на основании которого были поставлены цели и сформулированы задачи исследования.

На втором этапе работы проводилось планирование эксперимента. Описаны объекты исследования и применяемые методы.

На третьем этапе был проведен эксперимент и набор статистических данных.

Четвертый этап описывает разработку метода аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением полученных экспериментальных данных.

Пятым этапом стала разработка и модификация методик анализа жировой фазы с применением методов газовой и жидкостной хроматографии. Схема проведения экспериментальных работ представлена на рисунке 10.

Рисунок 10 - Схема структуры проведения исследований

2.2 Объекты исследования

Статистические данные по вариативности жирнокислотного состава молока сырья были получены в результате исследований жировой фазы молока сырья отобранного из различных хозяйств Московской, Воронежской, Калужской,

Тульской, Ярославской областей, республики Башкортостан и Краснодарского края. Исследованию подвергались более 1000 образцов молока сырья.

Для проведения экспериментальных работ по построению модельных систем были использованы аналитические стандарты: обезвоженный молочный жир (referens standart BCR519), жир пальмовый (United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard CAS №8002-75-3), жир кокосовый (IRMM801), жир говяжий (CAS №8016-28-2). Модельные жировые системы были построены по следующей схеме: молочный жир (МЖ) → МЖ+10% жира не молочного происхождения (ЖНМП) → МЖ+30% ЖНМП→ МЖ+50% ЖНМП → МЖ+70% ЖНМП МЖ+90% ЖНМП → 100% ЖНМП с последующим измерение состава жирных кислот и триацилглицеридов.

Разработка методики по определению состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии велась с применением следующих аналитических стандартов: Холестерин (Сигма-Олдрич, США), стигмастерол (Сигма-Олдрич, США), β-ситостерол (Сигма-Олдрич, США), брасикастерол(Сигма-Олдрич, США), кампастерол(Сигма-Олдрич, США), метанол, н-гексан, (Мерк, Германия).

В качестве объектов исследования были использованы следующие объекты: молоко сырье, молоко питьевое (пастеризованное и ультрапастеризованное), простокваша, кефир, йогурт, ацидофилин, творог, молоко цельное сгущенное с сахаром, сметана, сухое цельное молоко. Исследования проведены на выработанной молочной продукции, как в условиях перерабатывающих предприятий, так и в лабораторных условиях. Так же в качестве образцов использованы модельные жировые системы состава молочный жир с добавлением жиров немолочного происхождения в различных пропорциях.

2.3 Приборы и методы

Разделение и идентификацию состава жирнокислотного и триацилглицеридного состава осуществляли с применением метода газовой хроматографии с использованием хроматографа «Кристаллюкс 4000М» (ООО

«НПФ Мета-Хром» Россия), снабженного пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой.

Рисунок 11-Газовый хроматограф «Кристаллюкс 4000М»

Имеет следующее оснащение:

1. Пламенно ионизационный детектор (ПИД) – с пределами детектирования $1{,}1*10^{-12}$ гС/с по н-углеводородам и $1{,}1*10^{-12}$ гС/с по пропану.
2. Термостатом колонок объемом 14 л. Данная конфигурация термостата позволяет разместить в нем до 3 капиллярных колонок. Управление термостатом осуществляется с помощью высокоточного алгоритма термостатирования, позволяющего повысить точность поддержания температуры.
3. Одновременный анализ на двух капиллярных колонках с независимым управлением потоками газа-носителя, с делением потока после капиллярной колонки на два детектора и ввод пробы одновременно в две колонки.

Анализ проводили при помощи кварцевой капиллярной колонки 100м*0,25мм ID, 0,2мкм с неподвижной фазой FFAP. В качестве идентификационной смеси использовали стандарт метиловых эфиров жирных кислот (рисунок 12).

В качестве газа носителя использовался азот, при следующей температурной программе разделения: температура T_1 колонки 140ºС (выдержка 5 мин), T_2 240ºС со скоростью 4гр/мин; температура испарения детектора 230ºС; объем вводимой пробы – 1 мкл.

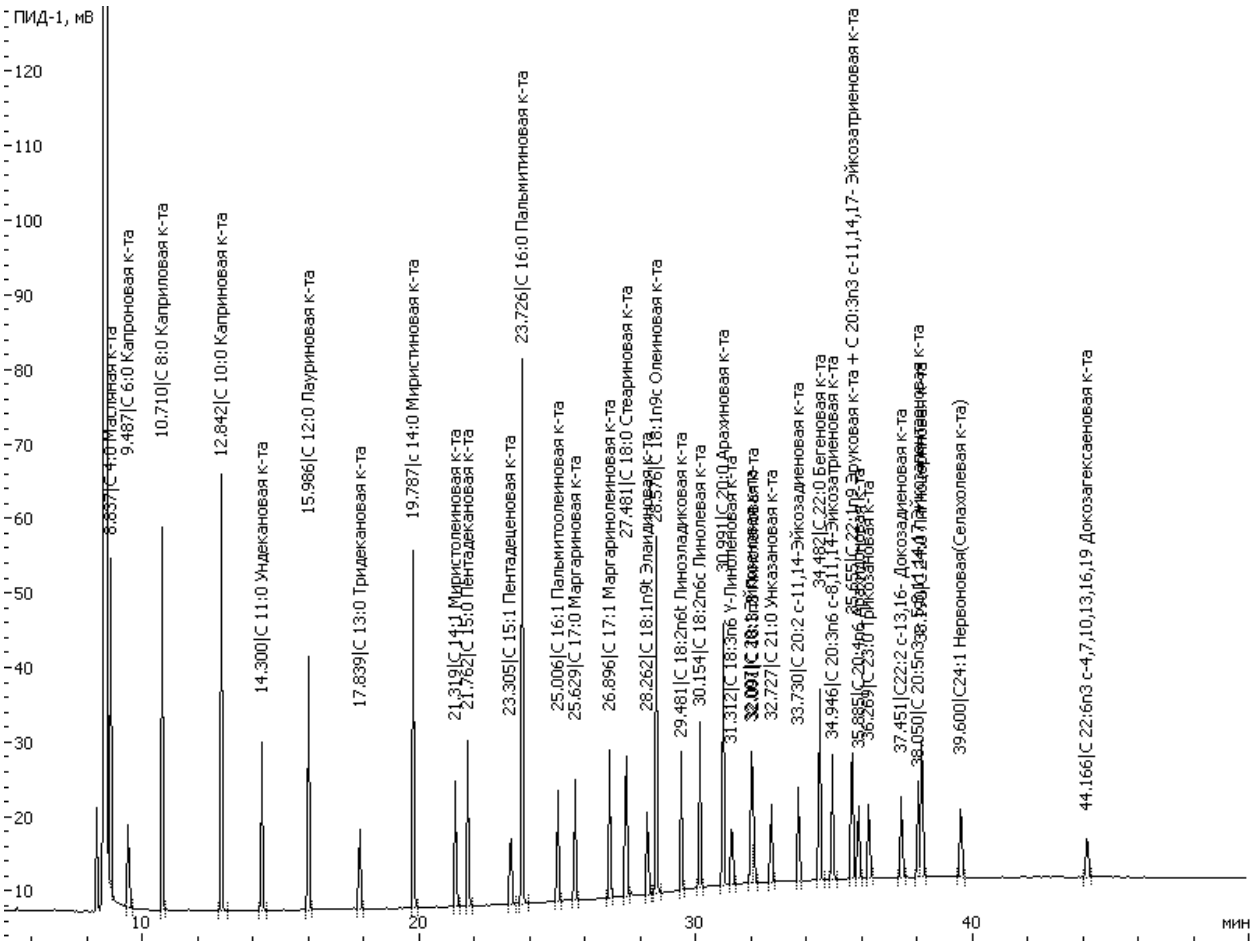


Рисунок 12-Хроматограмма смеси метиловых эфиров жирных кислот

Для управления режимами анализа, записи хроматограмм и обработки полученной информации использовалось программное обеспечение «NetChrom».

Расчет состава метиловых эфиров жирных кислот проводили методом внутренней нормализации.

Площадь пика компонента S_iмм^2, вычисляли по формуле:

$S_i = h_i a_i$

где h_i– высота пика, мм;

a_i – ширина, измеренная на половине высоты, мм.

Результат измерения высоты пика записывали в целых числах, ширину пика фиксируют до первого десятичного знака.

Сумму площадей всех пиков на хроматограмме $\sum S_i$ принимают за 100 %.

Массовую долю каждой кислоты масла X_iвычисляли по формуле:

$X_i = S_i\ 100/\sum S_i$

где S_i- площадь пика метилового эфира, мм^2,

$\sum S_i$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме, мм^2.

За окончательный результат измерений принимается среднее арифметическое значение результатов двух последовательных измерений.

Исследование триацилглицеридного состава жиров так же проводилось на хроматографе «Кристаллюкс 4000М» (ООО «НПФ Мета-Хром» Россия). Данная модель хроматографа имеет модификацию позволяющую работать в диапазонах температур до 450^{0}С.

Разделение и идентификацию состава триацилглицеридов осуществляли с применением метода газовой хроматографии, с использованием хроматографа снабженного пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой RTX 65-TG с неподвижной фазой состава 65% фенилметилсиликон (Restek, Bellefonte, CA, USA) (l = 30м, i.d. = 0.25мм, 0.25мкм). В качестве идентификационной смеси использовали стандарт Supelco BCR 519 с известным составом триацилглицеридов С 24- С54. Эмпирическим путем были подобраны следующие параметры хроматографического разделения: в качестве газа носителя использовали водород; температура T_1 колонки 100ºС, T_2 360ºС со скоростью 5гр/мин; температура испарителя 320ºС, детектора 3700ºС; объем вводимой пробы – 0,5 мкл.

Управление режимами анализа, записи хроматограмм и обработки полученной информации использовалось программное обеспечение «NetChrom».

Расчет состава триглицеридов, так же как и состав жирных кислот, проводили методом внутренней нормализации. За окончательный результат измерений принимали среднее арифметическое значение результатов двух последовательных измерений.

Для определения состава стеринов в молоке и молочной продукции использовался высокоэффективный жидкостной хроматограф Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France).

Рисунок 13- Внешний вид жидкостного хроматографа

Оборудованного насосом типа 305, насосом типа 302 для проведения градиентной подачи элюента и инжектором Rheodyne типа 7125 с петлей 20 мкл. Также использовался спектрофотометрический детектор Gilson 118 с переменной длиной волны.

Использованы следующие параметры хроматографического разделения: колонка для проведения обращено фазового разделения фирмы Dr.MaischReproSilPur-C18 250*4.6, 5мкм. Изократическое элюирование смесью подвижной фазы ацетонитрил/вода(95/5) при скорости потока 1 мл/мин, температура колонки 30ºС. Объем вводимой пробы составлял 20мкл.

Для управления режимами анализа, записи хроматограмм и обработки полученной информации использовалось программное обеспечение «Мультихром».

Расчет состава стеринов проводили по градуировочным графикам, построенным с использованием аналитических стандартов.

2.4 Методики исследования

В процессе написания диссертационной работы для решения поставленных экспериментальных задач были рассмотрены и использованы общепринятые и

стандартные методики измерений. В таблице 7 приведен перечень использованной документации.

Таблица 7- Перечень методик и нормативной документации

№ п/п	Документация	Принципы метода, специфика или стандарт
1	Общие технические условия и методы контроля жиров	«ГОСТ 32261-2013 Масло сливочное. Технические условия». «ГОСТ Р 52253-2004 Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия» «ГОСТ 32189-2013 Маргарины, жиры для кулинарии, кондитерской, хлебопекарной и молочной промышленности. Правила приемки и методы контроля» «МУК 4.1/4.2.2484-09 «Методы контроля. Химические и микробиологические факторы. Оценка подлинности и выявление фальсификации молочной продукции», утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 11.09.2009 г» «ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» «ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции»
2	Методики определения жирнокислотного состава	«ГОСТ 30418-96 Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава» «ГОСТ 32915-2014 Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии» «ГОСТ 30418-96 Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава» «ГОСТ Р 51483-99 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме» «ГОСТ 31663-2012 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот» «ГОСТ 31665-2012 Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот»
5	Оценка жировой фазы по составу стеринов	«ГОСТ 31979-2012 «Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринов» «ГОСТ 33490-2015 «Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»
6	Определение кислотности	«ГОСТ Р 54669-2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности».

Помимо стандартизованных методик и нормативной документации в работе были использованы методики, разработанные в процессе написания диссертационной работы:

- Методика применения «быстрой» газовой хроматографии для определения жирнокислотного состава молока и молочной продукции;
- Оценка жировой фазы по составу триацилглицеридов;
- Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2.5 Обработка результатов исследования

Для определения оптимальных параметров построения алгоритма использования хроматографических методик для аутентификации молочного жира, выполнено несколько этапов экспериментальных работ.

В первую очередь необходимо установить нормирование по жирнокислотному и триацилглицеридному составу для молока сырья характерного для территории России. Полученные данные позволят провести анализ влияния основных направлений технологической обработки сырого молока. Изучение влияния технологических режимов на жирнокислотный состав молока сырья необходимо для оценки изменений состава жирных кислот, которые используются для выявления жиров не молочного происхождения. Недостаточность знаний в этой области может привести к ошибочным заключениям в оценке жировой фазы продуктов переработки молока.

Диапазоны вариативности жирнокислотного и триацилглицеридного состава следует использовать для экспериментальных работ по изучению влияния жиров не молочного происхождения. Выбор молочного жира соответствующего всем показателям состава жирных кислот и триацилглицеридов, позволит провести серию экспериментальных работ на модельных объектах. Проведение экспериментальных процессов проводилось в соответствии с набором факторов позволяющих смоделировать технологический процесс по замене молочного жира жирами иного происхождения. Параметры выбирались с точки зрения

управляемости и возможности математической обработки достаточной для практического применения [21]. Полученный массив данных, после обработки, можно использовать для выявления идентификационных признаков характерных для жиров различного происхождения, а также определить характер изменений при внесении данных жиров в различных соотношениях применительно к молочной продукции.

Исходя из накопленных статистических данных, созданы контрольные формы жировых смесей для построения моделей фальсификации применяемых на рынке молочной продукции. Создание данных форм позволило провести унифицированный эксперимент по использованию различных методик применяемых для изучения липидов молока, а так же впоследствии объединить их в алгоритм аутентификации молочного жира.

Для формирования результатов многофакторного эксперимента использовался графический метод картирования. Применение данного подхода к обработке полученной информации позволило объединить несколько методик с использованием контрольных точек выявляемой каждой из них для построения сличительных карт работающих по принципу «отпечатков пальцев». Также были использованы такие прикладные программы как Statistika 6,0 и MicrosoftExcel.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В этой главе описываются результаты, полученные в ходе экспериментальных работ на молоке и продуктах его переработки с целью получения достоверной методологии идентификации жировой фазы.

3.1 Установление диапазонов содержания жирных кислот и триацилглицеридов молока сырья для идентификации молочного жира

3.1.1 Жирнокислотный состав жировой фазы молока сырья

Исследование жирнокислотного состава молока сырья проводилось на различных образцах сырого молока полученных в ходе выполнения научно-исследовательской деятельности Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). При проведении данной работы был собран массив данных о составе жирных кислот молока сырья характерного для территории России. Молоко для исследований было получено из различных хозяйств Московской области, а также Воронежской, Калужской, Тульской и др. областей. Набор статистики производился в течение календарного года и затронул различные аспекты, влияющие на вариативность жирнокислотного состава. Полученные данные для основных жирных кислот молочного жира представлены в таблице 7.

Обработанный массив данных позволил получить диапазоны содержания жирных кислот сырого молока. При сравнительном анализе, было выявлено, что данные диапазоны существенно отличаются от тех, которые используются в настоящее время при идентификации молочного жира.

Существенные различия выявлены как в нижних, так и в верхних пределах содержания «идентификационных» жирных кислот. Что открывает возможность для внесения жиров не молочного происхождения, обнаружение которых с применением методики исследования жирнокислотного состава становится не возможным или затрудняет интерпретацию полученных результатов.

Таблица 7-Диапазоны содержания жирных кислот сырого молока

Жирные кислоты	Молоко сырье	Нормы по ГОСТ 32261-2013
Масляная ($C_{4:0}$)	3,0-4,0	2,4-4,2
Капроновая ($C_{6:0}$)	1,5-3,0	1,5-3,0
Каприловая ($C_{8:0}$)	1,0-2,0	1,0-2,0
Каприновая ($C_{10:0}$)	2,0-3,8	2,0-3,8
Децновая ($C_{11:0}$)	0,2-04	0,2-0,4
Лауриновая ($C_{12:0}$)	**3,0-4,0**	**2,0-4,4**
Миристиновая ($C_{14:0}$)	**10,0-12,0**	**8,0-13,0**
Пальмитиновая ($C_{16:0}$)	**30,0-35,0**	**21,0-35,0**
Пальмитоолеиновая ($C_{16:1}$)	1,5-2,4	1,5-2,4
Стеариновая ($C_{18:0}$)	**9,0-13,0**	**8,0-13,5**
Элаидиновая($C_{18:1t}$)	2,0-3,5	Не нормируется
Олеиновая($C_{18:1Cis}$)	**20,0-24,0**	**20,0-32,0**
Линолевая ($C_{18:2\ Cis}$)	**2,0-3,5**	**2,2-5,5**
Арахиновая ($C_{20:0}$)	До 0,3	До 0,3
Бегеновая ($C_{22:0}$)	До 0,1	До 0,1

3.1.2 Состав триацилглицеридов жировой фазы молока сырья

Состав триацилглицеридов носит такой же вариативный характер, как и жирно-кислотный состав. Измерения триацилглицеридного состава были проведены на тех же образцах молока сырья, которые были использованы для определения диапазонов содержания жирных кислот. Втаблице 8 приведены диапазоны содержания семейств триацилглицеридов (ТАГ) состава C_{24}-C_{54}.

Таблица 8 -Диапазоны состава триацилглицеридов (ТАГ) молока сырья

Семейства триглицеридов (ТАГ)	Диапазон масс, (%)	Семейства триглицеридов (ТАГ)	Диапазон масс (%)
C_{24}	0,1-0,3	С40	9,0-13,0

Окончание таблицы 8

C_{26}	0,5-1	C42	6,5-7,5
C_{28}	0,7-1,1	C44	4,5-7,0
C_{30}	1,2-1,7	C46	5,0-6,5
C_{32}	2,5-3,3	C48	6,5-10,0
C_{34}	4,0-8,0	C50	8,0-12,0
C_{36}	9,0-14,0	C52	7,0-11,0
C_{38}	11,0-15,0	C54	2,0-4,0

Полученные диапазоны можно будет использовать для дальнейших исследований, с целью получения зависимостей для аутентификации молочного жира.

3.2 Изучение влияния технологических режимов переработки на жирнокислотный состав молока сырого с применением метода газовой хроматографии

3.2.1Влияние кислотности на жирнокислотный состав молока сырья

Проведены исследования по определению влияния кислотности на жирнокислотный состав жировой фазы молока сырого. Для проведения эксперимента были использованы следующие контрольные точки: молоко сырое контроль (кислотность18±2ºТ); молоко сырое (кислотность 22±2ºТ); молоко сырое (кислотность 30±2ºТ); молоко сырое (кислотность 40±2ºТ). Исследования проводились в десятикратной повторности (n=10).

Полученные результаты подтвердили, что экспериментальные образца соответствуют по своему составу жирных кислот полученным ранее диапазонам жирнокислотного состава молока сырья характерного для территории России.

Данные образцы были помещены в стеклянные сосуды и закупорены. После чего каждый образец подвергался термостатированию при температуре 45±1°С. В процессе термостатирования в образцах измерялась кислотность и по достижению заданной точки часть образца отделялась и подвергалась

газохроматографическому анализу по определению жирнокислотного состава. Полученные данные приведены в таблице 9.

Таблица 9-Жирнокислотный состав исследованных образцов молока сырого при изменении кислотности (ºТ)

Жирнокислотный состав жировой фазы (%):	Контроль, кислотность 18±2ºТ (n=10)	Кислотность 22±2ºТ (n=10)	Кислотность 30±2ºТ (n=10)	Кислотность 40±2ºТ (n=10)
Масляная	3,37±0,40	3,21±0,40	3,18±0,40	3,14±0,40
Капроновая	1,85±0,30	1,80±0,30	1,77±0,30	1,73±0,30
Каприловая	1,31±0,20	1,28±0,20	1,34±0,20	1,34±0,20
Каприновая	3,20±0,40	3,20±0,40	3,23±0,40	3,23±0,40
Деценовая	0,32±0,05	0,32±0,05	0,30±0,05	0,30±0,05
Лауриновая	3,43±0,30	3,40±0,30	3,35±0,30	3,30±0,30
Миристиновая	11,23±0,70	11,20±0,70	11,14±0,70	11,12±0,70
Миристолеиновая	1,03±0,10	1,03±0,10	1,07±0,10	1,07±0,10
Пальмитиновая	32,39±2,10	32,47±2,10	32,92±2,10	32,95±2,10
Пальмитолеиновая	1,56±0,20	1,56±0,20	1,46±0,20	1,44±0,20
Стеариновая	10,84±1,30	10,84±1,30	10,67±1,30	10,67±1,30
Олеиновая	21,59±1,50	21,92±1,50	21,69±1,50	22,48±1,50
Линолевая	2,38±0,30	2,15±0,30	2,06±0,30	1,97±0,30
Линоленоваякислота	0,52±0,10	0,52±0,10	0,50±0,10	0,50±0,10
Арахиновая	0,19±0,020	0,19±0,020	0,19±0,020	0,19±0,020

По приведенным в таблице 9 результатам содержания жирных кислот была выявлена следующая зависимость, что с увеличением кислотности молока сырья наиболее значительным изменениям подвергаются масляная ($C_{4:0}$) и линолевая ($C_{18:2}$) кислоты. Содержание кислот уменьшилось в среднем на 8,31% и 17,23% соответственно. При это наблюдается незначительный прирост пальмитиновой

($C_{16:0}$) и олеиновой жирных кислот ($C_{18:1}$), на 1,70% и 3,95% соответственно (рисунок 14).

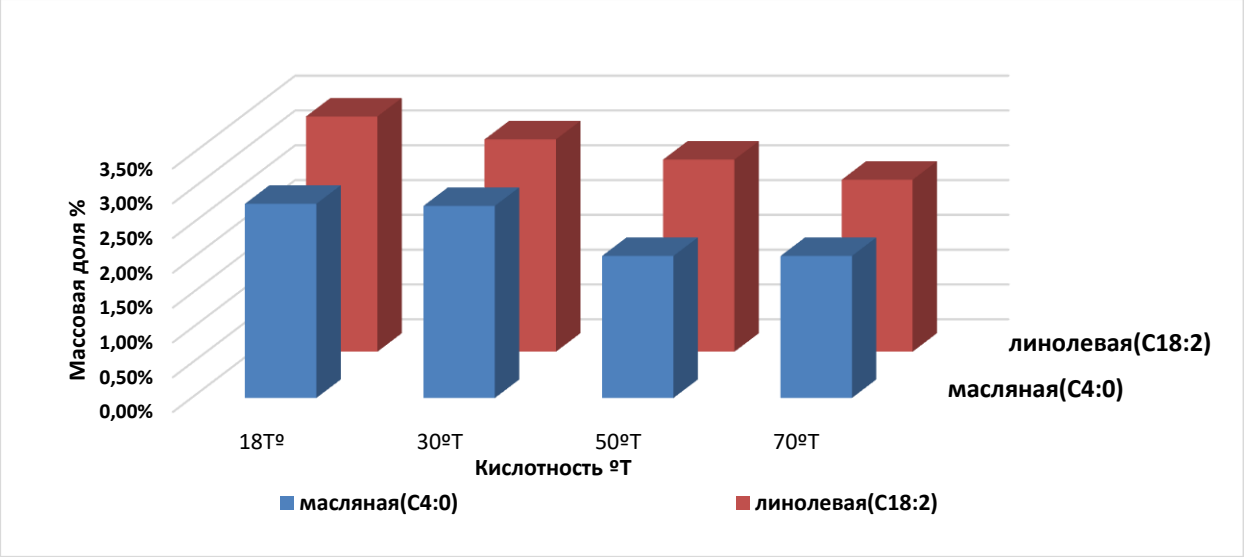


Рисунок 14- Изменение жирных кислот в процессе нарастания кислотности

Подобных характер изменений жирнокислотного состава, возможно, происходит по причине запуска механизма окисления жиров приводящего к образованию свободных жирных кислот.

3.2.2 Влияние температурных режимов обработки на состав жирных кислот молока сырья

Для исследования влияния температурных режимов обработки на жирнокислотный состав молока сырья, был проведен эксперимент с различными температурными режимами обработки и временем выдержки. Молоко сырое контроль (t=20±2 °С); молоко сырое (t=45±2 °С, время выдержки 1 мин); молоко сырое (t=70±2 °С, время выдержки 30 сек); молоко сырое (t=90±2 °С, время выдержки 30 сек). Испытания были проведены в повторности на десяти образцах молока сырья. Образцы были разделены на три части помещены в закрытые стеклянные сосуды и подвергнуты температурной обработке. Контрольные образцы и образцы после проведения термической обработки были исследованы по составу жирных кислот. В результате проведенных исследований были получены данные о влиянии температурной обработки на жирнокислотный состав сырого молока (таблица 10).

Таблица 10-Влияние температурных режимов обработки на жирно-кислотный состав молока

Жирнокислотный состав жировой фазы,%	Молоко сырое (контроль) t=20 ºС. (n=10)	Молоко сырое t=45 ºС. (1мин) (n=10)	Молоко сырое t=70 ºС. (30 сек) (n=10)	Молоко сырое t=90 ºС. (30 сек) (n=10)
Масляная кислота ($C_{4:0}$)	3,54±0,50	3,53±0,50	3,49±0,50	3,29±0,50
Капроновая кислота ($C_{6:0}$)	2,29±0,30	2,09±0,30	2,05±0,30	1,95±0,30
Каприловая кислота ($C_{8:0}$)	1,52±0,20	1,41±0,20	1,34±0,20	1,31±0,20
Каприновая кислота ($C_{10:0}$)	3,59±0,40	3,46±0,40	3,20±0,40	3,20±0,40
Лауриловая кислота ($C_{12:0}$)	3,74±0,30	3,66±0,30	3,58±0,30	3,53±0,30
Миристиновая кислота ($C_{14:0}$)	10,99±0,60	10,93±0,60	10,90±0,60	10,87±0,60
Пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$)	31,73±1,90	31,75±1,90	31,76±1,90	31,78±1,90
Пальмитолеиновая кислота ($C_{16:1}$)	1,58±0,10	1,57±0,10	1,56±0,10	1,57±0,10
Стеариновая кислота ($C_{18:0}$)	10,33±1,30	10,34±1,30	10,34±1,30	10,29±1,30
Олеиновая кислота ($C_{18:1}$)	22,34±1,50	22,39±1,50	22,30±1,50	22,36±1,50
Линолевая кислота ($C_{18:2}$)	3,07±0,30	2,98±0,30	2,64±0,30	2,32±0,30

В ходе проведения эксперимента было отмечено, что жирно-кислотный состав жировой фазы молока подвергается наибольшим изменениям при температурном воздействии 90˚С. Наиболее значительным изменениям при температурной обработке подвержены насыщенные жирные кислоты, к которым относятся короткоцепочечные кислоты состава (C_4-C_{10}). При температуре t=90 ºС с выдержкой 30 с., изменение содержания масляной, каприновой, каприловой и капроновой жирных кислот составило от 7 до 14%. Также отмечено значительное снижение массовой доля линолевой кислоты ($C_{18:2}$), ее содержание

упало на 24% от значений контрольного образца (рисунок 15)

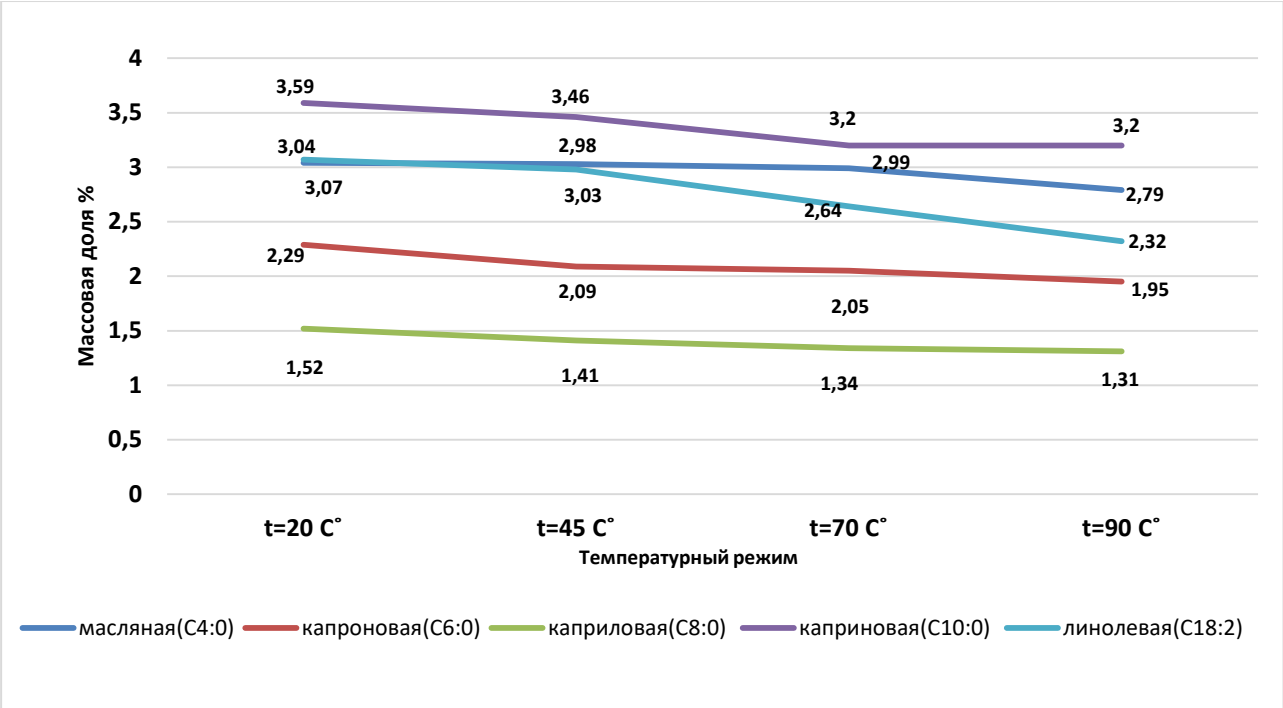


Рисунок 15- Изменение содержания некоторых жирных кислот в молоке сырье под влиянием температурной обработки

Высокотемпературная обработка запускает механизм авто окисления жировой фазы, приводящий к изменениям состава жирных кислот сырого молока, что в свою очередь может повлиять на интерпретацию результатов по идентификации жировой фазы продуктов переработки молока.

3.2.3 Изменение жирнокислотного состава в процессе сквашивания

Для оценки изменения состава жирных кислот под влиянием заквасочных культур, была проведена серия экспериментальных выработок молочных продуктов, с использованием некоторых бактериальных культур. Для этого контрольный образец молока сырья с известным составом жирных кислот был разделен на четыре части с целью выработки кисломолочных продуктов: простокваша, кефир, ацидофилин, йогурт. Для подтверждения экспериментальных данных исследования проводились в пяти повторностях (n=5). В таблице 11 приведены данные по изменению состава жирных кислот

молока сырья при использовании молочных заквасок.

Таблица 11 - Изменение жирнокислотного состава молока при внесении заквасочных культур

Жирнокислотный состав жировой фазы, %	Молоко сырое (n=5)	Простокваша (n=5)	Кефир (n=5)	Ацидофилин (n=5)	Йогурт (n=5)
Масляная кислота	3,46±0,50	3,32±0,50	3,31±0,50	3,30±0,50	3,28±0,50
Капроновая кислота	1,85±0,30	1,87±0,30	1,86±0,30	1,86±0,30	1,68±0,30
Каприловая кислота	1,21±0,20	1,22±0,20	1,23±0,20	1,22±0,20	1,10±0,20
Каприновая кислота	2,86±0,40	2,88±0,40	2,93±0,40	2,88±0,40	2,63±0,40
Лауриновая кислота	3,32±0,30	3,33±0,30	3,38±0,30	3,34±0,30	3,13±0,30
Миристиновая кислота	10,81±0,70	10,79±0,70	10,93±0,70	10,67±0,70	10,53±0,70
Пальмитиновая кислота	32,37±2,10	32,25±2,10	32,45±2,10	32,36±2,10	32,64±2,10
Стеариновая кислота	11,20±1,30	11,10±1,30	11,04±1,30	11,06±1,30	11,58±1,30
Олеиновая кислота	22,58±1,50	22,73±1,50	22,58±1,50	22,85±1,50	22,08±1,50
Линолевая кислота	2,96±0,30	1,96±0,30	1,98±0,30	2,18±0,30	2,07±0,30

Характер изменения состава жирных кислот имеет ту же направленность что и в двух предыдущих экспериментах. Наблюдается снижение короткоцепочечных кислот на 5-7% и значительное снижение линолевой кислоты на 26-33%. Характер изменения состава жирных кислот был равнозначен для всех кисломолочных продуктов.

При изучении влияния технологических режимов на состав жирных кислот сырого молока были получены результаты, согласно которым влияние на жирно-кислотный состав молока сырья оказывают как кислотность так температурная обработка. Существенным изменениям содержания подвержены летучие кислоты с короткой углеродной цепью состава $C_{4:0}$-$C_{10:0}$. При применении технологической обработки молока сырья содержание этих кислот снижается на 5-14% в зависимости от вида обработки. Более всего из короткоцепочечных кислот снижается содержание масляной кислоты ($C_{4:0}$). Среднецепочечные кислоты

показали устойчивость к повышенной кислотности и температурной обработке. Линолевая кислота подвергается наиболее значительным изменениям. Ее содержание снижается на 24-33%. Это связано с высокой степенью авто окисления этой жирной кислоты.

Оценка изменения жирнокислотного состава под влиянием заквасочных культур выявила те же закономерности, что и влияние кислотности. Поэтому сделать однозначный вывод о том, что в большей степени влияет на жирнокислотный состав сырого молока, повышенная кислотность или окисление жирных кислот под влиянием бактериальных липаз не представляется возможным.

Применение технологических режимов переработки молока сырья, не оказывает существенного влияния на весь жирнокислотный состав молочной продукции. Но следует учитывать тот факт, что снижаются кислоты входящие в состав «идентификационной» группы жирных кислот. Эту информацию следует учитывать при идентификации молочного жира в составе продуктов переработки молока.

3.3 Выявление тенденции изменения жирнокислотного состава при замене молочного жира жирами растительного и животного происхождения

В настоящее время распространенной практикой является фальсификация молочного жира жирами как растительного, так и животного происхождения.
За последние годы лабораторией технохимического контроля (ВНИМИ) были выявлены многочисленные нарушения в этой области. В большей массе фальсификация проводится путем внесения жиров растительного происхождения (пальмовое и кокосовое масла), однако последние годы нарастает тенденция к внесению жиров животного происхождения которые по ряду причин гораздо труднее обнаружить контролирующим органам. К одной из таких причин можно отнести низкую информированность и отсутствие параметров изменения жирно-кислотного состава в процессе фальсификации такими жирами.

Определение характера изменений жирнокислотного состава молочного

жира при внесении жиров немолочного происхождения, было проведено в процессе эксперимента на модельных жировых системах. Модельные жировые системы были построены следующим образом: используя полученные ранее данные, о составе и вариативности состава жирных кислот и состава триацилглицеридов сырого молока, были отобраны десять образцов молочного жира, соответствующие необходимым показателям. К которым по массе были добавлены образцы жиров немолочного происхождения в следующих соотношениях: молочный жир (МЖ) / жиры немолочного происхождения (ЖНМП) 90/10%, 70/30%, 50/50%, 30/70%, 10/90%(w/w).

3.3.1 Изменения жирнокислотного состава молочного жира под влиянием внесения пальмового масла

Определение характера изменений жирнокислотного состава молочного жира при внесении пальмового масла, было проведено в процессе эксперимента на модельных жировых системах. В результате были получены экспериментальные данные, представленные в таблице 3.6.

Поскольку пальмовое масло относится к олео-пальмитиновой группе, содержание пальмитиновой и олеиновой кислот в нем самое высокое и может достигать 49 и 48% соответственно. Также пальмовое масло имеет высокое содержание линолевой кислоты до 20%. Этот факт вызывает изменения в составе жирных кислот, которые возникают при введении пальмового жира в жировую фракцию молочных продуктов.

Таблица 12 - Изменения жирнокислотного состава молочного жира при внесении пальмового масла

Наименование жирных кислот, %	Соотношение молочного жира и пальмового масла, (n=10).						
	Молочный жир	90/10%	70/30%	50/50%	30/70%	10/90%	Пальмовое масло
Масляная	3,6±0,3	3,3±0,3	2,6±0,3	1,8±0,2	1,0±0,2	0,3±0,1	-
Лауриновая	3,3±0,5	3,2±0,5	2,1±0,5	1,6±0,4	1,0±0,4	0,5±0,3	0,2±0,2

Окончание таблицы 12

Миристиновая	10,7±1,1	10,6±1,1	7,8±0,8	5,8±0,6	3,7±0,3	1,9±0,3	1,1±0,2
Пальмитиновая	32,7±1,8	33,1±1,8	34,7±1,8	39,7±1,8	43,1±1,9	46,5±1,9	48,4±1,9
Стеариновая	9,9±1,5	8,6±1,5	8,1±1,5	6,8±1,4	5,5±1,4	4,3±1,3	3,8±1,3
Элаидиновая	2,7±0,3	2,3±0,3	1,9±0,3	1,3±0,3	0,7±0,2	0,3±0,1	0,1±0,1
Олеиновая	22,3±1,5	24,2±1,5	28,4±1,5	34,0±1,6	41,1±1,6	46,5±1,8	47,0±1,8
Линолевая	2,6±0,4	3,2±0,4	4,5±0,4	5,6±0,5	6,7±0,6	7,7±0,6	8,2±0,6

Согласно исследованиям, это кислоты, которые начинают преобладать над массой других кислот, в то время как содержание короткоцепочечных кислот, включая масляную кислоту, которая является специфической жирной кислотой в молочном жире, уменьшается (рисунок 16).

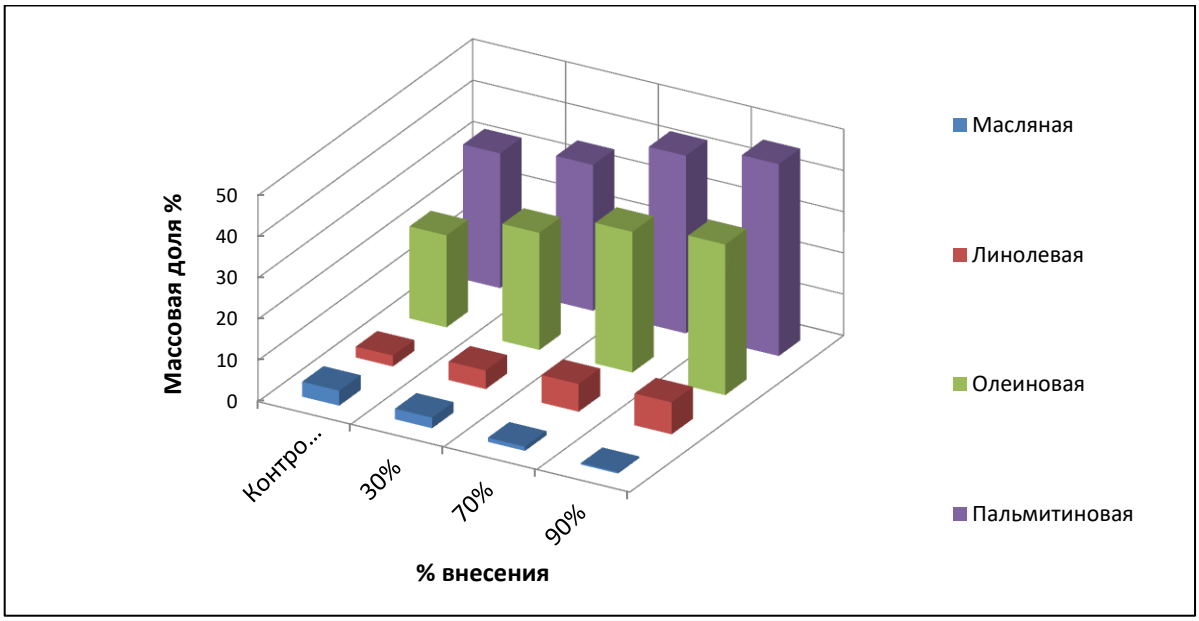


Рисунок 16 - Изменения состава жирных кислот под влиянием замены пальмовым маслом

Полученные результаты исследования позволяют осуществлять идентификацию пальмового масла в молочном жире по нарастанию пальмитиновой, олеиновой и линолевой жирных кислот преобладающих в его жирно-кислотном составе наряду со снижением масляной кислоты. Так же стоит отметить, что содержания элаидиновой (транс-олеиновой) кислоты в чистом пальмовом масле близко к нулю, в то время как содержание той же кислоты в молочном жире варьируется в пределах 2-3%. Данную особенность так же

необходимо учитывать при выявлении подмены молочного жира пальмовым маслом.

Полученные данные приведенной модельной системы, дополненные вариативностью состава жирных кислот молочного жира, указывают на то, что оценка подмены при незначительных внесениях до 10-20,% существенного изменения жирнокислотного состава не наблюдается и возможно получение ложных результатов по идентификации жировой фазы молока и молочной продукции.

3.3.2 Изменения жирнокислотного состава молочного жира под влиянием внесения кокосового масла

Кокосовое масло, как правило, редко используется при подмене жиров молока. В пищевых целях обычно используют только рафинированное и дезодорированное кокосовое масло. Быстрый переход от твердого состояния к жидкому в рамках узких интервалов температур является характерной особенностью данного жира. В связи с этим его часто применяют в производстве комбинированных жировых продуктах и, как правило, это мороженое. При обработке статистических данных в ходе написания диссертационной работы, фальсификация кокосовым маслом была выявлена только в данном продукте. Однако для понимания и возможностей выявления данной замены молочного жира также было проведено экспериментальное исследование по схеме, приведенной в предыдущем разделе, данные, которого представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Изменения жирнокислотного состава молочного жира при фальсификации кокосовым маслом

Наименование жирных кислот, %	Соотношение молочного жира и кокосового масла, (n=10)						
	Молочный жир	90/10%	70/30%	50/50%	30/70%	10/90%	Кокосовое масло
Масляная	3,6±0,3	3,4±0,3	2,6±0,3	1,8±0,2	1,0±0,2	0,3±0,1	-
Лауриновая	3,3±0,5	7,8±0,5	17,2±0,6	26,7±0,8	36,1±1,0	45,9±1,3	48,1±1,3
Миристиновая	10,7±1,1	11,7±1,1	13,4±1,1	15,2±1,1	16,8±1,2	18,4±1,2	19,0±1,2
Пальмитиновая	32,7±1,8	28,2±1,8	23,9±1,7	19,9±1,5	15,7±1,5	11,2±1,3	10,0±1,3

Окончание таблицы 13

Стеариновая	9,9±1,5	9,1±1,5	7,5±1,3	5,9±1,3	4,5±1,1	2,6±1,1	2,5±1,1
Элаидиновая	2,8±0,3	2,4±0,3	1,9±0,3	1,3±0,3	0,7±0,2	0,2±0,2	0,1±0,1
Олеиновая	22,3±1,5	22,5±1,5	18,7±1,5	14,6±1,4	10,8±1,2	6,7±1,1	6,5±1,1
Линолевая	2,6±0,4	2,8±0,4	2,4±0,4	2,1±0,4	1,7±0,3	1,3±0,3	1,2±0,2

Основная доля жирных кислот по массе приходится на миристиновую (до 21%) и лауриновую (до 51%). Такое высокое содержание лауриновой кислоты в кокосовом масле относительно содержания той же кислоты в молочном жире (3-4%) создает идеальные условия для выявления фальсификации данным жиром рисунок 17).

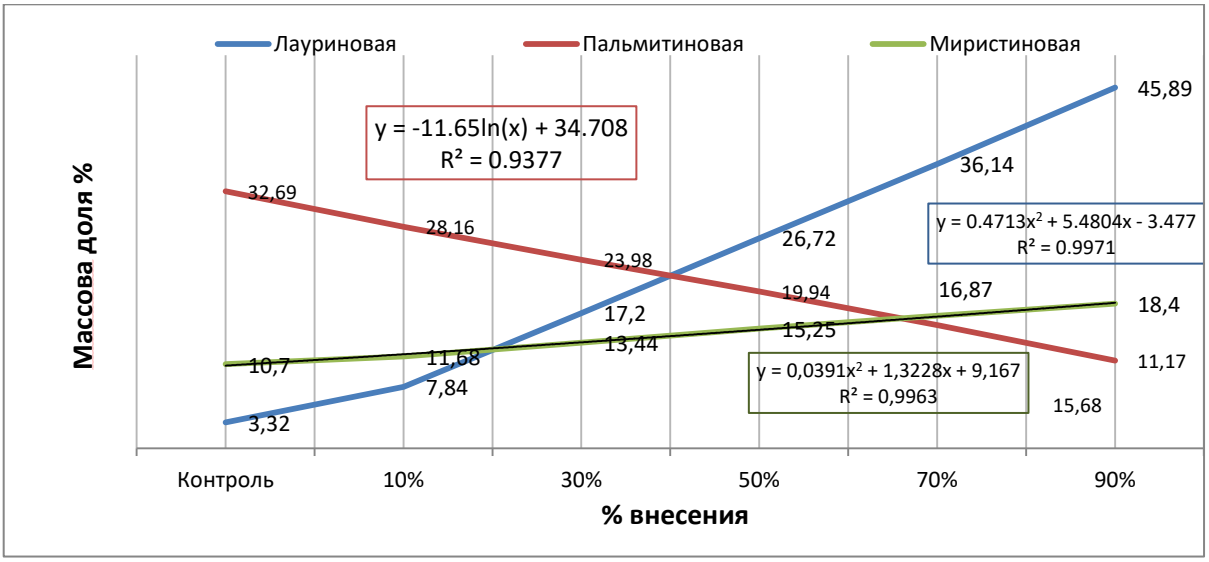


Рисунок – 17 Изменения состава жирных кислот молочного жира при внесении кокосового масла

Таким образом, даже незначительное добавление кокосового масла к молочному жиру на уровне 10% увеличивает содержание лауриновой кислоты почти в 3 раза, что является бесспорным критерием для обнаружения кокосового масла в молочном жире. Как и в предыдущем случае, следует отметить снижение уровня элаидиновой кислоты.

3.3.3 Изменения жирнокислотного состава молочного жира под влиянием внесения жиров животного происхождения на примере говяжьего жира

В этом разделе будет рассмотрена возможность выявления говяжьего жира

методом газовой хроматографии жирных кислот. Для этих целей было проведено контрольное исследование изменения жирно кислотного состава молочного жира при подмене его жиром говяжьим в различных процентных соотношениях. Дабы провести параллель с предыдущими данными и возможность выявления возможных точек соприкосновения, эксперимент был проведен с теми же входными данными. Экспериментальная часть выражена в таблице 14.

Таблица 14 - Изменения жирнокислотного состава молочного жира при внесении говяжьего жира

Наименование жирных кислот, %	Соотношение молочного жира и говяжьего жира, (n=10)						
	Молочный жир	90/10%	70/30%	50/50%	30/70%	10/90%	Говяжий жир
Масляная	3,6±0,3	3,4±0,3	2,7±0,3	1,9±0,2	1,2±,02	0,4±0,1	-
Лауриновая	3,3±0,5	2,9±0,5	2,2±0,5	1,6±0,4	1,1±0,4	0,4±0,3	0,1±0,2
Миристиновая	10,7±1,1	10,3±1,1	8,7±1,1	7,2±1,0	5,8±1,8	4,0±0,5	3,3±0,5
Пальмитиновая	32,6±1,8	30,9±1,8	29,0±1,8	28,5±1,8	27,6±1,7	26,8±1,7	26,0±1,7
Стеариновая	9,9±1,5	11,1±1,5	13,4±1,5	15,8±1,6	17,9±1,6	19,8±1,6	21,0±,1,7
Элаидиновая	2,7±0,3	2,7±0,3	2,4±0,3	2,2±0,3	2,1±0,3	1,8±0,2	1,7±0,2
Олеиновая	22,3±1,5	23,7±1,5	25,0±1,5	28,2±1,5	30,1±1,6	34,6±1,6	35,5±1,6
Линолевая	2,6±0,4	2,9±0,4	2,6±0,4	2,3±0,4	2,1±0,4	1,7±0,3	1,7±0,3

Полученные данные показывают существенное отличие изменения состава жирных кислот молочного жира при замене жирами животного происхождения в отличие от жиров происхождения растительного.

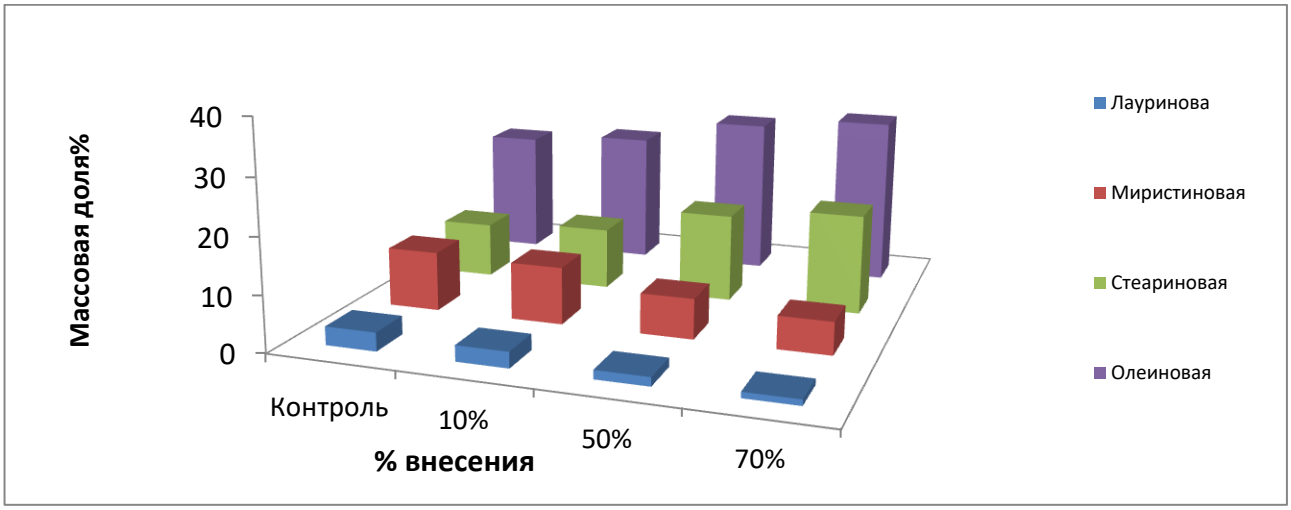


Рисунок – 18 Изменения состава жирных кислот под влиянием замены говяжьим жиром

Это связано с преобладающими группами жирных кислот в составе животного жира, отличительными особенностями которого являются высокое содержание олеиновой и стеариновой кислот, при низком содержании короткоцепочечных кислот и полного отсутствия характерной для молочного жира масляной кислоты (рисунок 18).Стоит заметить тот факт, что содержание транс- изомера олеиновой кислоты в говяжьем жире находится на том же уровне, что и в молочном жире и эту характерную особенность можно использовать при идентификации происхождения внесенного жира.

3.3.1 Идентификация жировой фазы молока и молочных продуктов по составу жирных кислот

Фальсификацию молочных жиров в настоящее время условно можно поделить на «тонкую» до 20% и «грубую» более 20% замены молочного жира жирами растительного и животного происхождения. Полученные экспериментальные данные по изменению состава жирных кислот при внесении других компонентов, то можно сделать вывод о том, что фальсификация на уровне 30% и выше этим методом гарантированно выявляется, а полученная информация дает возможность также получить информацию о природе жира применяемого для подмены. Однако широкая вариативность состава жирных кислот молока совершенно не дает такой возможности при незначительной замене (менее 20%). При оценке полученных данных видно, что такая фальсификация трудно выявляема и находится в правовой зоне не позволяющей сделать достоверный вывод о подмене жиров молока и молочной продукции жирами иного происхождения.

Таблица 15 - Обобщающие данные по методике определения жирнокислотного состава для выявления фальсификации жирами немолочного происхождения ГЖ-говяжий жир; ПМ-пальмовое масло

Наименование жирных кислот, %	Молочный жир n=10	ГЖ-10% n=10	ПМ-10% n=10	ГЖ-30% n=10	ПМ-30% n=10	Нормы по ГОСТ 32261-2013
Масляная	3,62±0,3	3,44±0,3	3,31±0,3	2,67±0,3	2,57±0,3	2,4-4,2
Лауриновая	3,32±0,5	2,86±0,5	3,25±0,5	2,25±0,5	2,21±0,5	2,0-4,4

Окончание таблицы 15

Миристиновая	10,70±1,1	10,33±1,1	10,68±1,1	8,77±1,1	7,85±1,1	8,0-13,0
Пальмитиновая	32,69±1,8	30,98±1,8	33,08±1,8	29,02±1,8	34,73±1,8	21-35
Стеариновая	9,95±1,5	11,08±1,5	8,56±1,5	13,43±1,5	8,12±1,5	8-13,5
Элаидиновая	2,77±0,3	2,73±0,3	2,28±0,3	2,49±0,3	1,91±0,3	Не нормируется
Олеиновая	22,30±1,5	23,78±1,5	24,23±1,5	25,03±1,5	28,39±1,5	20-32
Линолевая	2,65±0,4	2,91±0,4	3,25±0,4	2,65±0,4	4,50±0,4	2,2-5,5

Согласно данным изложенным в таблице 15 можно сделать вывод о недостаточности применения только одного критерия оценки жировой фазы молока и молочной продукции. А так же необходимости пересмотра диапазонов жирно-кислотного состава применяемых для идентификации молочного жира.

Для проведения комплекса мер по идентификации жировой фазы необходимо измерение дополнительных параметров, таких как триацилглицеридный состав и состав стеролов.

3.4 Применение триацилглицеридного состава для аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции

Как показали экспериментальные данные, при содержании жиров немолочного происхождения менее 30% идентификация жировой фазы молока и молочной продукции по составу жирных кислот является проблематичной и существует возможность как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

В своих работах D. Precht провел исследование состава триацилглицеридов молочного жира характерного для Европы и на их основе предложил возможность аутентификации молочного жира. На основе полученных D.Precht данных была проведена работа по определению влияния жиров немолочного происхождения на состав триацилглицеридов молочного жира.

В своих работах D. Precht использовал насадочные колонки, позволявшие ему разделять триацилглицериды только по количеству атомов углерода в группе. В настоящее время на рынке появилось много высокоэффективных капиллярных колонок позволяющих оценивать триацилглицериды не только по семействам, но и изучить их внутреннее строение.

В данном разделе приведены данные по изучению состава триацилглицеридов молочного жира методом капиллярной газовой хроматографии. Проведена экспериментальная работа по изменению триацилглицеридного состава молока при внесении жиров растительного и животного происхождения.

3.4.1 Изменение триацилглицеридного состава молочного жира при замене жирами растительного происхождения

Для подтверждения работоспособности методики идентификации подмены жиров молока и молочной продукции жирами иного происхождения были использованы модельные жировые системы, подготовленные для измерения жирнокислотного состава. Первая экспериментальная линия была проведена с

пальмовым жиром, по итогу который были получены результаты, отражающие изменения триацилглицеридного состава при подобном воздействии (таблица16).

Таблица 16 - Изменение состава триацилглицеридов молочного жира при внесении пальмового жира в различных концентрациях

ТАГ,%	Соотношение молочного жира и пальмового масла, (n=10)						
	Молочный жир	90/10%	70/30%	50/50%	30/70%	10/90%	Пальмовое масло
C_{24}	0,17±0,1	0,19±0,1	0,18±0,1	0,13±0,1	0,06±0,1	0,03±0,1	0,01±0,1
C_{26}	0,85±0,2	0,69±0,2	0,60±0,2	0,44±0,2	0,27±0,2	0,12±0,2	0,14±0,2
C_{28}	1,03±0,1	0,83±0,1	0,69±0,1	0,59±0,1	0,39±0,1	0,24±0,1	0,27±0,1
C_{30}	1,45±0,3	1,31±0,3	1,08±0,3	0,76±0,3	0,53±0,3	0,23±0,3	0,20±0,3
C_{32}	2,93±0,5	2,55±0,5	1,98±0,5	1,49±0,5	0,81±0,5	0,33±0,5	0,22±0,5
C_{34}	6,65±1,6	5,69±1,6	4,51±1,6	3,38±1,6	2,48±1,6	1,48±1,6	1,48±1,6
C_{36}	12,42±1,2	10,63±1,2	8,39±1,2	6,75±1,2	4,73±1,2	2,90±1,2	2,73±1,2
C_{38}	13,84±1,1	12,85±1,1	9,94±1,1	7,24±1,1	4,56±1,1	1,65±1,1	1,10±1,1
C_{40}	11,79±0,9	10,14±0,9	8,04±0,9	5,55±0,9	3,45±0,9	1,27±0,9	0,59±0,9
C_{42}	6,76±0,5	5,75±0,5	4,58±0,5	3,14±0,5	1,99±0,5	0,72±0,5	0,23±0,5
C_{44}	4,90±0,5	4,88±0,5	4,01±0,5	3,00±0,5	2,11±0,5	1,34±0,5	0,27±0,5
C_{46}	5,39±0,3	5,35±0,3	4,99±0,3	4,19±0,3	3,50±0,3	3,02±0,3	1,28±0,3
C_{48}	6,76±0,6	8,39±0,6	9,32±0,6	9,94±0,6	10,72±0,6	11,68±0,6	11,88±0,6
C_{50}	8,75±0,7	13,72±0,7	19,43±0,7	24,71±0,7	30,15±0,7	35,39±0,7	38,04±0,7
C_{52}	7,70±0,7	12,37±0,7	17,29±0,7	22,07±0,7	26,91±0,7	31,06±0,7	33,44±0,7
C_{54}	3,73±0,6	5,11±0,6	6,28±0,6	7,53±0,6	8,52±0,6	9,98±0,6	11,00±0,6

Полученные экспериментальные данные показывают, что преобладающими группами триглицеридов в пальмовом масле являются семейства C_{48}-C_{54}(94 % от общей массы), тогда как ТАГ состава C_{24}-C_{46} практически отсутствуют (6%). При этом молочный жир в своем составе имеет характерно иное распределение триглицеридов. Триацилглицериды короткой цепи C_{24}-C_{34} составляют порядка 13-15%, средней C_{36}-C_{44} около 50-54% и длинноцепочечные C_{46}-C_{54} 33-35% в соотношении 1:5:4. В связи с этим маркерными ТАГ для выявления пальмового масла, следует принять семейства триацилглицеридов с числом атомов углерода в цепи C_{50}-C_{54}.

Если рассмотреть статистические данные о вариативности состава ТАГ в молочном жире то из полученных экспериментальных данных следует, что даже небольшая замена пальмовым жиром в размере 10% вносит существенные коррективы в состав триацилглицеридов молока семейств С50-С54. Рисунок 3.7 Изменения триацилглицеридного состава молочного жира превышающие установленные диапазоны по составу ТАГ от C_{24} до C_{48} становятся информативны только при добавках превышающих 30% по массе включительно.

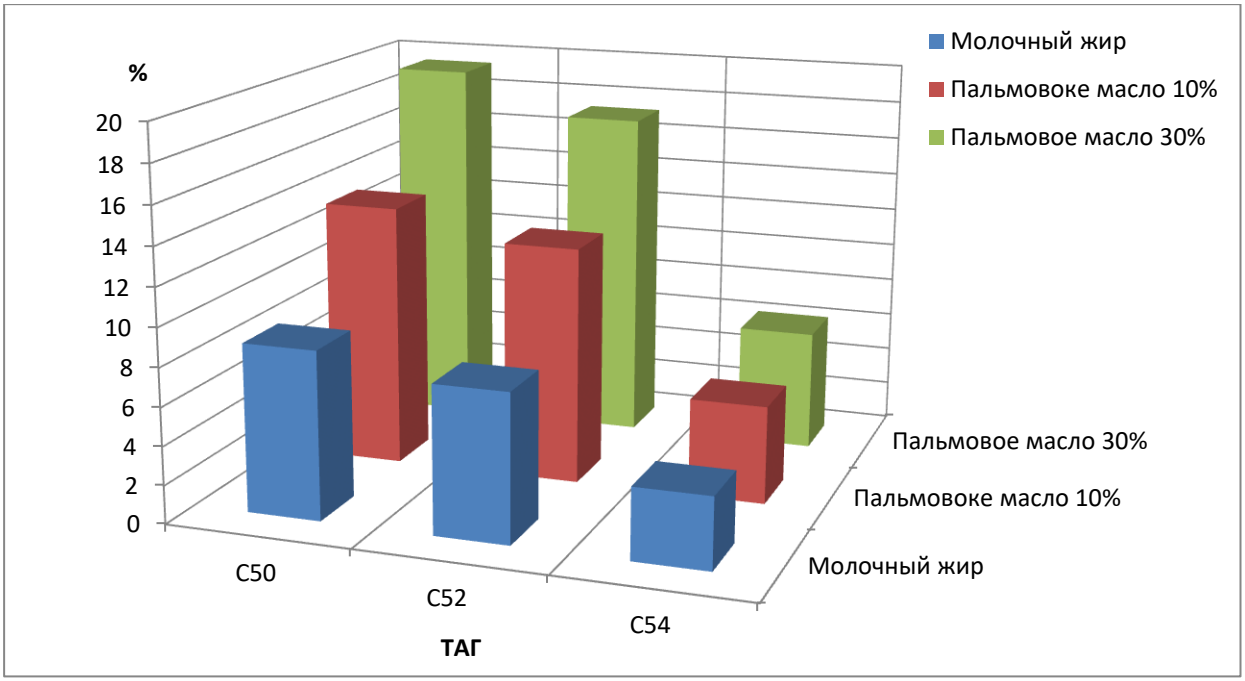


Рисунок 19 - Динамика изменения состава ТАГ состава С50-С54 при внесении пальмового жира.

Полученные ранее результаты подтверждают, что жирнокислотный состав дает исчерпывающую информацию по идентификации кокосового масла в молочном жире. Для получения дополнительной информации о строении ТАГ кокосового масла, а также об изменении состава триацилглицеридов при внесении кокосового жира в молочный жир, была проведена экспериментальная линейка измерений на модельных жировых системах. Результаты измерений выражены в таблице 17.

Таблица 17-Изменение состава триацилглицеридов молочного жира при внесении кокосового жира

ТАГ,%	Соотношение молочного жира и кокосового масла, (n=10)						
	Молочный жир	90/10%	70/30%	50/50%	30/70%	10/90%	Кокосовое масло
C_{24}	0,17±0,1	0,17±0,1	0,18±0,1	0,18±0,1	0,24±0,1	0,28±0,1	0,29±0,1
C_{26}	0,85±0,2	0,77±0,2	0,69±0,2	0,66±0,2	0,64±0,2	0,61±0,2	0,60±0,2
C_{28}	1,03±0,1	1,07±0,1	1,10±0,1	1,12±0,1	1,18±0,1	1,24±0,1	1,26±0,1
C_{30}	1,65±0,3	1,77±0,3	1,97±0,3	2,22±0,3	2,67±0,3	3,15±0,3	3,35±0,3
C_{32}	3,03±0,5	3,47±0,5	5,42±0,5	7,19±0,5	9,56±0,5	11,49±0,5	12,76±0,5
C_{34}	6,65±1,6	7,62±1,6	9,24±1,6	10,74±1,6	13,26±1,6	15,19±1,6	16,07±1,6
C_{36}	12,42±1,2	13,90±1,2	14.48±1,2	15,24±1,2	17,09±1,2	18,61±1,2	19,35±1,2
C_{38}	14,84±1,1	15,10±1,1	15,51±1,1	15,80±1,1	16,60±1,1	17,15±1,1	17,43±1,1
C_{40}	12,79±0,9	11,77±0,9	11,61±0,9	11,40±0,9	11,29±0,9	11,16±0,9	11,12±0,9
C_{42}	7,36±0,5	7,44±0,5	7,51±0,5	7,62±0,5	7,88±0,5	7,94±0,5	8,11±0,5
C_{44}	4,90±0,5	4,47±0,5	4,31±0,5	4,20±0,5	4,17±0,5	4,02±0,5	3,91±0,5
C_{46}	5,39±0,3	5,5±0,3	4,77±0,3	4,35±0,3	3,59±0,3	2,75±0,3	2,55±0,3
C_{48}	6,76±0,6	6,24±0,6	5,49±0,6	5,12±0,6	3,61±0,6	2,33±0,6	2,03±0,6
C_{50}	8,75±0,7	7,38±0,7	6,69±0,7	6,06±0,7	3,57±0,7	1,76±0,7	1,31±0,7
C_{52}	7,70±0,7	6,81±0,7	5,94±0,7	5,39±0,7	3,08±0,7	1,36±0,7	1,08±0,7
C_{54}	3,73±0,6	3,29±0,6	2,75±0,6	2,46±0,6	1,62±0,6	0,72±0,6	0,55±0,6

Полученные экспериментальные данные показали преобладание в кокосовом масле групп триацилглицеридов состава C_{32}-C_{40}, которые оказывают существенное влияние на состав ТАГ молочного жира.

При замене молочного жира менее 30%, состав триацилглицеридов менее информативен, чем жирно-кислотный состав. Поэтому хотя состав триацилглицеридов и претерпевает определенные изменения, применение метода определения состава жирных кислот для выявления жиров лауриновой группы более предпочтителен.

3.4.2 Изменение триацилглицеридного состава молочного жира при замене жирами животного происхождения на примере говяжьего жира

Из экспериментальных данных по составу жирных кислот, идентификация говяжьего жира в составе молочного жира трудно выявляема и не дает информативности даже при внесении на уровне 30%. Это связано с высокой вариативностью жирно-кислотного состава молока и во многом схожей структуре с жирно-кислотным составом животных жиров. Поэтому получение дополнительного инструмента для выявления фальсификации является преемственной задачей в связи с увеличивающимися объемами использования данной группы жиров. Измерения состава ТАГ проводилось по той же схеме что и для растительных жиров, при использовании модельных жировых систем. В ходе эксперимента были выявлены зависимости отраженные в таблице 18.

Таблица 18-Состав триацилглицеридов молока при внесении говяжьего жира

ТАГ,%	Соотношение молочного жира и говяжьего жира, (n=10).						
	Молочный жир	90/10%	70/30%	50/50%	30/70%	10/90%	Говяжий жир
C_{24}	0,17±0,1	0,22±0,1	0,16±0,1	0,08±0,1	0,03±0,1	0,02±0,1	0,00±0,1
C_{26}	0,85±0,2	0,78±0,2	0,62±0,2	0,46±0,2	0,37±0,2	0,23±0,2	0,20±0,2
C_{28}	1,03±0,1	0,81±0,1	0,56±0,1	0,50±0,1	0,33±0,1	0,17±0,1	0,14±0,1
C_{30}	1,65±0,3	1,40±0,3	1,14±0,3	0,81±0,3	0,57±0,3	0,25±0,3	0,20±0,3
C_{32}	3,03±0,5	2,56±0,5	2,03±0,5	1,42±0,5	0,93±0,5	0,31±0,5	0,14±0,5
C_{34}	6,65±1,6	5,72±1,6	4,49±1,6	3,23±1,6	2,18±1,6	0,80±1,6	0,51±1,6
C_{36}	12,42±1,2	10,87±1,2	8,47±1,2	6,14±1,2	4,16±1,2	1,61±1,2	0,95±1,2
C_{38}	14,84±1,1	13,42±1,1	10,21±1,1	7,43±1,1	4,94±1,1	1,82±1,1	0,78±1,1
C_{40}	12,79±0,9	10,81±0,9	8,01±0,9	5,83±0,9	3,69±0,9	1,18±0,9	0,13±0,9
C_{42}	7,36±0,5	6,22±0,5	4,54±0,5	3,41±0,5	2,22±0,5	0,92±0,5	0,23±0,5
C_{44}	4,90±0,5	4,84±0,5	3,99±0,5	3,22±0,5	2,46±0,5	1,52±0,5	0,93±0,5
C_{46}	5,39±0,3	5,24±0,3	5,10±0,3	5,01±0,3	4,83±0,3	4,62±0,3	4,44±0,3
C_{48}	6,76±0,6	8,29±0,6	9,39±0,6	10,23±0,6	11,16±0,6	12,58±0,6	13,19±0,6
C_{50}	8,75±0,7	12,13±0,7	15,30±0,7	18,12±0,7	20,64±0,7	23,86±0,7	25,96±0,7
C_{52}	7,70±0,7	12,01±0,7	18,87±0,7	24,28±0,7	29,60±0,7	36,06±0,7	37,93±0,7
C_{54}	3,73±0,6	6,56±0,6	8,56±0,6	11,93±0,6	14,50±0,6	16,37±0,6	17,09±0,6

Изучение состава триацилглицеридов говяжьего жира показывает, что он во многом схож с составом ТАГ пальмового масла. Преобладающими группами триацилглицеридов являются семейства C_{48}-C_{54}, в то время как ТАГ состава C_{24}-C_{46} в основном не выражены. При суммировании масс этих семейств получаются точно такие же значения, как и в пальмовом масле, 94 и 6% соответственно. Однако при рассмотрении основной группы триглицеридов C_{50}-C_{54}было отмечено существенное различие в их составе. Так пальмовый жир содержит на 30% большее количество группы C_{50}, на 35% меньше ТАГ состава C_{54}. Общий профиль различия в составе триацилглицеридов выражен на рисунке 20.

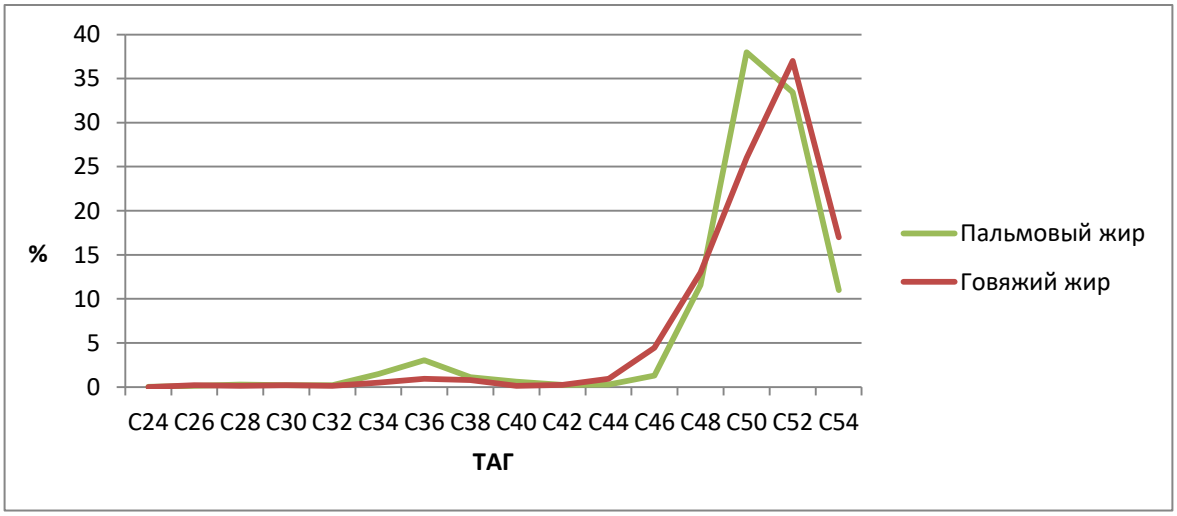


Рисунок 20 - Профиль триацилглицеридов пальмового и говяжьего жиров

Существенное различие в соотношении данных семейств ТАГ следует применять для идентификации происхождения жиров внесенных в жировую фазу молока и молочной продукции.

3.5 Идентификация липидной фракции молока и молочной продукции по составу стеролов

В данном разделе изучено применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения состава стеролов в жирах различного происхождения.

Определение стеролов в молоке и молочной продукции используют для измерения количества холестерина и выявления фальсификации жирами растительного происхождения, содержащих фитостеролы не характерные для молочного жира.

Для изучения влияния жиров немолочного происхождения на состав стеринов жировой фазы молока и молочной продукции были проведены исследования молочной продукции с заменой растительными жирами. Проведен эксперимент по возможности идентификации говяжьего жира при анализе состава стеролов жировой фазы молока и молочной продукции.

Для получения калибровочных параметров методики были использованы аналитические стандарты стеролов. Работа с аналитическими стандартами стеролов позволяет получить оптимальные условия разделения, с коэффициентом разрешения >1, а также определить времена удерживания для каждого определяемого компонента, по которым проводится идентификация стеринов. Полученные результаты отражены на рисунке 21.

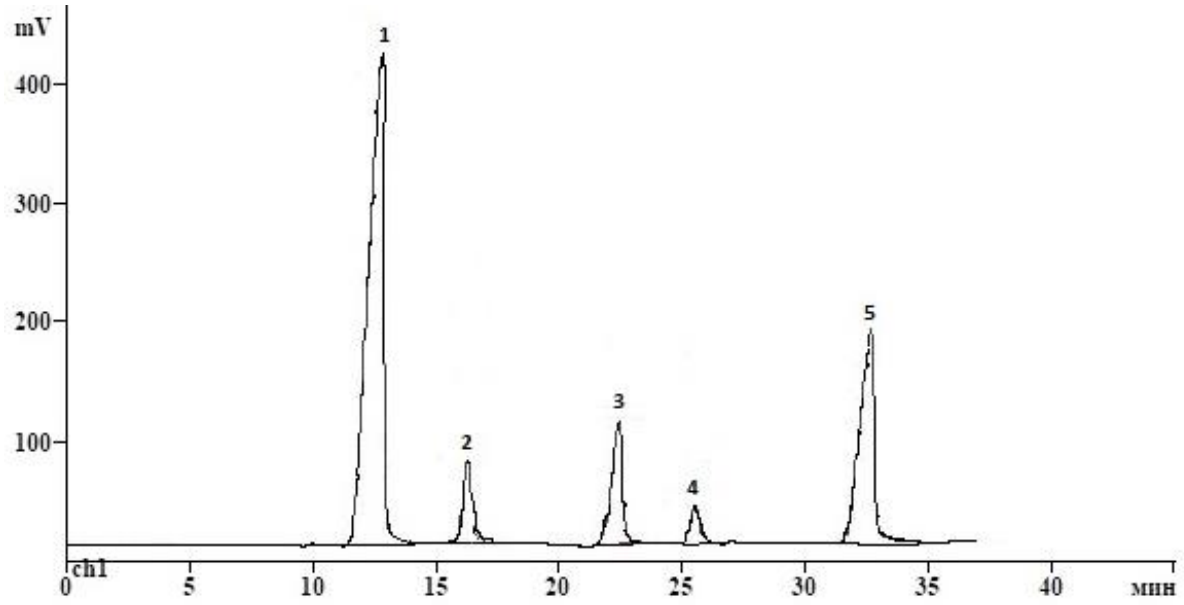


Рисунок 21 - Хроматограмма разделения аналитических стандартов стеринов методом обращено фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ). 1-холестерин; 2-брасикстерол; 3-кампастерол; 4-стигмастерол 5- β-ситостерол

Для подтверждения возможности применения метода жидкостной хроматографии для анализа жировой фазы был проведен эксперимент по измерению состава стеролов жировой фазы молочной продукции сложной структурной матрицы. В этих целях были использованы коммерческие образцы молока цельного сгущенного с сахаром без замены молочного жира и с внесением растительных жиров. После проведения процедуры пробоподготовки был произведен хроматографический анализ, результаты которого отражены на рисунках 22 и 23.

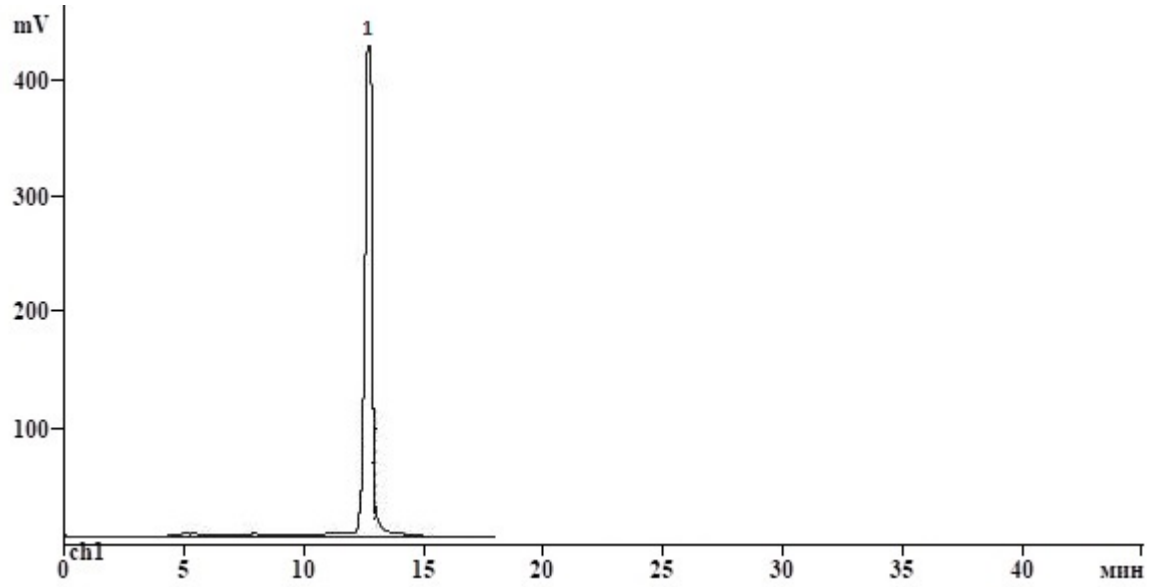


Рисунок 22 - Хроматограмма разделения стеринов молока сгущенного без добавления растительных жиров. 1-Холестерин

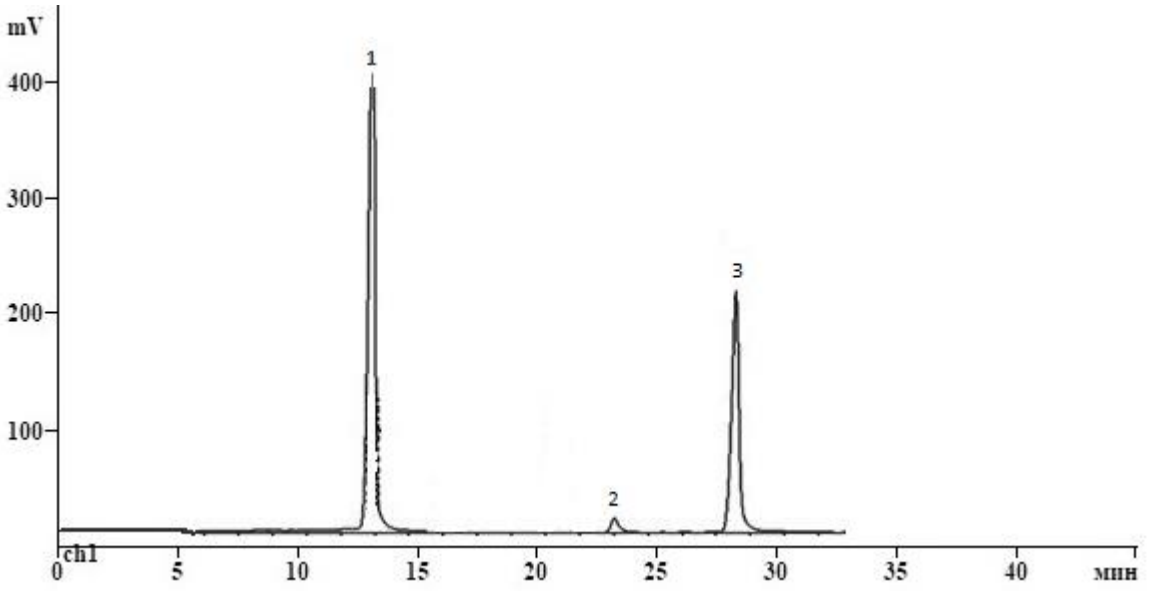


Рисунок 23 - Хроматограмма разделения стеринов молока сгущенного с добавлением жиров растительного происхождения. 1-Холестерин,2-стигмастерол, 3- β-ситостерол

Данные хроматографического разделения подтверждают возможность применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения состава стеролов жировой фракции молочной продукции. Так для образца молока сгущенного без заменителей молочного жира был получен только

пик холестерина характерного для молочного жира, а образец молока с заменой жировой фазы растительными жирами выявил в своем составе фитостерины, являющиеся составной частью жиров высших растений - β-ситостерол и стигмастерол.

Методики по определению состава стеролов в молочной продукции являются качественными, и выявление фитостеринов в молочном жире является показателем наличия в нем исключительно растительных жиров.

Для изучения возможности применения данной методики для выявления жиров животного происхождения были использованы экспериментальные образцы молочного жира с добавлением говяжьего жира. Была применена методика экстракции стеринов и проведена процедура хроматографического разделения. Результат исследования представлен на рисунке 24

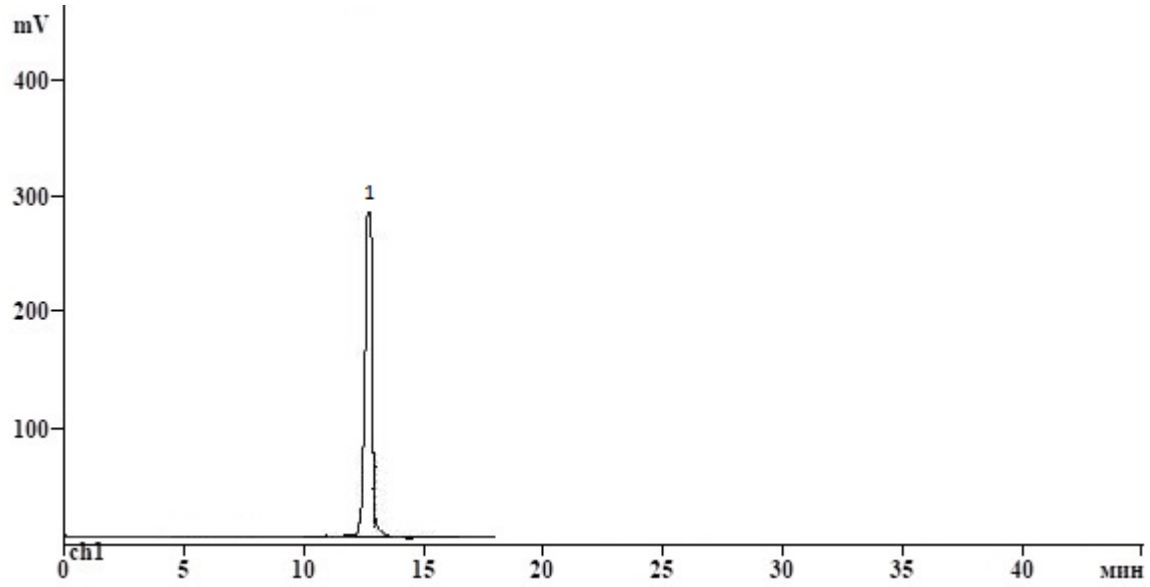


Рисунок 24- Хроматограмма разделения стеринов образца молочного жира с добавлением говяжьего жира. 1-Холестерин

Результаты анализа подтвердили, что в составе жировой фазы анализируемых образцов присутствует только пик холестерина, характерного для животных жиров.

При оценке количественного содержания холестерина было выяснено, что содержание холестерина в чистом молочном жире выше, чем в исследованных

образцах с внесенным говяжьим жиром. Этот факт был использован для выявления закономерности содержания холестерина в зависимости от количества добавленных жиров не молочного происхождения. Для составления данной зависимости были использованы две линейки экспериментальных образцов используемые ранее для методик измерения жирно-кислотного и триацилглицеридного составов. Было измерено содержание холестерина в контрольных образцах молочного жира, которое составило 43,52±2.3 мг/100г для линейки с добавлением пальмового масла и 41,03±2.3 мг/100г для образцов я добавлением говяжьего жира. Полученные результаты отражены в таблице 3.12

Таблица 19 - Зависимость содержание холестерина в молочном жире при замене жирами растительного и животного происхождения

Соотношение молочного жира с пальмовым маслом и говяжьим жиром	Содержание холестерина в образцах (мг/100г),(n=10)	
	Пальмовое масло	Говяжий жир
90/10%	23,52±1,5	37,58±2,1
70/30%	16,48±1,2	34,58±1,8
50/50%	12,57±1,0	31,24±1,8
30/70%	8,17±0,8	28,61±1,6
10/90%	5,64±0,6	27,58±1,6
100%	0,00±0,1	26,84±1,5

Снижение содержание холестерина было выявлено в обоих случая замены жирами не молочного происхождения. Пальмовое масло показало снижение содержания холестерина почти в 2 раза даже при незначительной замене в количестве 10%. Тогда как при добавлении говяжьего жира также была выявлена тенденция к снижению содержания холестерина, но незначительная. Данный факт показывает, что применение данной зависимости для выявления фальсификации жирами животного происхождения возможен только при значительных заменах более 70%. А в случае с жирами растительного происхождения более

информативно не снижение содержания холестерина, а наличие в исследуемых образцах фитостеринов.

Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии возможно в качестве альтернативного метода газожидкостного хроматографического анализа. Использование этих методов подходит для выявления наличия примесей растительных жиров в молоке и молочной продукции. Методики имеют качественный характер измерений и работают по принципу положительный и отрицательный результат. Применение этих методик не дает возможности определения замены молочного жира, жирами животного происхождения. Но при комплексном анализе дает возможность определить природу добавленного жира.

При проведении эксперимента по анализу жировой фазы молока и молочной продукции методами газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии были изучены диапазоны вариативности жирно-кислотного и триацилглицеридного состава. Полученные диапазоны позволили отобрать образцы молочного жира, на основе которых были построены модельные жировые системы с внесением пальмового и кокосового масла, а так же говяжьего жира. При изучении этих модельных систем была изучена тенденция изменения жирно-кислотного и триацилглицеридного состава молочного жира при внесении жиров немолочного происхождения. Определены «идентификационные» параметры жирно-кислотного и триацилглицеридного состава, а так же состава стеролов, позволяющие осуществлять контроль жировой фазы молока и молочной продукции.

Выявлены недостатки применения каждого метода в отдельности. Что обосновывает применение комплексной оценки жировой фазы молока и продуктов его переработки для аутентификации молочного жира.

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА И ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ АУТЕНТИФИКАЦИИ ЖИРОВОЙ ФАЗЫ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

Каждый из аналитических методов, описанный в предыдущих разделах является достаточно эффективным в определенном диапазоне измерений. Однако применение их по отдельности может приводить как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Так жирнокислотный состав по причине широких диапазонов состава жирных кислот открывает огромный простор для применения фальсификации жирами как растительного, так и животного происхождения. И заключение о присутствии фальсификации гарантированно возможно, только при высоких степенях замены, т.е. более 30%. Для дополнительного контроля, законодательно можно применять утвержденные методики по определению состава стеринов. Но, как подтверждают экспериментальные данные, эти методы показывают только фальсификацию с использованием растительных жиров. Это связано с тем, что животные жиры не содержат особых стеринов, кроме холестерола, которые, что свою очередь, возможно, использовать для производства поддельных молочных продуктов. Предложенная в диссертационной работе методика по измерению триглицеридного состава показала несколько большую эффективность по выявлению незначительной замены молочного жира жирами иного происхождения. Возможности метода определения состава триацилглицеридов широки, но все же, как и в случае с составом жирных кислот, состав триацилглицеридов так же подвержен изменениям, хотя и в гораздо более узком диапазоне. Что может привести к неверной интерпретации результатов. В настоящее время производители молочной продукции под нарастающим вниманием контролирующих органов к фальсификации молока и молочной продукции, использую все более наукоемкий подход, требующий от надзорных предприятий соответствующих ответных мер. Поэтому применение узконаправленных мероприятий по выявлению высокотехнологичной фальсификации не является гарантом получения достоверного результата. В связи

с этим был разработан комплекс мер по аутентификации молочного жира с применением современных высокоточных методов хроматографии.

4.1 Применение метода картирования при проведении экспертизы аутентичности молочного жира

Картирование представляет собой обобщенное название нескольких методов, относящихся к категориям как пространственно-графических, так и информационно-графических методов отображения информации. Общий смысл, который вкладывается в этот термин, – это отображение и моделирование взаимосвязей и взаимоотношений объектов и их частей в различных системах.

Данные предыдущих исследований показали, что жирно-кислотный состав и состав триацилглицеридов молочного жира, несмотря на вариативный характер, имеет устойчивый структурный баланс. Внесение жиров как растительного, так и животного происхождения этот баланс нарушают. На этом принципе строится методика выявления жиров не молочного происхождения. Так как этот принцип основан на выявлении различий между молочным жиром и исследуемым образцом, то для быстрой оценки полученных результатов возможно применение метода картирования, по контрольным точкам выраженного в виде графического профиля образцов. Применение данного метода позволит осуществлять оценку анализируемого объекта по принципу «отпечатков пальцев».

4.1.1 Картирование жирнокислотного состава жировой фазы молока и молочной продукции

Согласно нормативной документации на жирнокислотный состав, в качестве идентификационных используются следующие жирных кислоты: масляная ($C_{4:0}$), лауриновая ($C_{12:0}$), миристиновая ($C_{14:0}$), пальмитиновая ($C_{16:0}$), стеариновая ($C_{18:0}$), олеиновая ($C_{18:1Cis}$) и линолевая ($C_{18:2Cis}$).

Изученные влияния замены молочного жира, жирами немолочного происхождения подтвердили, что эти кислоты подвергаются наиболее сильным изменениям. Обосновывая их применение в качестве контрольных точек аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции по составу жирных

кислот. Так же экспериментально было доказано, что в качестве еще одной представительной точки можно использовать трансизомер олеиновой кислоты – элаидиновую кислоту ($C_{18:1trans}$). Анализ содержания этой жирной кислоты, позволяет оценить происхождение внесенного жира.

Картирование состава жирных кислот при внесении пальмового и говяжьего жиров отражено на рисунках 25,26 и 27.

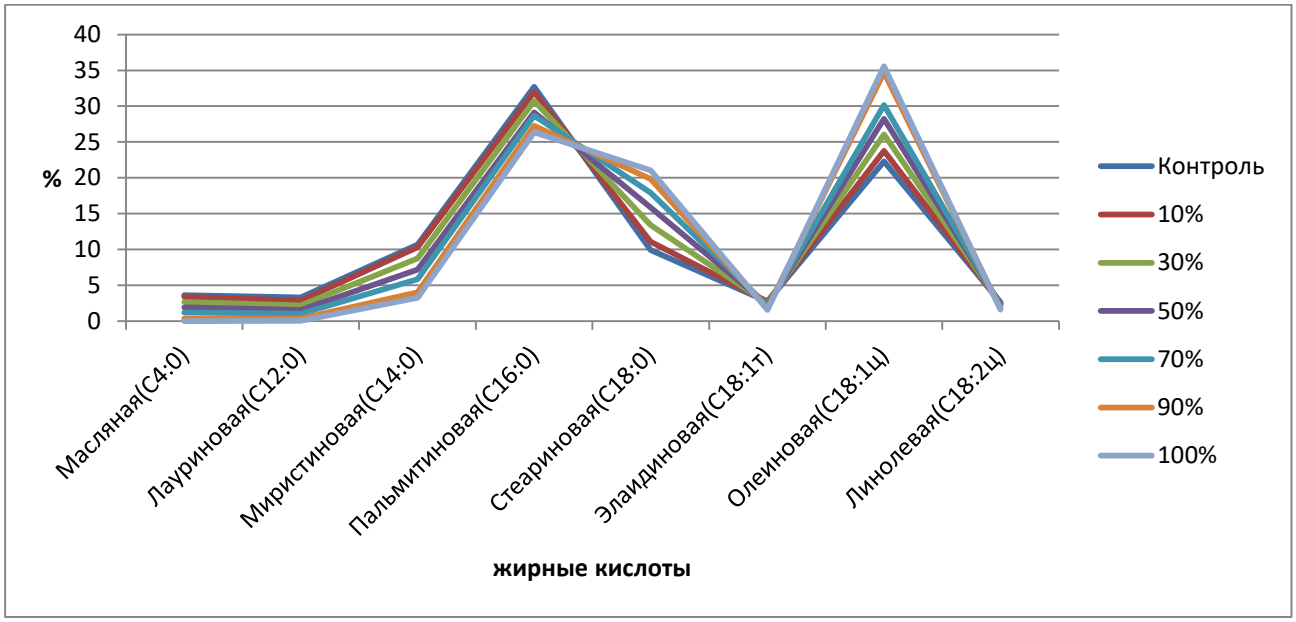


Рисунок 25 - Графическое отображение контрольной диаграммы молочного жира при внесении говяжьего жира

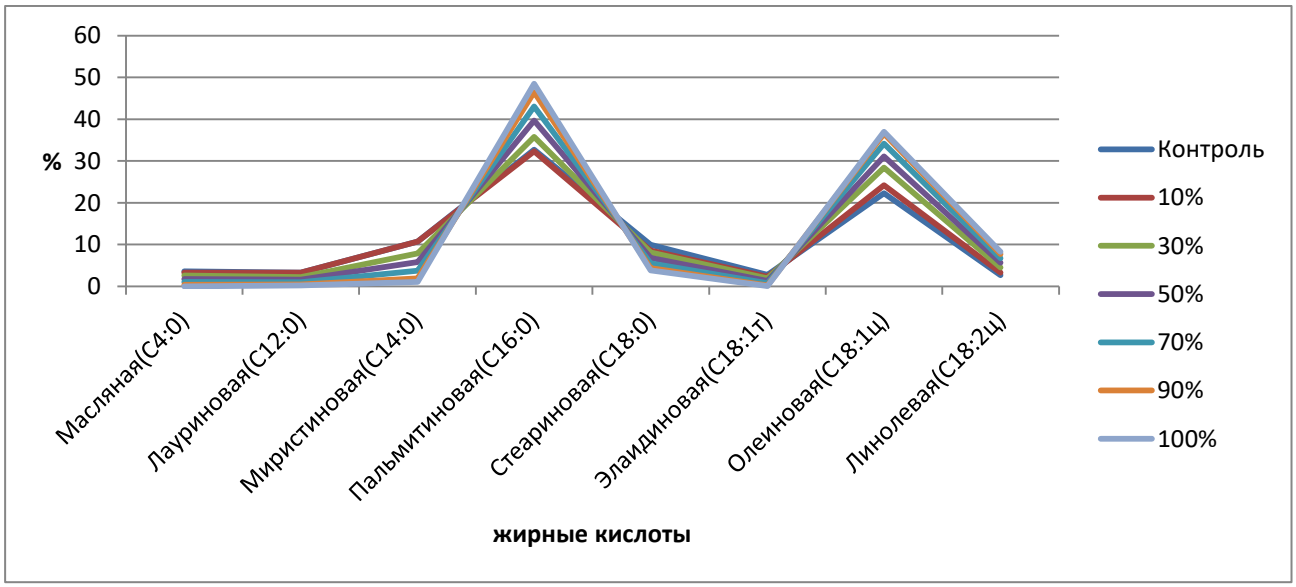


Рисунок 26 - Графическое отображение контрольной диаграммы молочного жира при внесении пальмового масла

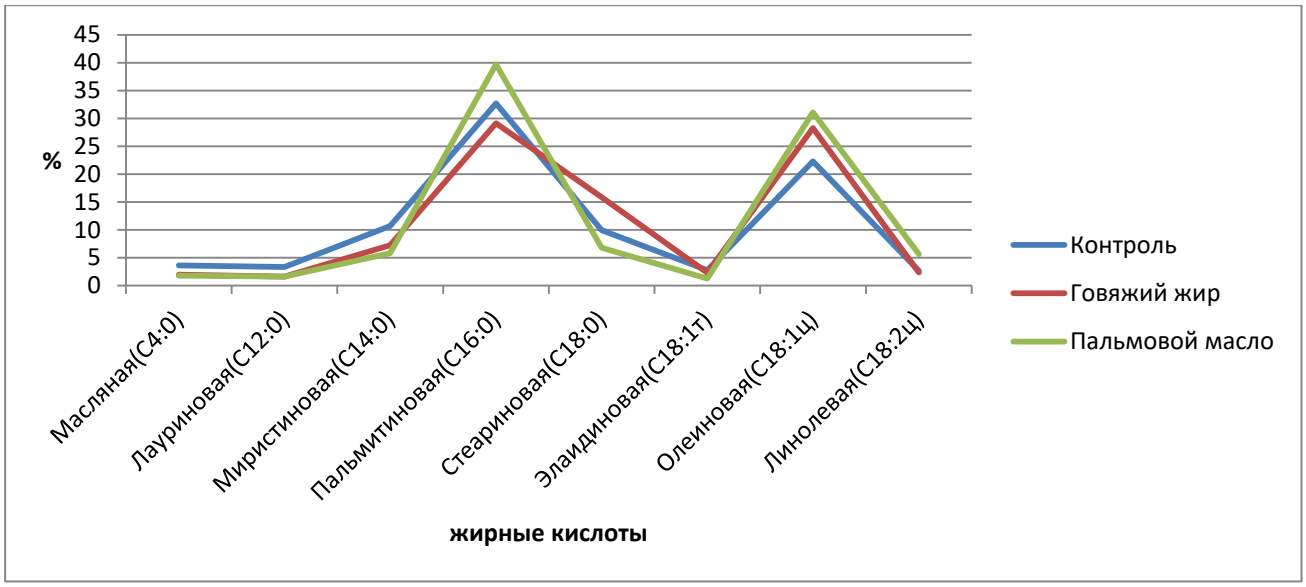


Рисунок 27 - Графическое отображение контрольной диаграммы молочного жира при внесении говяжьего жира и пальмового масла

4.1.2 Картирование триацилглицеридного состава жировой фазы молока и молочной продукции

Данные предыдущих исследований показали, что состав ТАГ пальмового и говяжьего жиров в основном применяющиеся при фальсификации молочного жира имеет различия по трем основным группам триглицеридов содержащимся в них по массе (w,%). Для более глубокого понимания свойств этих различий было проведено исследование внутреннего состава каждого из семейств триацилглицеридов. Состав триглицеридов оценивается по видам и количеству входящих в него жирных кислот. Молочный жир содержит двенадцать основных жирных кислот, исходя из структуры триацилглицеридов, содержащих три жирные кислоты в трех положениях, теоретически можно получить 1728 типов триацилглицеридов. Но поскольку положение жирных кислот в составе триглицеридов не случайно, их количество значительно меньше.Данная работа не включает в себя полную расшифровку состава структуры отдельных ТАГ по составу жирных кислот и их sn- положений. Методом капиллярной газовой хроматографии было разрешено 125 пиков триглицеридов, каждый из которых

использовался для проведения идентификации и сопоставления молочного жира с жирами растительного и животного происхождения.

Поскольку основной задачей применение данной методики является возможность выявления «тонкой» фальсификации молочной продукции жирами немолочного происхождения, то основное внимание было уделено нахождению контрольных точек, позволяющих проводить аутентификацию молочного жира при низких количествах подмены жирами не молочного происхождения, т.е. менее 30%.

С этой целью был проведен статистический анализ всех полученных экспериментальных данных по изменению состава триглицеридов при внесении пальмового и говяжьего жиров. Для упрощения задачи идентификации большого массива данных, был использован метод визуального картирования ТАГ позволяющего быстро выявить контрольные точки, применение которых можно использовать для аутентификации жиров. На рисунке 4.4 проиллюстрированы контрольные карты для молочного жира с добавками пальмового и говяжьего жиров в размере 10%.

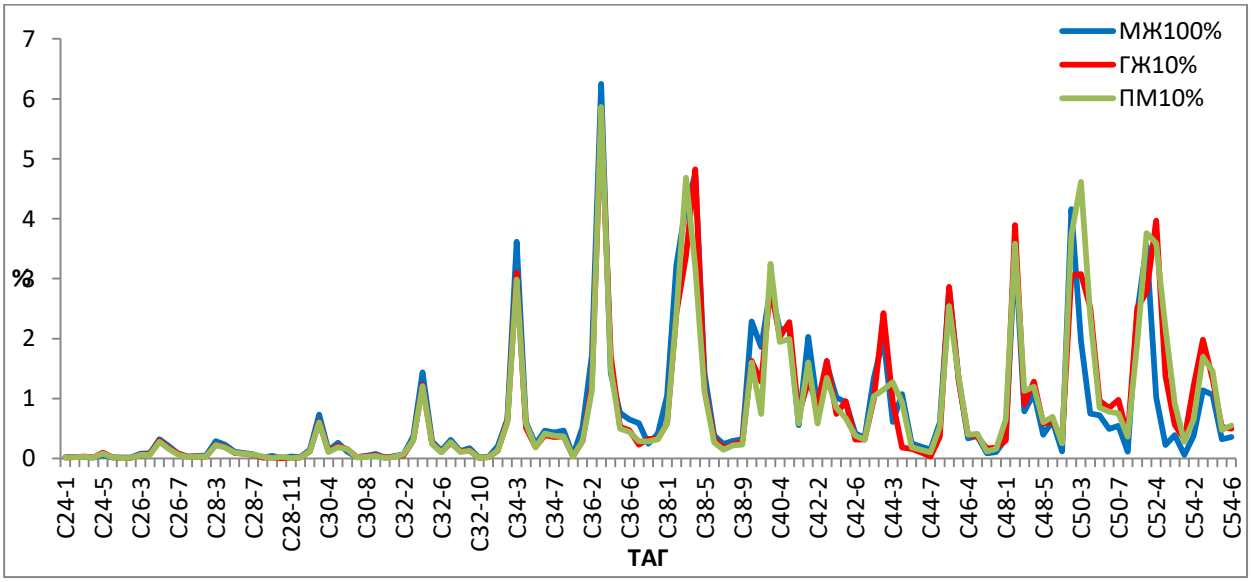


Рисунок 28 - Картирование триацилглицеридов состава С24-С54. МЖ-молочный жир. ГЖ10%- добавление говяжьего жира в размере 10% по массе. ПМ10%- добавление пальмового жира в размере 10% по массе

Данные графического анализа указывают, что наиболее информативными являются семейства триацилглицеридов состава С44,С50,С52 и С54. Это обусловлено не только различием в содержании этих семейств, но и характерными различиями в структуре каждого триацилглицерида. Далее была построена контрольная карта для этих четырех семейств ТАГ. Визуализация структуры, идентификационных, триацилглицеридов доказывает различия в составе ТАГ имеющие индивидуальные особенности характерные для каждого исследуемого образца жира (рисунок 29).

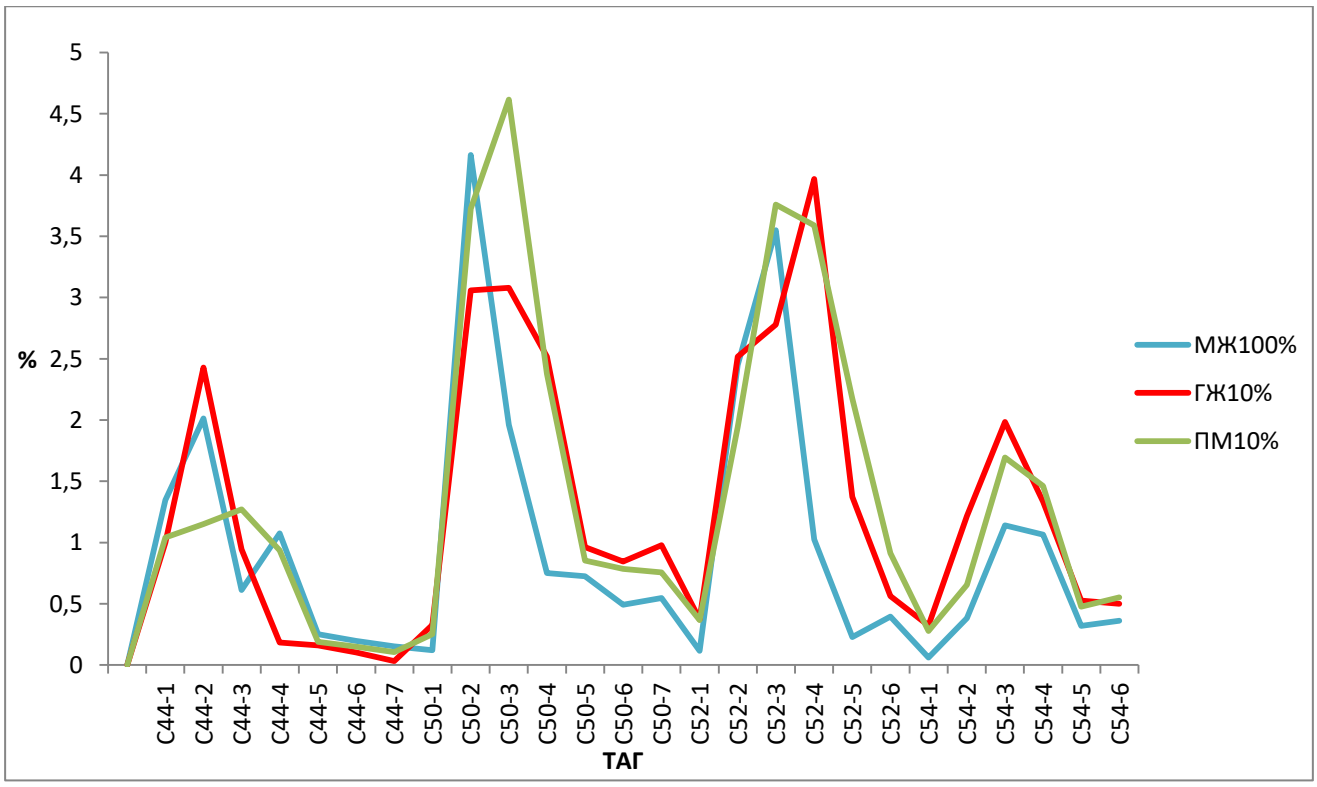


Рисунок 29 - Картирование триацилглицеридов состава С44,С50,С52,С54. МЖ-молочный жир. ГЖ10%- добавление говяжьего жира в размере 10% по массе. ПМ10%- добавление пальмового жира в размере 10% по массе

Анализ полученного экспериментального материала доказывает, что использование визуального изображения в виде контрольных карт с контрольными точками внутреннего состава триацилглицеридов позволяет проводить сличение различных видов жиров по принципу отпечатков пальцев даже при незначительных изменениях их состава.

4.1.3 Картирование состава стеролов жировой фазы молока и молочной продукции

Методики, применяемые для определения данного показателя, являются качественными, и получаемый результат отображается либо в присутствии фитостеринов, либо в их отсутствии. Эксперимент по количественному определению состава стеролов не принес положительных результатов, и использование данного направления для идентификации жировой фазы является не целесообразным. В связи с этим предлагается при использовании графического метода анализа принимать данный показатель в случае присутствия фитостеринов за «1», а при отсутствии за «0».

Использование показателей рекомендуемых для графической интерпретации результатов анализа, будет получена контрольная диаграмма, отраженная на рисунке 30.

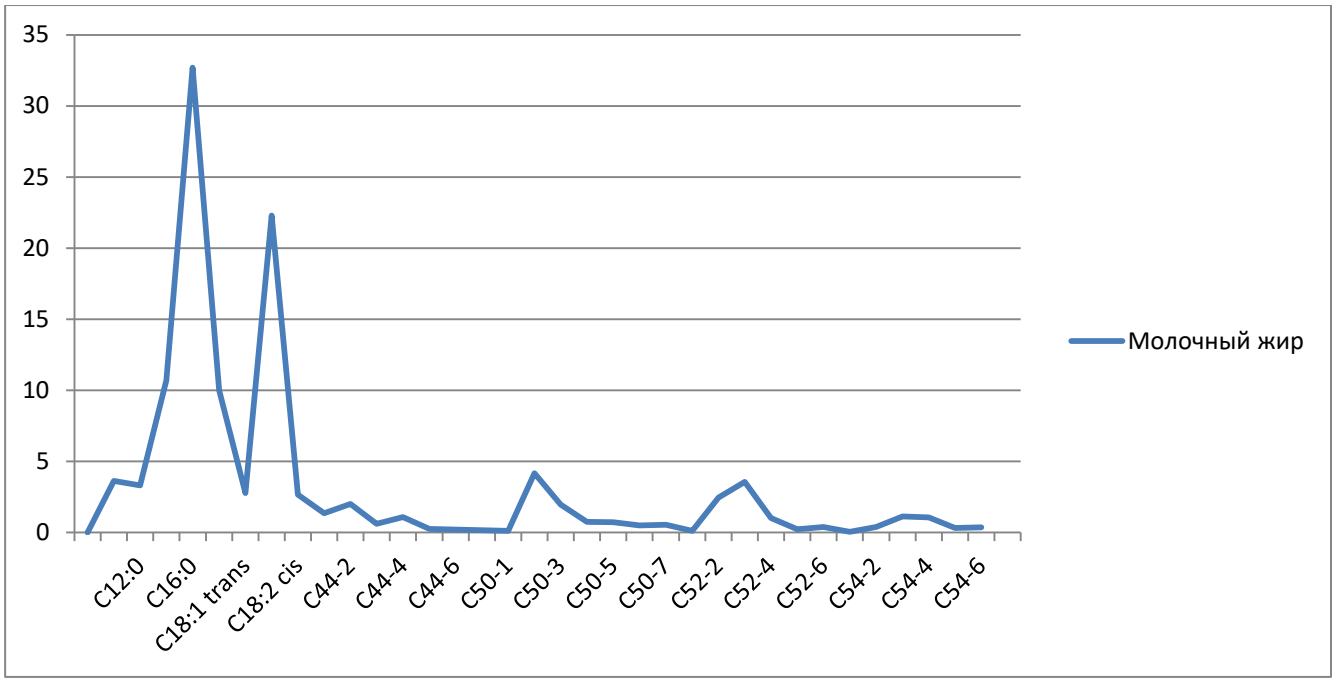


Рисунок 30 - Графическое отображение контрольной диаграммы молочного жира

После построение контрольной диаграммы в нее необходимо внести данные полученные в результате анализа исследуемого образца и провести сопоставление

контрольных точек. При выявлении точек не входящих в зону характерную для молочного жира, можно сделать предварительный вывод о фальсификации.

4.2 Практическая реализация картирования для выявления фальсификации жировой фазы молока и продуктов его переработки

Практическая реализация предложенной системы графического анализа для выявления возможной фальсификации молочного жира, была проведена в виде контрольных измерений десяти случайных образцов сырого молока.

Полученные пробы были проанализированы всеми методиками, предлагаемыми к использованию для контроля жировой фазы молока и молочной продукции. После полного цикла испытаний десяти образцов молока сырья были получены результаты, согласно которым девять образцов полностью соответствовали заявленным требованиям, а в одном образце молока была обнаружена замена жирами не молочного происхождения. Данные по этому образцу молока сырья представлены в таблице 20.

Таблица 20-Результаты испытания молока сырого

Наименование жирных кислот	Содержание жирных кислот, %	Состав ТАГ,%			
Масляная ($C_{4:0}$)	2,84	C_{44}	C_{50}	C_{52}	C_{54}
Лауриновая ($C_{12:0}$)	2,70	0,90	0,58	0,55	0,40
Миристиновая ($C_{14:0}$)	9,26	1,71	3,45	7,18	2,18
Пальмитиновая ($C_{16:0}$)	28,58	0,78	3,45	3,44	2,04
Стеариновая ($C_{18:0}$)	12,58	0,17	2,6	2,83	1,43
Элаидиновая($C_{18:1trans}$)	2,56	0,13	1,06	1,21	0,50
Олеиновая ($C_{18:1cis}$)	25,51	0,10	0,91	0,69	0,49
Линолевая ($C_{18:2cis}$)	2,85	0,02	1,33	-	-

При анализе на состав стеролов фитостерины обнаружены не были.

Результаты анализа молока сырья были обработаны методом картирования (рисунок 31).

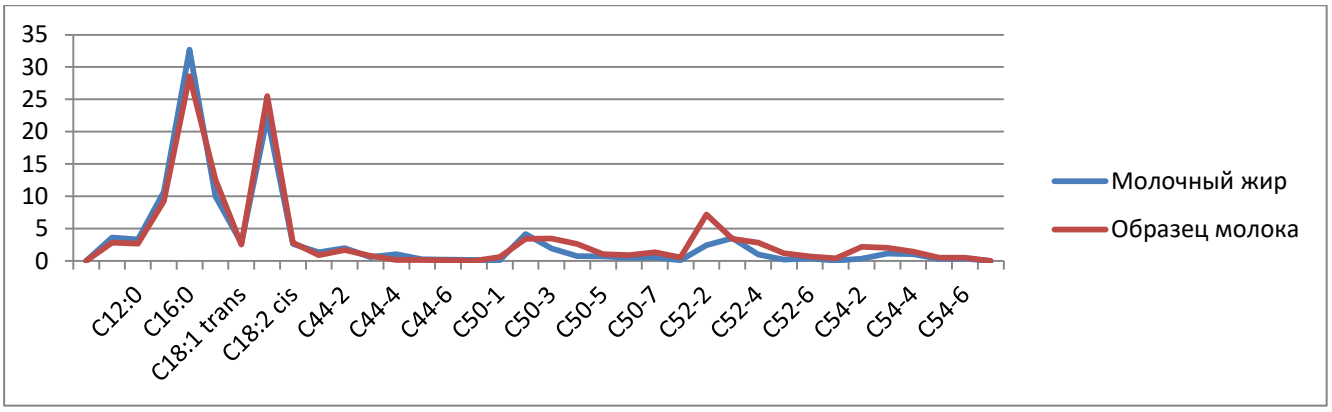


Рисунок 31 - Результат картирования образца молока сырья

Исходя из полученных данных, было выявлено наличие немолочных жиров в составе молочного жира, так же с учетом контроля состава стеринов не выявившего фитостеринов в составе данного образца, можно сделать заключение о фальсификации жирами животного происхождения.

Следующим этапом были проведены испытания образцов творога и сметаны экспериментальной выработки с заменой растительным жиром (пальмовое масло) и говяжьим жиром в количестве 10% и 30%. В качестве контроля были использованы образцы творога и сметаны без внесения жиров не молочного происхождения. Результаты обработки графических данных приведены на рисунках 32 и 33.

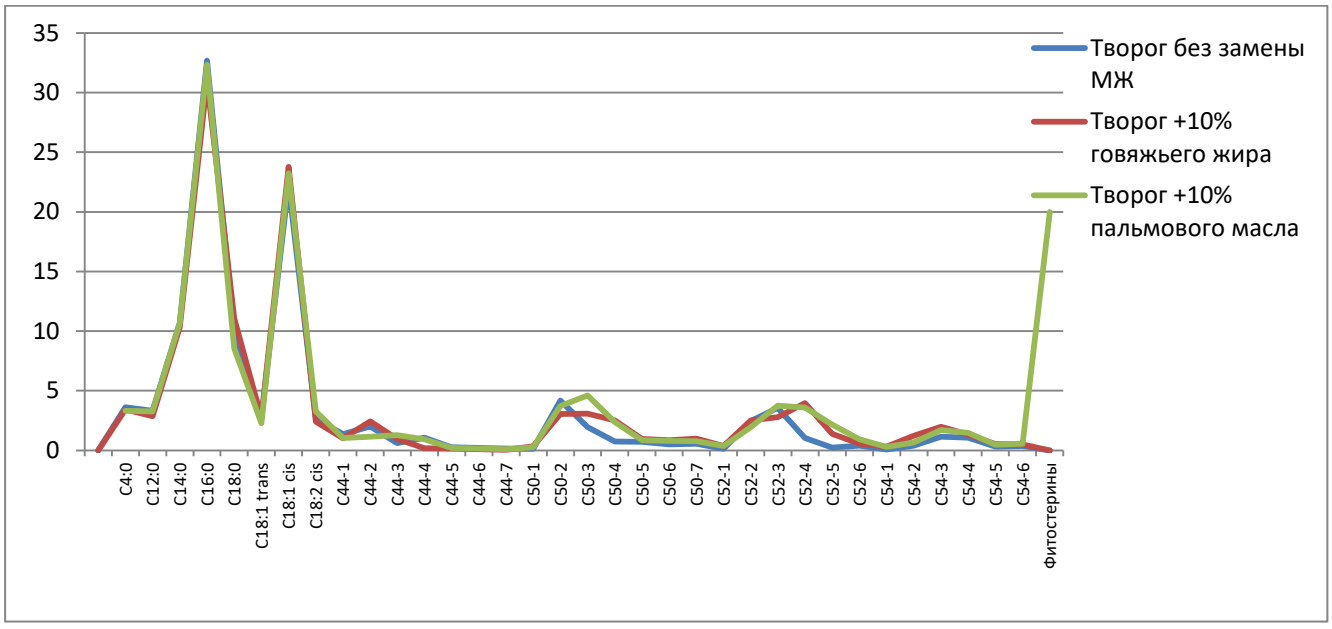


Рисунок 32 - Результат графического анализа образцов творога с заменой молочного жира пальмовым маслом и говяжьим жиров в количестве 10%

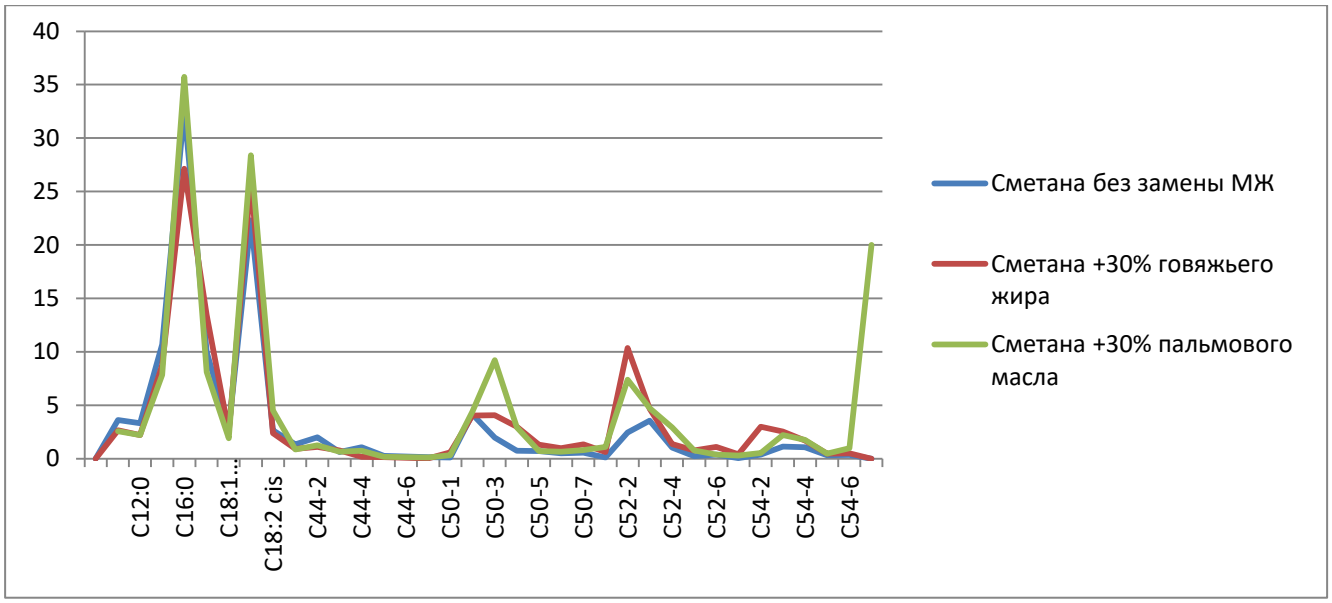


Рисунок 33 - Результат графического анализа образцов сметаны с заменой молочного жира пальмовым маслом и говяжьим жиров в количестве 30%

Как и в случае анализа молока сырья, графический анализ данных выявил замену молочного жира жирами как растительного, так и животного происхождения. Что доказывает возможность применения метода для продуктов переработки молока.

4.3 Расчёт массовых долей жиров немолочного происхождения

Графический анализ данных жирнокислотного и триацилглицеридного состава молока и молочной продукции в ходе экспериментальных работ показал возможность применения методики для выявления в составе продукта жиров не молочного происхождения. Применение данной методики на этапе выявления посторонних включений позволяет вести скрининг исследуемых образцов, без понимания количества внесенных компонентов.

В настоящее время расчёт массовой доли молочного жира в продукте ведется по специфичной масляной кислоте наличие содержащейся только в жире молочного происхождения. Что при внесении в жировую фазу масляной кислоты делает этот расчет не состоятельным и ведет к получению ложного результата.

С учетом высокотехнологичных заменителей молочного жира при расчете содержания внесенных компонентов следует полагаться на большее количество факторов, что позволит более точно оценивать результат.

4.3.1 Расчет массовой доли молочного жира по составу жирных кислот

В ходе изучения влияния жиров растительного и животного происхождения на жирно-кислотный состав молочного жира были определены восемь «идентификационных» жирных кислот. Это кислоты, подвергающиеся наиболее сильному влиянию при внесении не молочных жировых компонентов.

Для построения уравнения расчета содержания добавок немолочного происхождения были использованы данные полученные в ходе экспериментальной части с применением модельных жировых систем. С уровнями замещения 10, 30, 50,70, 90 и 100%. Для этого было отобрано десять образцов молочного жира, в каждом из которых был измерен жирнокислотный состав. После чего были изготовлены жировые смеси в указанных выше пропорциях с применением пальмового и говяжьего жиров. Общее количество измерений для каждого вида жира составило 70 образцов.

4.3.1.1 Расчет массовой доли пальмового масла

Первая система расчета применена для модельных систем с заменой молочного жира пальмовым маслом. Согласно методу наименьших квадратов, вектор получается из выражения: ПМ= $(X^TX)^{-1}X^TY$. (1) Где матрица X–значение концентрации жирной кислоты, а Y–уровень замены жирами немолочного происхождения. Согласно данному уравнению был рассчитан вектор оценок коэффициентов регрессии (таблица 21).

Таблица 21- Вектор оценок коэффициентов регрессии

-21.106
-6.1525
-4.7504
-0.2831
1.7019
-0.3317
-4.3154
0.6426
2.0055

Из которых было построено уравнение регрессии для расчета массовой доли пальмового масла (ПМ), внесенного в жировую фазу молока и молочной продукции: ПМ = $-21.106-6.1525X_1-4.7504X_2-0.2831X_3 + 1.7019X_4-0.3317X_5-4.3154X_6 + 0.6426X_7 + 2.0055X_8$ (2). Где X_1 – масляная кислота, X_2 – лауриновая кислота, X_3 – миристиновая кислота, X_4 – пальмитиновая кислота, X_5 – стеариновая кислота, X_6 – элаидиновая кислота, X_7 – олеиновая кислота, X_8 – линолевая кислота.

Далее были рассчитаны факторы, подтверждающие регрессионную модель:

Стандартизированные коэффициенты частичной регрессии - β-коэффициенты (βj) показывают, насколько из их среднеквадратичного отклонения S (y) изменится результат y с соответствующим коэффициентом xj, изменяющимся на значение его среднеквадратичного отклонения (Sxj) с постоянным влиянием других факторов (входящих в уравнение).

По максимальному коэффициенту βj мы можем судить, какой фактор сильнее влияет на результат Y. Для наших данных:

$$-0.989 = \beta_1 + 0.98\beta_2 + 0.983\beta_3 - 0.969\beta_4 + 0.948\beta_5 + 0.975\beta_6 - 0.968\beta_7 - 0.969\beta_8$$
$$-0.988 = 0.98\beta_1 + \beta_2 + 0.993\beta_3 - 0.97\beta_4 + 0.957\beta_5 + 0.964\beta_6 - 0.972\beta_7 - 0.978\beta_8$$
$$-0.993 = 0.983\beta_1 + 0.993\beta_2 + \beta_3 - 0.98\beta_4 + 0.956\beta_5 + 0.977\beta_6 - 0.979\beta_7 - 0.98\beta_8$$
$$0.985 = -0.969\beta_1 - 0.97\beta_2 - 0.98\beta_3 + \beta_4 - 0.915\beta_5 - 0.964\beta_6 + 0.96\beta_7 + 0.964\beta_8$$
$$-0.955 = 0.948\beta_1 + 0.957\beta_2 + 0.956\beta_3 - 0.915\beta_4 + \beta_5 + 0.952\beta_6 - 0.959\beta_7 - 0.958\beta_8$$
$$-0.981 = 0.975\beta_1 + 0.964\beta_2 + 0.977\beta_3 - 0.964\beta_4 + 0.952\beta_5 + \beta_6 - 0.969\beta_7 - 0.957\beta_8$$
$$0.982 = -0.968\beta_1 - 0.972\beta_2 - 0.979\beta_3 + 0.96\beta_4 - 0.959\beta_5 - 0.969\beta_6 + \beta_7 + 0.979\beta_8$$
$$0.983 = -0.969\beta_1 - 0.978\beta_2 - 0.98\beta_3 + 0.964\beta_4 - 0.958\beta_5 - 0.957\beta_6 + 0.979\beta_7 + \beta_8$$

Данную систему линейных уравнений решаем методом Гаусса: $\beta_1 = -0.222$; $\beta_2 = -0.151$; $\beta_3 = -0.0271$; $\beta_4 = 0.26$; $\beta_5 = -0.0221$; $\beta_6 = -0.112$; $\beta_7 = 0.102$; $\beta_8 = 0.115$;

Расчет дисперсии и среднеквадратичного отклонения представлен в таблице 22

Таблица 22 - Дисперсии и среднеквадратические отклонения

Признаки x и y	$D(x)=\frac{\sum x_i^2}{n}-\bar{x}^2$	$D(y)=\frac{\sum y_i^2}{n}-\bar{y}^2$	$s(x)=\sqrt{D(x)}$	$s(y)=\sqrt{D(y)}$
Для y и x_1	1.672	1285.714	1.293	35.857
Для y и x_2	1.3	1285.714	1.14	35.857
Для y и x_3	11.788	1285.714	3.433	35.857
Для y и x_4	29.922	1285.714	5.47	35.857
Для y и x_5	5.683	1285.714	2.384	35.857
Для y и x_6	0.864	1285.714	0.93	35.857
Для y и x_7	32.585	1285.714	5.708	35.857
Для y и x_8	4.255	1285.714	2.063	35.857

Средняя ошибка аппроксимации для данных модельных жировых систем:

$$A=\frac{\sum|\epsilon:Y|}{n}\cdot 100\,\%=\frac{4.102}{70}\cdot 100\,\%=5.86\,\%$$

Среднеквадратичное отклонение составило (стандартная ошибка для оценки Y):

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{5.7495} = 2.398$$

Для проверки общего качества уравнения множественной регрессии был рассчитан показатель F-статистики.

F-статистика. Критерий Фишера.

$$R^2 = 1 - \frac{s_e^2}{\sum (y_i - \overline{y})^2} = 1 - \frac{350.72}{90000} = 0.9961$$

Далее была проверена гипотеза об общей значимости - гипотезу об одновременном равенстве нулю всех коэффициентов регрессии при объясняющих переменных:

H_0: $R^2 = 0$; $\beta_1 = \beta_2 = ... = \beta_m = 0$.

H_1: $R^2 \neq 0$.

Гипотеза была проверена с помощью F-статистики Фишера (правосторонняя проверка).

Если $F < F_{kp} = F_{\alpha\ ;\ n-m-1}$, то нет оснований для отклонения гипотезы H_0.

$$F = \frac{R^2}{1-R^2} \cdot \frac{n-m-1}{m} = \frac{0.9961}{1-0.9961} \cdot \frac{70-8-1}{8} = 1949.066$$

Табличное значение при степенях свободы $k_1 = 8$ и $k_2 = n-m-1 = 70 - 8 - 1 = 61$, $F_{kp}(8;61) = 2.02$. Поскольку фактическое значение $F > F_{kp}$, то коэффициент детерминации статистически значим и уравнение регрессии статистически надежно (т.е. коэффициенты b_i совместно значимы).

В результате расчетов было получено уравнение множественной регрессии: ПМ = $-21.106-6.1525X_1-4.7504X_2-0.2831X_3 + 1.7019X_4-0.3317X_5-4.3154X_6 + 0.6426X_7 + 2.0055X_8$.

Параметры модели были интерпретированы следующим образом: Рост на одну единицу измерения показателя X_i(концентрация) приводит к среднему изменению показателя Y (уровень замены жирами немолочного происхождения). Исходя, из данного положения были получены следующие результаты: Факторы $X_1;X_2;X_3;X_5$ иX_6 приводят к уменьшению параметра Y на 6.152;4.75;0.283;0.332 и 4.315 соответственно. А факторы $X_4;X_7$ иX_8 приводят к увеличению параметра Yна 1.702;0.643 и 2.005 единиц измерения.

При оценке коэффициентов частичной регрессии было выявлено, что коэффициент β_4=0.26 (фактор X_4-Пальмитиновая кислота) оказывает наибольшее влияние на параметр Y. Значимость уравнения была проверена путем установления критерия Фишера и коэффициента детерминации.Посредством которых определено для использованных данных вариабельность Y описывается изменением факторов X_j на величину 99,61%.

4.3.1.2 Расчет массовой доли говяжьего жира

Согласно уравнению 1 был рассчитан вектор оценок коэффициентов регрессии (таблица 23).

Таблица 23-Вектор оценок коэффициентов регрессии

-26.9145
-9.2074
-4.9472
0.4341
0.04149
2.207
-2.5936
2.192
1.9505

Из которых было построено уравнение регрессии для расчета массовой доли говяжьего жира (ГЖ), внесенного в жировую фазу молока и молочной продукции: ГЖ= -26.9145-9.2074X_1-4.9472X_2 + 0.4341X_3 + 0.04149X_4 + 2.207X_5-2.5936X_6 + 2.192X_7 + 1.9505X_8 (3) Где X_1 – масляная кислота, X_2 – лауриновая кислота, X_3 –

миристиновая кислота, X_4 – пальмитиновая кислота, X_5 – стеариновая кислота, X_6 – элаидиновая кислота, X_7 – олеиновая кислота, X_8 – линолевая кислота.

Так же как и в предыдущем случае для пальмового масла были рассчитаны факторы, подтверждающие регрессионную модель:

Стандартизированные частные коэффициенты регрессии - β-коэффициенты:

$-0.99 = \beta_1 + 0.978\beta_2 + 0.98\beta_3 + 0.528\beta_4 - 0.985\beta_5 + 0.925\beta_6 - 0.96\beta_7 + 0.916\beta_8$

$-0.988 = 0.978\beta_1 + \beta_2 + 0.991\beta_3 + 0.5\beta_4 - 0.979\beta_5 + 0.89\beta_6 - 0.973\beta_7 + 0.881\beta_8$

$-0.99 = 0.98\beta_1 + 0.991\beta_2 + \beta_3 + 0.503\beta_4 - 0.985\beta_5 + 0.917\beta_6 - 0.979\beta_7 + 0.905\beta_8$

$-0.517 = 0.528\beta_1 + 0.5\beta_2 + 0.503\beta_3 + \beta_4 - 0.508\beta_5 + 0.492\beta_6 - 0.515\beta_7 + 0.476\beta_8$

$0.992 = -0.985\beta_1 - 0.979\beta_2 - 0.985\beta_3 - 0.508\beta_4 + \beta_5 - 0.922\beta_6 + 0.972\beta_7 - 0.911\beta_8$

$-0.927 = 0.925\beta_1 + 0.89\beta_2 + 0.917\beta_3 + 0.492\beta_4 - 0.922\beta_5 + \beta_6 - 0.919\beta_7 + 0.941\beta_8$

$0.984 = -0.96\beta_1 - 0.973\beta_2 - 0.979\beta_3 - 0.515\beta_4 + 0.972\beta_5 - 0.919\beta_6 + \beta_7 - 0.902\beta_8$

$-0.912 = 0.916\beta_1 + 0.881\beta_2 + 0.905\beta_3 + 0.476\beta_4 - 0.911\beta_5 + 0.941\beta_6 - 0.902\beta_7 + \beta_8$

Данную систему линейных уравнений решаем методом Гаусса: $\beta_1 = -0.341$; $\beta_2 = -0.159$; $\beta_3 = 0.033$; $\beta_4 = 0.00487$; $\beta_5 = 0.24$; $\beta_6 = -0.0301$; $\beta_7 = 0.294$; $\beta_8 = 0.0197$;

Средняя ошибка аппроксимации:

$$A = \frac{\sum|\epsilon:Y|}{n} \cdot 100\,\% = \frac{3.408}{70} \cdot 100\,\% = 4.87\,\%$$

Среднеквадратичное отклонение составило:

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{4.6776} = 2.163$$

Коэффициенты раздельной детерминации (отдельного определения):

$d^2_i = r_{yxi}\beta_i$.

$d^2_1 = -0.99*(-0.341) = 0.337$ $d^2_2 = -0.99*(-0.159) = 0.157$

$d^2_3 = -0.99*0.033 = -0.0327$ $d^2_4 = -0.52*0.00487 = -0.00252$

$d^2_5 = 0.99*0.24 = 0.238$ $d^2_6 = -0.93*(-0.0301) = 0.0279$

$d^2_7 = 0.98*0.294 = 0.289$ $d^2_8 = -0.91*0.0197 = -0.018$

Качество уравнения множественной регрессии:

Критерий Фишера. F-статистика.

$$R^2 = 1 - \frac{s_e^2}{\sum (y_i - \overline{y})^2} = 1 - \frac{285.333}{90000} = 0.9968$$

F-статистика распределения Фишера (правосторонняя проверка).

Если $F < F_{kp} = F_{\alpha\,;\,n-m-1}$, то нет оснований для отклонения гипотезы H_0.

$$F = \frac{R^2}{1-R^2} \cdot \frac{n-m-1}{m} = \frac{0.9968}{1-0.9968} \cdot \frac{70-8-1}{8} = 2397.461$$

Табличное значение при степенях свободы $k_1 = 8$ и $k_2 = n-m-1 = 70 - 8 - 1 = 61$, $F_{kp}(8;61) = 2.02$. Поскольку фактическое значение $F > F_{kp}$, то коэффициент детерминации статистически значим и уравнение регрессии статистически надежно.

Уравнение множественной регрессии для расчёта содержания говяжьего жира имеет следующий вид:

$ГЖ = -26.9145-9.2074X_1-4.9472X_2 + 0.4341X_3 + 0.04149X_4 + 2.207X_5-2.5936X_6 + 2.192X_7 + 1.9505X_8$.

Параметры модели были интерпретированы следующим образом: рост на одну единицу измерения показателя X_i(концентрация) приводит к среднему изменению показателя Y (уровень замены жирами немолочного происхождения). Исходя, из данного положения были получены следующие результаты: Факторы $X_1;X_2$ иX_6 приводят к уменьшению параметра Y на 9.207;4.947и 2.594 соответственно. А факторы $X_3;X_4;X_5;X_7$ иX_8 приводят к увеличению параметра Yна 0.434;0.041;2.207;2.192 и 1.95 единиц измерения.

При оценке коэффициентов частичной регрессии было выявлено, что коэффициент β_7=0.294 (фактор X_7 -Олеиновая кислота) оказывает наибольшее влияние на параметр Y. Значимость уравнения была проверена путем установления критерия Фишера и коэффициента детерминации. Посредством

которых определено для использованных данных вариабельность Y описывается изменением факторов X_j на величину 99,68%.

4.3.2 Расчет массовой доли молочного жира по составу триацилглицеридов (ТАГ)

4.3.2.1 Расчет массовой доли говяжьего жира

Так как для состава триацилглицеридов не определены идентификационные семейства, то для введения в уравнение множественной линейной регрессии параметров X необходимо было определить наиболее значимые компоненты уравнения.

Сравнительный анализ оценки влияния на результативный признак анализируемых факторов (d - коэффициенты раздельной детерминации) было выявлено, что большее значение переменным регрессионной модели придают семейства триацилглицеридов отраженные в таблице 24.

Таблица 24 - Семейства ТАГ оказывающие наибольшее влияние на результативный признак при внесении говяжьего жира

ТАГ	C_{38}	C_{44}	C_{48}	C_{50}	C_{52}	C_{54}
d - коэффициенты	0,179	0,173	0,036	0,135	0,458	0,010

Приведенные в таблице 24 семейства триацилглицеридов были определены в качестве «идентификационных» и использованы для построения модели регрессионного анализа.

Так же как и для жирнокислотного состава, по уравнению (1) был рассчитан вектор оценок коэффициентов регрессии. С учетом, которого было построено уравнение для расчета массовой доли говяжьего жира (ГЖ), внесенного в жировую фазу молока и молочной продукции: $ГЖ = 2.0355 - 1.2193X_1 - 2.9015X_2 + 0.8284X_3 + 0.953X_4 + 1.7163X_5 - 0.08638X_6$ (4). Где X_1 – С38, X_2 – С44, X_3 – С48, X_4 – С50, X_5 – С52, X_6 – С54.

Для оценки β-коэффициентов был применен метод наименьших квадратов. При этом система нормальных уравнений будет иметь вид: $r_{x1y}=\beta_1+r_{x1x2}\bullet\beta_2 + ... + r_{x1xm}\bullet\beta_m$ $r_{x2y}=r_{x2x1}\bullet\beta_1 + \beta_2 + ... + r_{x2xm}\bullet\beta_m$ ... $r_{xmy}=r_{xmx1}\bullet\beta_1 + r_{xmx2}\bullet\beta_2 + ... + \beta_m$

Для наших данных:

$-0.854 = \beta_1 + 0.79\beta_2 + 0.192\beta_3 -0.286\beta_4 -0.547\beta_5 -0.113\beta_6$

$-0.428 = 0.79\beta_1 + \beta_2 + 0.724\beta_3 + 0.299\beta_4 + 0.0183\beta_5 + 0.49\beta_6$

$0.308 = 0.192\beta_1 + 0.724\beta_2 + \beta_3 + 0.871\beta_4 + 0.699\beta_5 + 0.95\beta_6$

$0.728 = -0.286\beta_1 + 0.299\beta_2 + 0.871\beta_3 + \beta_4 + 0.956\beta_5 + 0.971\beta_6$

$0.893 = -0.547\beta_1 + 0.0183\beta_2 + 0.699\beta_3 + 0.956\beta_4 + \beta_5 + 0.876\beta_6$

$0.574 = -0.113\beta_1 + 0.49\beta_2 + 0.95\beta_3 + 0.971\beta_4 + 0.876\beta_5 + \beta_6$

Данную систему линейных уравнений решаем методом Гаусса:

$\beta_1 = -0.21$; $\beta_2 = -0.403$; $\beta_3 = 0.116$; $\beta_4 = 0.185$; $\beta_5 = 0.543$; $\beta_6 = -0.0167$;

При анализе параметров уравнения регрессии были получены следующие данные:

Средняя ошибка аппроксимации:

$$A = \frac{\sum|\epsilon:Y|}{n}\cdot 100\,\% = \frac{2.836}{72}\cdot 100\,\% = 3.94\,\%$$

Среднеквадратичное отклонение:

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{4.3529} = 2.086$$

Проверка общего качества уравнения множественной регрессии:

F-статистика. Критерий Фишера.

$$R^2 = 1 - \frac{s_e^2}{\sum(y_i - \overline{y})^2} = 1 - \frac{282.941}{94861.11} = 0.997$$

F-статистика распределения Фишера. Если $F < F_{kp} = F_{\alpha;\ n-m-1}$, то нет оснований для отклонения гипотезы

H_0.

$$F = \frac{R^2}{1-R^2}\cdot\frac{n-m-1}{m} = \frac{0.997}{1-0.997}\cdot\frac{72-6-1}{6} = 3621.242$$

Табличное значение при степенях свободы $k_1 = 6$ и $k_2 = n\text{-}m\text{-}1 = 72 - 6 - 1 = 65$, $F_{kp}(6;65) = 2,17$ Поскольку фактическое значение F > Fkp, то коэффициент детерминации статистически значим и уравнение регрессии статистически надежно

В результате расчетов было получено уравнение множественной регрессии:

$ГЖ = 2.0355\text{-}1.2193X_1\text{-}2.9015X_2 + 0.8284X_3 + 0.953X_4 + 1.7163X_5\text{-}0.08638X_6$.

Параметры модели были интерпретированы следующим образом: Рост на одну единицу измерения показателя X_i(концентрация) приводит к среднему изменению показателя Y (уровень замены жирами немолочного происхождения). Исходя, из данного положения были получены следующие результаты: Факторы $X_1;X_2$ иX_6 приводят к уменьшению параметра Y на 1,219;2,901 и 0,086 соответственно. А факторы $X_3;X_4$и X_5 приводят к увеличению параметра Yна 0,828;0,953;1,716 и 2,192 единиц измерения.

Значимость уравнения была проверена путем установления критерия Фишера и коэффициента детерминации.Посредством которых определено для использованных данных вариабельность Y описывается изменением факторов X_jна величину 99,70%.

4.3.2.2 Расчет массовой доли пальмового масла

Анализ d-коэффициентов определил, что большее значение переменным регрессионной модели придают семейства триацилглицеридов отраженные в таблице 25.

Таблица 25-Семейства ТАГ оказывающие наибольшее влияние на результативный признак при внесении пальмового масла

ТАГ	C_{36}	C_{38}	C_{40}	C_{48}	C_{50}	C_{52}	C_{54}
d - коэффициенты	0,10	0,37	0,114	0,1	0,287	0,1	0,010

С учетом вычисленных значений векторов коэффициентов регрессии было построено уравнение множественной линейной регрессии для определения массовой доли пальмового масла (ПМ) в составе жировой фазы молока и молочной продукции: ПМ=73.124-1.6494X_1-3.8981X_2-0.184X_3 - 0.9987X_4 +0.7329X_5 + 0.6357X_6 + 0.01135X_7(5) Где X_1 – С36, X_2 – С38, X_3 – С40, X_4 – С48, X_5 – С50, X_6 – С52, X_7 – С54.

Анализ параметров уравнения регрессии:

Средняя ошибка аппроксимации

$$A = \frac{\sum|\epsilon : Y|}{n} \cdot 100\,\% = \frac{1.917}{70} \cdot 100\,\% = 2.74\,\%$$

Среднеквадратичное отклонение:

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{3.074} = 1.753$$

Методом наименьших квадратов рассчитаны β – коэффициенты:

-0.996 = β_1 + 0.995β_2 + 0.988β_3 -0.984β_4 -0.989β_5 -0.994β_6 -0.988β_7

-0.998 = 0.995β_1 + β_2 + 0.994β_3 -0.987β_4 -0.993β_5 -0.997β_6 -0.992β_7

-0.994 = 0.988β_1 + 0.994β_2 + β_3 -0.987β_4 -0.995β_5 -0.996β_6 -0.993β_7

0.987 = -0.984β_1 -0.987β_2 -0.987β_3 + β_4 + 0.991β_5 + 0.99β_6 + 0.989β_7

0.994 = -0.989β_1 -0.993β_2 -0.995β_3 + 0.991β_4 + β_5 + 0.996β_6 + 0.995

$\beta_7$0.997 = -0.994β_1 -0.997β_2 -0.996β_3 + 0.99β_4 + 0.996β_5 + β_6 + 0.994

$\beta_7$0.992 = -0.988β_1 -0.992β_2 -0.993β_3 + 0.989β_4 + 0.995β_5 + 0.994β_6 + β_7

Методом Гаусса решаем данную систему уравнений:

β_1 = -0,173; β_2 = -0,557; β_3 = -0,0228; β_4 = -0,0609; β_5 = 0.115; β_6 = 0,191; β_7 = 0,00153.

Далее был рассчитан множественный коэффициент корреляции (Индекс множественной корреляции):

$$R = \sqrt{1 - \frac{s_e^2}{\sum (y_i - \overline{y})^2}} = \sqrt{1 - \frac{190.59}{90000}} = 0.9989$$

Коэффициент множественной корреляции

$$R = \sqrt{1 - \frac{0}{0}} = 0.9989$$

Связь между признаком Y и факторами X_i сильная

Расчёт коэффициента корреляции выполним, используя известные значения линейных коэффициентов парной корреляции и β-коэффициентов

$$.R = \sqrt{\sum r_{yxi}\beta_{yxi}} =$$

$$\sqrt{(-0.996)*(-0.173)+(-0.998)*(-0.557)+(-0.994)*(-0.0228)+0.987*(-0.0609)+0.994*0.115+0.997*0.191+0.992*0.00153}$$

$$= \sqrt{0.998} = 0.999$$

Коэффициент детерминации R^2 = 0,998

Более объективной оценкой является скорректированный коэффициент детерминации:

$$\overline{R}^2 = 1 - (1 - R^2) \cdot \frac{n-1}{n-m-1} \overline{R}^2 = 1 - (1 - 0.9979) \cdot \frac{70-1}{70-7-1} = 0.998$$

Чем ближе этот коэффициент к единице, тем больше уравнение регрессии объясняет поведение Y.

Проверка общего качества уравнения множественной регрессии:

F-статистика. Критерий Фишера.

$$R^2 = 1 - \frac{s_e^2}{\sum (y_i - \overline{y})^2} = 1 - \frac{190.59}{90000} = 0.9979$$

F-статистика распределения Фишера: H_0.

$$F = \frac{R^2}{1 - R^2} \cdot \frac{n-m-1}{m} = \frac{0.9979}{1 - 0.9979} \cdot \frac{70-7-1}{7} = 4173.637$$

Табличное значение при степенях свободы $k_1 = 7$ и $k_2 = n\text{-}m\text{-}1 = 70 - 7 - 1 = 62$, $F_{kp}(7;62) = 2.09$. Поскольку фактическое значение $F > F_{kp}$, то коэффициент детерминации статистически значим и уравнение регрессии статистически надежно.

В результате расчетов было получено уравнение множественной регрессии: ПМ = 73.124-1.6494X_1-3.8981X_2-0.184X_3-0.9987X_4 + 0.7329X_5 + 0.6357X_6 + 0.01135X_7.

Параметры модели были интерпретированы следующим образом: Рост на одну единицу измерения показателя X_i(концентрация) приводит к среднему изменению показателя Y (уровень замены жирами немолочного происхождения). Исходя, из данного положения были получены следующие результаты: Факторы X_1;X_2;X_3 и X_4 приводят к уменьшению параметра Y на 1,649;3,898;0,184 и 0,999 соответственно. А факторы X_5;X_6 иX_7 приводят к увеличению параметра Y на 0.733;0.636 и 0.011единиц измерения.

При оценке коэффициентов частичной регрессии было выявлено, что коэффициент β_6=0,191 (фактор X_6 -C_{52}) оказывает наибольшее влияние на параметр Y. Значимость уравнения была проверена путем установления критерия Фишера и коэффициента детерминации. Посредством которых определено для использованных данных вариабельность Y описывается изменением факторов X_jна величину 99,79%.

Расчёт массовой доли жиров немолочного происхождения в жировой фазе молока и молочной продукции согласно разработанной регрессионной модели можно производить как по жирнокислотному составу, так и по составу триацилглицеридов. В среднем среднеквадратичное отклонение составило порядка двух процентов.

Поскольку прямая и обратная зависимость состава жирных кислот и триацилглицеридов не установлена, применить общую модель множественной линейной регрессии не представляется возможным. Тем не менее, применение многофакторного анализа всегда снижает процент ошибки. В связи с этим целесообразно применять расчет количества внесенных жиров как растительного, так и животного происхождения по наборам идентификационных признаков жирно-кислотного и триацилглицеридного составов. В качестве итоговой оценки содержания жиров немолочного происхождения предлагается применять среднее

значение внесенных жиров, рассчитанное по уравнениям для жирно-кислотного и триацилглицеридного состава.

4.4 Алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением методов газовой и жидкостной хроматографии

Анализ данных полученных на модельных жировых системах с применением жиров растительного и животного происхождения, определил, что применение отдельных методик аутентификации молочного жира дает гарантированный результат в случае замены жирами немолочного происхождения более 30%. В остальных случаях заключение о подлинности жировой фазы молока и молочной продукции может быть затруднено. Это связано с вариативностью структуры жиров и влиянием технологической переработки.

Рассмотренные варианты аутентификации молочного жира демонстрируют улучшенные показатели при совместном применении, что дает обоснование для разработки алгоритма аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции с применением современных аналитических методов газовой и жидкостной хроматографии. Разработанный алгоритм измерений должен обеспечивать контрольные органы высокотехнологическими и наукоемкими способами контроля сырья и молочной продукции.

С учетом обоснованных точек контроля жировой фазы, на основании хроматографических данных, предложена схема управления контрольными методами по анализу жировой фракции молока рисунок 34.

Применение алгоритма аутентификации молочного жира позволяет использовать многофакторный анализ жировой фазы молока и молочной продукции, который учитывает три основных показателя подлинности молочного жира. Построения контрольных карт основываясь на сведениях, полученных в ходе хроматографического анализа, ускоряет обработку большого массива данных и допускает сведение показателей всех использованных методик в единую графическую модель. Применение графических моделей предоставляет возможность проводить сравнительный анализ полученных результатов с ранее

построенными контрольными картами молочного жира по принципу «отпечатков пальцев». Что способствует выявлению жиров немолочного происхождения.

Использование алгоритма аутентификации для анализа жировой фазы дает возможность проводить контроль изготовления молокосодержащей продукции. А так же проводить мониторинг молока сырья и продуктов его переработки с целью выявления фальсификации, в том числе с оценкой характера и количества внесенных жиров немолочного происхождения.

Продукция с заменителями молочного жира по регламенту не может содержать их более 50%. Поэтому контроль массовой доли немолочных жиров в составе продукта так же является необходимой процедурой оценки состава продуктов переработки молока. Этот показатель следует учитывать и при выявлении фальсификации молочной продукции.

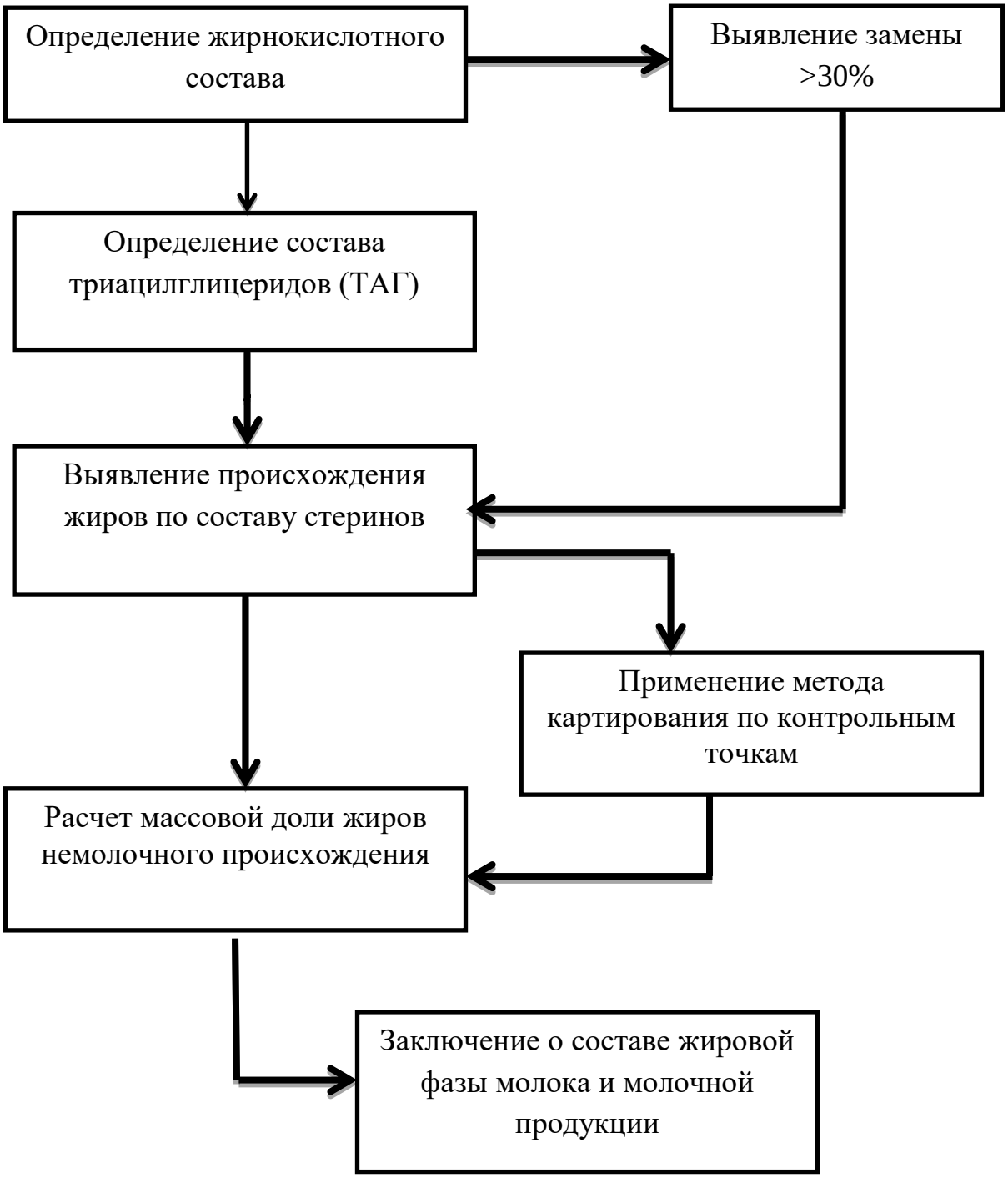


Рисунок 34 – Алгоритм аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗМЕРЕНИЯ ЖИРОВОЙ ФАЗЫ МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

Применение алгоритма аутентификации молочного жира в молоке и молочной продукции требует полноценной методической базы позволяющей провести весь комплекс аналитических мероприятий.

В данной главе рассмотрена разработка методики унифицированного способа экстракции жировой фазы молока и молочной продукции. А также разработка методик газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанные методики применялись в ходе диссертационной работы для получения экспериментальных данных.

5.1 Разработка метода экстракции жировой фазы молока и молочной продукции

Для разработки метода экстракции жировой фазы применялись образцы молочной продукции с различными физическими свойствами, такими как вязкость, степень гомогенизации и т.д. Все эти параметры влияют на способы извлечения фракции жира необходимой для дальнейшего анализа.

Для определения оптимальных характеристик экстрагента была проведена сравнительная оценка используемых способов выделения жира. В качестве определяющих факторов использовали два показателя:

- Возможность применения экстракции в образцах с содержанием воды в составе более 85% (например, молоко);
- Количество стадий выделения жировой фракции (рисунок 35).

Рисунок 35 – Характеристика способов выделения жировой фракции молока и молочной продукции

Согласно приведенной схеме оптимально использование неполярных растворителей. В качестве экстрагентов данной группы используются эфиры (петролейный или диэтиловый) или гексан,гептан.

Вторым этапом при выборе растворителя для экстракции жировой фазы молока и молочной продукции оценили влияние этой стадии на результат газохроматографического анализа состава жирных кислот.

Для этого была проведена экстракция молочного жира из пяти образцов творога жирностью 9% с применение диэтилового эфира и гексана. Результаты проведенного анализа жирных кислот отображены в таблице 26.

Таблица 26 - Влияние экстрагента на результат хроматографического анализа состава жирных кислот. (ДЭ-диэтиловый эфир; Г-гексан)

Реагенты	Содержание жирных кислот, %					
	Масляная $C_{4:0}$	Лауриновая $C_{12:0}$	Миристиновая $C_{14:0}$	Пальмитиновая $C_{16:0}$	Стеариновая $C_{18:1}$	Олеиновя $C_{18:2}$
1(ДЭ)	2,94	2,99	10,33	31,86	9,24	22,09
1(Г)	3,62	3,32	10,45	32,69	9,94	22,30
2(ДЭ)	2,75	3,20	11,01	33,77	10,22	22,54
2(Г)	3,18	3,54	11,15	34,27	10,76	23,45
3(ДЭ)	2,68	2,96	9,47	32,70	9,93	21,46
3(Г)	3,28	3,02	9,51	33,84	10,32	22,15
4(ДЭ)	2,88	3,79	12,01	31,02	11,44	20,51
4(Г)	3,44	3,88	12,22	32,86	11,93	21,04
5(ДЭ)	2,54	3,13	10,34	32,01	10,91	22,28
5(Г)	3,09	3,37	10,61	33,63	11,23	23,07

При проведении экстракции с применением диэтилового эфира наблюдается стабильное снижение содержания всех летучих жирных кислот молочного жира. Особенно сильное влияние при применении в качестве экстрагента диэтилового эфира оказывается на легколетучую масляную кислоту ($C_{4:0}$). Потери данной кислоты составляют 20-30%, тогда как остальные кислоты теряют в весе не более 7%. Это связано с переносом данных кислот в процессе отгонки эфира для получения чистой жировой фазы. В связи с этим применение гексана в качестве экстрагента обеспечивает оптимальный подход к выделению жировой фазы молока и молочной продукции.

Максимальная эффективность извлечения достигается за счет обеспечения большей площади контакта между объектом и экстрактором. Это довольно просто сделать, если объект измерения с высоким содержанием жира и имеет твердую или полутвердую консистенцию, такую как сыр. В этом случае достаточно увеличить удельную поверхность образца путем измельчения продукта. Но этот способ абсолютно не подходит для продуктов с низким содержанием жира и высокой степени гомогенизации, как например, в случае исследования жировой фазы ультрапастеризованного молока. Решением данного вопроса стало использование перемешивания исследуемого объекта с экстрагентом, что дает возможность постоянного соприкосновения «новых» частиц с растворителем. Таким образом, создается максимальная площадь соприкосновения.

Максимальная продуктивность применения интенсивного перемешивания была достигнута с использованием лабораторного блендера погружного типа. Данный вариант выделения жировой фазы обеспечивает следующие критерии:

- Наименьший расход исследуемого объекта (не более 50г.);
- Снижение расхода экстрагента (возможность многократного применения растворителя с потерей при отгонке прядка 2%);
- Время экстракции от 30секунд до 1 минуты;
- Подходит для всей группы молочной продукции.

5.2 Разработка методики «быстрой» газовой хроматографии для рутинных анализов состава жирных кислот в молоке и молочных продуктах

Для решения вопроса применения рутинного анализа жирнокислотного анализа жировой фазы молока и молочной продукции была разработана методика «быстрой» газовой хроматографии. Данная методика основана на применении нового поколения коротких капиллярных колонок, позволяющих проводить разделение и идентификацию эфиров жирных кислот.

Для проведения разделения методом «быстрой» ГХ была использована колонка ВРХ-70 (10м*0,1мм*0,20мкм). В качестве идентификационной смеси

использовали аналитический стандарт метиловых эфиров жирных кислот. А также отдельный стандарт метилдеканоата ($C_{11:0}$) Sigma-Aldrich. Для колонки SP – 2560 использовались следующие параметры хроматографического разделения: в качестве газа носителя использовали азот; температура T_1 колонки 140ºС (выдержка 5 мин), T_2 240ºС со скоростью 4гр/мин; температура температура испарителя 230ºС, детектора 260ºС; объем вводимой пробы – 1 мкл. Для проведения быстрой ГХ эмпирическим путем были установлены следующие оптимальные параметры хроматографирования: температура T_1 колонки 100ºС, T_2 240ºС со скоростью 20гр/мин; температура испарителя 230ºС, детектора 260ºС; объем вводимой пробы – 0,3 мкл.

Для управления режимами анализа, записи хроматограмм и обработки полученной информации использовалось программное обеспечение «NetChrom».

Расчет состава метиловых эфиров жирных кислот проводили методом внутренней нормализации. За окончательный результат измерений принимали среднее арифметическое значение результатов двух последовательных измерений.

Для проверки возможности использования метода быстрой хроматографии для проведения быстрых рутинных анализов жирнокислотного состава молока и молочных продуктов была проведена серия экспериментальных исследований жирных кислот одного исследуемого объекта. Для этого использовалась жировая фаза образца масла жирностью 82,5%, которая была выделена и очищена от посторонних примесей. Для подтверждения робастности применяемого аналитического метода были измерены следующие показатели: сопоставление измеряемых показателей (содержание жирных кислот в образце), где за эталонное измерение были приняты значения, полученные на «классической» колонке рекомендуемой ГОСТ, SP – 2560 100м*0,25мм ID, 0,2мкм с неподвижной фазой FFAP. Помимо этого возможности метода быстрой хроматографии оценивались путем измерения внутридневной и ежедневной повторяемости. Полученные данные отражены в таблицах 27 и 28.

Таблица 27-Значения повторяемости (RSD%), полученные на колонке BPX-70

Жирные кислоты	Время удержания		Внутридневная повторяемость		Ежедневная повторяемость	
	Мин	RSD%	W% ЖК	RSD%	W% ЖК	RSD%
Масляная ($C_{4:0}$)	0,88	0,09	2,78	1,66	2,76	2,04
Капроновая ($C_{6:0}$)	1,15	0,11	2,07	0,66	2,06	0,93
Каприловая ($C_{8:0}$)	1,65	0,07	1,31	1,43	1,30	1,7
Каприновая ($C_{10:0}$)	2,34	0,10	3,08	1,45	3,06	2,07
Деценовая ($C_{11:0}$)	2,60	0,16	0,32	1,43	0,32	2,20
Ундекановая ($C_{11:1}$)	2,74	0,16	0,07	4,84	0,07	9,45
Лауриловая ($C_{12:0}$)	3,15	0,16	3,71	6,41	3,69	9,91
Тридекановая ($C_{13:0}$)	3,56	0,16	0,13	1,05	0,13	1,89
Миристиновая ($C_{14:0}$)	3,98	0,15	11,59	1,66	11,53	1,93
Миристолеиновая ($C_{14:1}$)	4,20	0,15	1,34	1,31	1,33	1,81
Пентадекановая ($C_{15:0}$)	4,37	0,16	1,27	6,61	1,26	12,57
Пертадекановая-цис	4,57	0,17	0,28	0,75	0,28	0,93
Пальмитиновая ($C_{16:0}$)	4,78	0,15	32,06	9,61	31,76	14,74
Пальмитолеиновая ($C_{16:1}$)	4,94	0,16	2,05	2,27	1,96	2,62
Маргариновая ($C_{17:0}$)	5,14	0,15	0,64	1,92	0,63	2,65
Маргариновая цис-10($C_{17:1}$)	5,30	0,15	0,39	9,36	0,39	11,96
Стеариновая ($C_{18:0}$)	5,50	0,16	9,36	1,36	9,31	2,41
Элаидиновая ($C_{18:1}$ транс)	5,61	0,15	2,00	13,02	1,99	17,73
Олеиновая ($C_{18:1}$ цис)	5,66	0,15	21,27	3,19	21,90	3,88
Линолэлаидиновая ($C_{18:2}$ транс)	5,81	0,15	0,18	3,82	0,18	4,51
Линолевая (C18:2 цис)	5,89	0,14	2,21	12,25	2,19	13,64

Окончание таблицы 27

Гамма-линолевая ($_{C18:3n6}$)	6,05	0,13	0,04	6,63	0,04	7,43
Арахиновая ($C_{20:0}$)	6,17	0,14	0,58	13,50	0,57	15,27
Эйкозеновая цис-11 ($C_{20:1}$)	6,24	0,14	0,53	6,53	0,53	8,71
Линоленовая ($C_{18:3n3}$)	6,49	0,13	0,04	7,32	0,04	10,41
Генэйкозановая ($C_{21:0}$)	6,56	0,13	0,01	2,22	0,01	3,15
Эйкозадиеновая ($C_{20:2}$)	6,71	0,11	0,06	2,93	0,06	4,09
Бегеновая ($C_{22:00}$)	6,82	0,13	0,16	3,15	0,16	7,25
Эйкозатетраеновая (C20:3n6)	6,96	0,14	0,02	4,42	0,01	4,86
Эруковая (C22:1)	7,09	0,14	0,06	9,09	0,06	9,76
Эйкозатетраеновая (C20:3n3)	7,21	0,10	0,03	5,92	0,01	6,69
Арахидоновая ($C_{20:4n6}$)	7,37	0,08	0,01	11,16	0,01	12,63
Трикозодиеновая ($C_{23:0}$)	7,39	0,06	0,03	10,92	0,03	12,06
Докозадиеновая ($C_{22:2}$)	7,49	0,06	0,04	12,24	0,04	17,07
Лигноериновая ($C_{24:0}$)	7,57	0,04	0,01	14,45	0,01	18,91
Эйкозапентаеновая ($C_{20:5n3}$)	7,81	0,04	0,05	8,45	0,05	11,24
Селахолевая ($C_{24:1}$)	8,09	0,03	0,07	11,05	0,07	13,62
Докозогексаеновая ($C_{22:6n3}$)	8,44	0,03	0,00	11,89	0,00	14,77

Таблица 28 - Значения повторяемости (RSD%), полученные на 100-метровой колонке SP-2560

Жирные кислоты	Время удержания		Внутридневная повторяемость		Ежедневная повторяемость	
	Мин	RSD%	W% ЖК	RSD%	W% ЖК	RSD%
Масляная ($C_{4:0}$)	9,54	0,08	2,79	1,53	2,83	1,97
Капроновая ($C_{6:0}$)	10,15	0,13	2,08	0,65	2,11	0,24
Каприловая ($C_{8:0}$)	11,25	0,07	1,31	1,39	1,33	1,98
Каприновая($C_{10:0}$)	13,10	0,09	3,09	1,58	3,13	2,30

Продолжение таблицы 28

Деценовая ($C_{11:0}$)	14,19	0,15	0,32	1,46	0,33	2,51
Ундекановая ($C_{11:1}$)	14,43	0,16	0,08	4,91	0,08	7,24
Лауриловая ($C_{12:0}$)	15,88	0,15	3,72	6,24	3,77	8,48
Тридекановая ($C_{13:0}$)	18,55	0,16	0,13	0,99	0,13	1,05
Миристиновая ($C_{14:0}$)	19,41	0,14	11,64	1,73	11,79	1,35
Миристолеиновая ($C_{14:1}$)	20,93	0,13	1,35	1,28	1,36	1,78
Пентадекановая ($C_{15:0}$)	21,38	0,18	1,28	6,18	1,29	10,75
Пертадекановая-цис	22,41	0,17	0,28	0,99	0,29	0,62
Пальмитиновая ($C_{16:0}$)	23,40	0,15	32,07	9,75	31,90	12,79
Пальмитолеиновая ($C_{16:1}$)	24,51	0,13	1,98	2,82	2,00	2,44
Маргариновая ($C_{17:0}$)	25,35	0,15	0,64	1,96	0,65	2,14
Маргариновая цис-10($C_{17:1}$)	26,36	0,17	0,39	9,57	0,40	11,77
Стеариновая ($C_{18:0}$)	27,39	0,15	9,40	1,08	9,52	1,93
Элаидиновая ($C_{18:1\ транс}$)	28,02	0,15	2,01	15,45	2,04	17,83
Олеиновая ($C_{18:1}$ цис)	28,21	0,16	21,30	3,64	20,87	3,04
Линолэлаидиновая ($C_{18:2}$ транс)	28,78	0,15	0,18	3,89	0,18	4,66
Линолевая ($C_{18:2}$ цис)	29,66	0,12	2,05	12,06	2,08	13,13
Гамма-линолевая ($C_{18:3n6}$)	29,95	0,13	0,04	6,41	0,04	7,74
Арахиновая ($C_{20:0}$)	30,79	0,14	0,58	13,96	0,59	15,60
Эйкозеновая (цис-11) ($C_{20:1}$)	31,05	0,16	0,53	6,51	0,54	8,49
Линоленовая ($C_{18:3n3}$)	31,49	0,12	0,04	7,93	0,04	9,29
Генэйкозановая ($C_{21:0}$)	31,80	0,11	0,01	2,91	0,01	3,01
Эйкозадиеновая ($C_{20:2}$)	32,24	0,13	0,06	2,39	0,06	4,35
Бегеновая ($C_{22:00}$)	32,67	0,10	0,16	5,66	0,16	7,66
Эйкозатетраеновая ($C_{20:3n6}$)	32,90	0,12	0,02	4,42	0,02	4,14
Эруковая($C_{22:1}$)	33,25	0,13	0,06	9,26	0,06	9,91

Окончание таблицы 28

Эйкозатетраеновая ($C_{20:3n3}$)	33,53	0,10	0,01	5,45	0,01	6,94
Арахидоновая($C_{20:4n6}$)	33,69	0,06	0,01	11,84	0,01	12,27
Трикозодиеновая($C_{23:0}$)	34,02	0,07	0,03	10,11	0,03	12,30
Докозадиеновая($C_{22:2}$)	34,35	0,06	0,04	14,73	0,04	17,76
Лигноериновая($C_{24:0}$)	34,84	0,03	0,01	15,46	0,01	18,22
Эйкозапентаеновая($C_{20:5n3}$)	42,07	0,04	0,05	8,94	0,05	11,83
Селахолевая($C_{24:1}$)	45,76	0,03	0,07	11,60	0,07	13,82
Докозогексаеновая($C_{22:6n3}$)	49,07	0,05	0,01	11,31	0,001	14,67

Как показывают таблицы, внутридневная повторяемость времени удерживания компонентов двух капиллярных колонок составляет 0,25%. Также была изучена сопоставимость количественных данных по измерению состава жирных кислот двух колонок с оценкой суточной и ежедневной повторяемости. Согласно данным в таблицах, погрешность измерения между двумя столбцами составляла не более 2,7%.

Кроме того, близость значений двух хроматографических подходов оценивали путем добавления различных количеств деценовой кислоты ($C_{11:0}$).

Процент восстановления, показанный в таблице 29, показал, что показатели точности BPX-70 и SP-2560 практически совпадают. Фактический средний процент восстановления на BPX-70 составил 100,05%, а на SP-2560 - 100,22.

Были также исследованы показатели линейности детектора, рассчитанные при 9 возрастающих концентрациях C11: 0, показатель BPX-70 был $R^2 = 0,9999$, в то время как на SP-2560 этот показатель был равен $R^2= 0,9874$(рисунок 36 и 37).

Нижние пределы обнаружения и количественные значения также показывают сходные свойства для двух хроматографических колонок. Данные, полученные для колонки BPX-70, составляли 0,21 и 0,67 мг / кг, а для колонки SP-2560 - 0,19 и 0,65 мг/кг.

Таблица 29-Процент восстановления метилдеканоата ($C_{11:0}$) в масле (n = 5) на колонках BPX-70 и SP-2560

Внесенная концентрация (мг/мл)	Колонка 10 м BPX-70		Колонка 100 м SP-2560	
	Измеренная концентрация (мг/мл)	%, восстановления	Измеренная концентрация (мг/мл)	%, восстановления
0,50	0,51	102,21	0,49	96,08
0,75	0,73	97,09	0,74	101,34
1,00	1,01	100,93	1,03	103,00
1,25	1,25	100,00	1,25	100,00
1,50	1,50	100,00	1,51	100,67
%, восстановления среднее значение		100,05	%, восстановления среднее значение	100,22

Для каждой капиллярной колонки изучалось влияние температурного программирования, а также оптимальная хроматографическая модальность, качественная и количественная оценка разработанного аналитического метода. Порядок элюции жирных кислот был характерен для этих колонок. Время анализа для сложной композиции жирных кислот составляло 49,07 минуты для колонки SP-2560 и 8,44 минуты для колонки BPX-70. Капиллярная колонка BPX-70 показала отличные аналитические характеристики при оптимизации и валидации «быстрого» метода ГХ и может быть эффективно использована для быстрого и регулярного анализа состава жирных кислот жирной фазы молока и молочных продуктов.

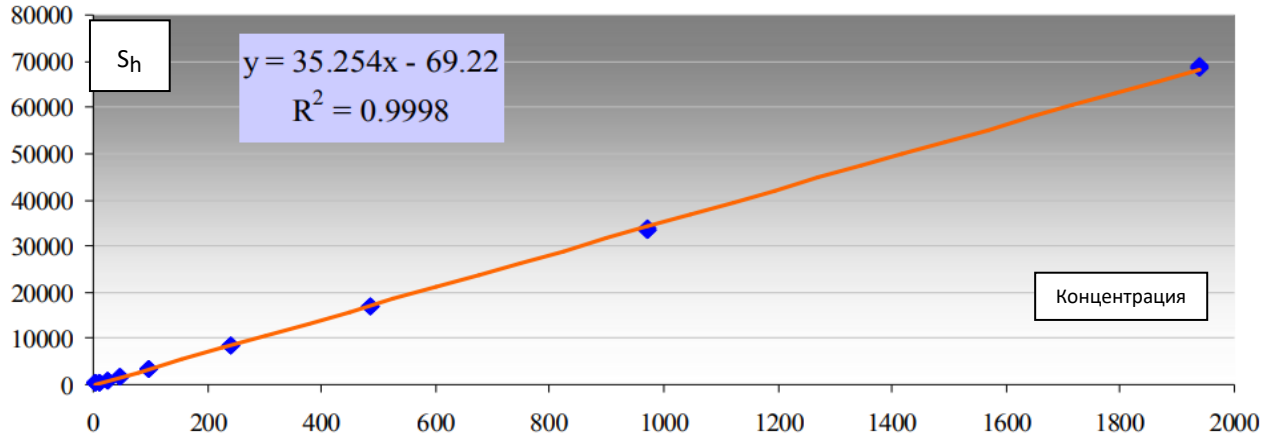


Рисунок 36- Показатели линейности детектора для колонкиВРХ - 70

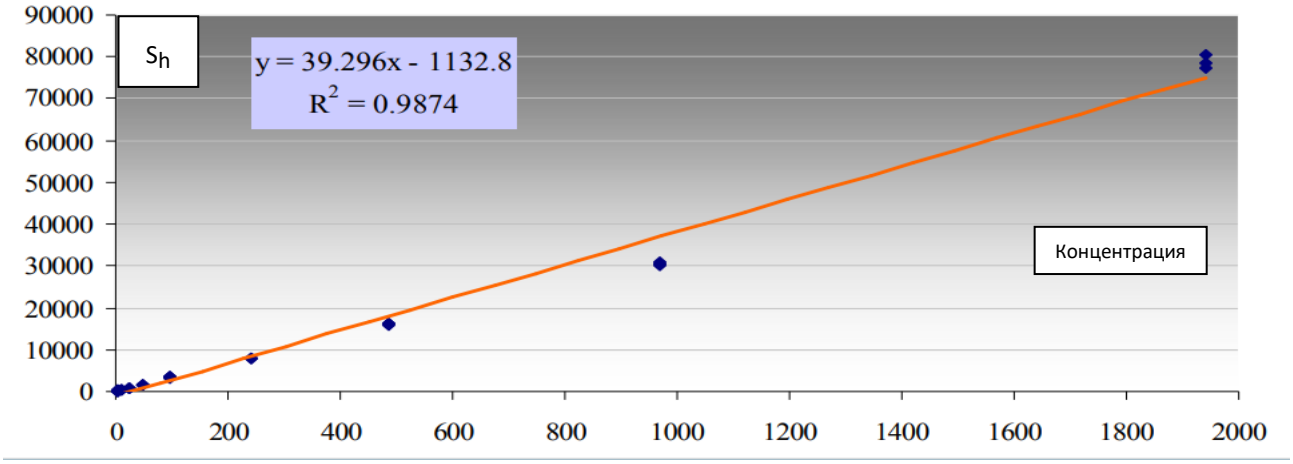


Рисунок 37 - Показатели линейности детектора для колонки SP-2560

5.3 Разработка методики определения состава стеролов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Стерины относятся к неомыляемым компонентам молочных липидов, поэтому экстракцию фракции стеринов из компонентов молочного матрикса осуществляли омылением спиртовой смесью гидроксида калия с последующей экстракцией. Общее время подготовки образца составляет 1-1,5 часа. Степень извлечения стеролов составляла> 98%.

При выборе условий для хроматографического анализа были изучены различные варианты смесей подвижной фазы состава ацетонитрил/вода. Скорость потока варьировалась в пределах 1-2 $см^3$ / мин. Наилучшие параметры хроматографического разделения были получены с использованием

изократического элюирования смесью подвижная фаза ацетонитрил / вода (95/5) при скорости потока $см^3$ / мин, температура колонного термостата 30ºС.

Хроматографическая система считается подходящей, если наблюдаются два фактора: а) разрешение между пиками не ≥ 1. б) коэффициент асимметрии пика стремится к 1.

Основные параметры, рассчитанные по хроматограммам раствора аналитических стандартов на стерины, приведены в таблице 30.

Результаты измерений позволяют оценить способность хроматографической системы определять состав стеринов в жировой фазе молока и молочных продуктов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Таблица 30- Параметры хроматографического анализа смеси аналитических стандартов стеролов.

Параметры	Наименование аналитических стандартов стеролов				
	Холестерол	Брасикстерол	Кампастерол	Стигмастерол	β-ситостерол
Фактор ассиметрии	0,93	0,94	0,95	0,97	0,91
Время удерживания	12,74	16,37	23,14	25,98	32,61
Число теоретических тарелок	8673	9169	9365	9515	8260
Коэффициент разрешения	1,3	1,3	1,5	1,3	1,9

Валидацию методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость, аналитическая область.

Специфичность методики оценивали путем анализа образца растительного масла на отсутствие пика холестерола, и образца молочного жира на отсутствие фитостеролов. Соответствующие хроматограммы приведены на рисунках 38 и 39.

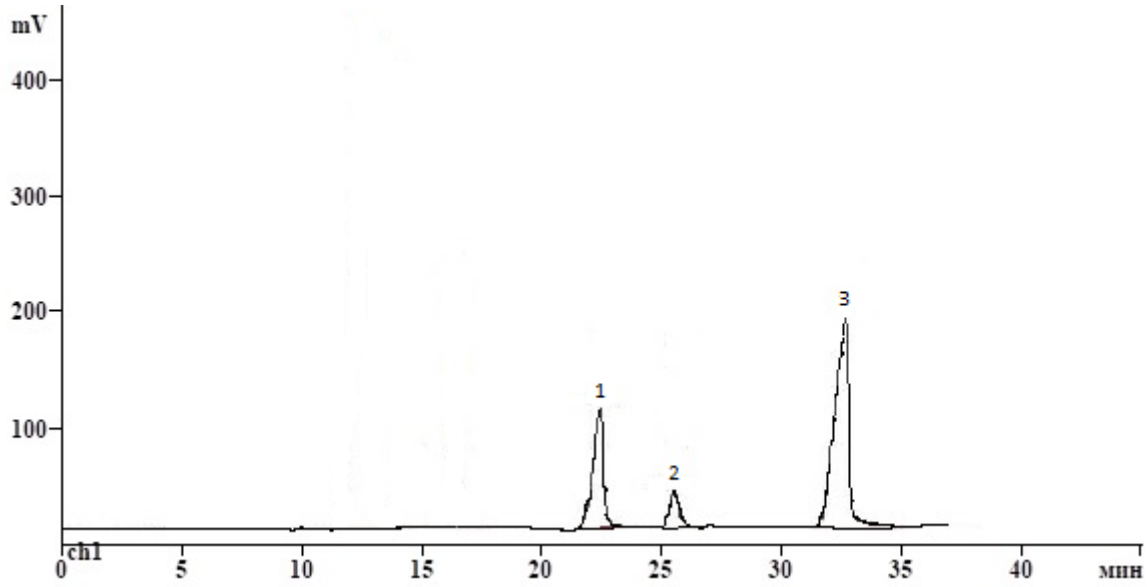


Рисунок 38 – Хроматограмма образца растительного масла 1-Кампастерол 2-Стигмастерол 3- β-ситостерол

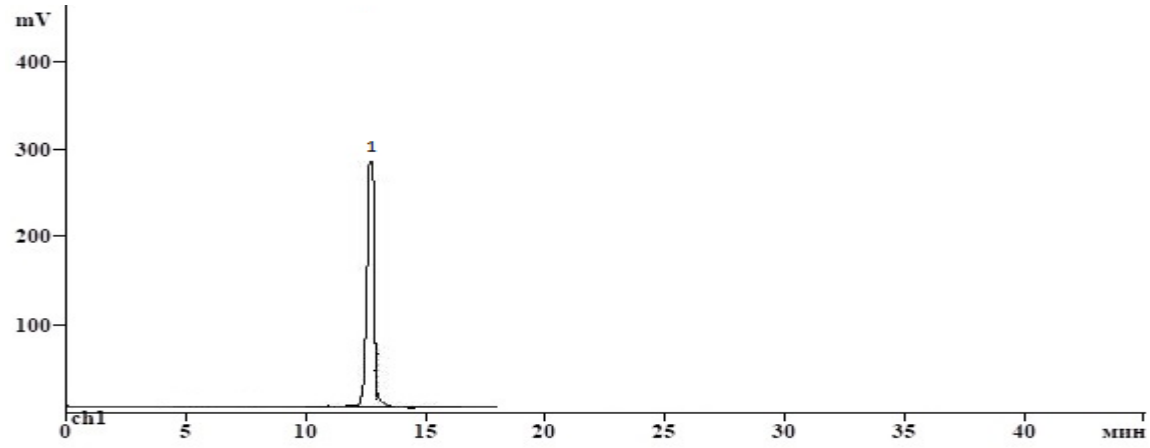


Рисунок 39- Хроматограмма образца молочного жира.1-Холестерол

На хроматограмме растительного жира не наблюдается пика со временем удерживания соответствующего холестерину. На хроматограмме молочного жира отсутствуют пики со временем удерживания характерным для фитостеринов. Что экспериментально подтверждает отсутствие влияния сопутствующих компонентов на результат хроматографического анализа.

Линейность методики анализировали образцы аналитических стандартов стеролов, содержащие 0,1; 0,5; 5; 50; 100 и 200,0 мг/100г основного вещества в растворе. Экспериментальные данные были обработаны с использованием линейной модели, методом наименьших квадратов. Полученные значения площади пиков в диапазоне от 0,1мг/100г до 200,0 мг/100г линейно зависят от концентрации. Коэффициент корреляции для всех аналитических стандартов стеролов составил 0,99.

Для оценки правильности методики проводили анализ образцов растительного жира с внесением аналитического стандарта холестерола и образцов животного жира с внесением стандартов фитостеринов. Содержание вносимых аналитических стандартов было 0,5; 50; 200 мг/100г. Для каждого образца проводили девять определений, включающие все стадии методики. Анализ правильности оценивали по критерию открываемости определяемого вещества R, который вычисляли по формуле: R= (обнаружено аналита / внесено аналита)*100. Результаты оценки представлены в таблице 31.

Таблица 31- Результаты оценки методики (n=9, p<0,95)

Внесено, мг/100г	Обнаружено, мг/100г	Открываемость R, %
0,500	0,505	101,0
0,500	0,504	100,8
0,500	0,507	101,4
50,00	49,51	99,0
50,00	49,63	99,2
50,00	49,34	98,6
200,00	200,91	100,9
200,00	200,63	100,6
200,00	200,82	100,8
Среднее значение, %		100,26

Окончание таблицы 31

Стандартное отклонение SD, %	1,03
Относительное стандартное отклонение RSD, %	1,02
Доверительный интервал среднего значения, %	99,59-100,93

По результатам, полученным в одинаковых условиях в течение короткого промежутка времениоценивали повторяемость методики. Анализ проводился для основных стеринов животного и растительного жиров – холестерола и β - ситостерола. Результаты 6 параллельных испытаний в таблице 32.

Таблица 32-Результаты оценки повторяемости методики (С=5,0 мг/г, n=6, p<0,95)

	Результаты мг/100г	Среднее значение мг/100г	Стандартное отклонение SD, %	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Доверительный интервал среднего значения
ХОЛЕСТЕРОЛ	4,95	4,95	0,02	0,40	4,93-4,97
	4,98				
	4,96				
	4,92				
	4,93				
	4,94				
β - СИТОСТЕРОЛ	4,97	4,94	0,02	0,40	4,92-4,96
	4,93				
	4,94				
	4,91				
	4,95				
	4,96				

Относительное стандартное отклонение не превышает 2,0%, что отвечает требованиям к методикам высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Поскольку содержание стеролов в жировых композициях может изменяться в зависимости от состава, то область методики устанавливали по диапазону экспериментальных данных.

Разработанная методика была апробирована на лабораторных образцах, отклонение результатов от фактических значений, полученных с использованием разработанной методики, не превышает 3%.

Результаты валидации методики контроля содержания стеролов в составе жировой фазы молока и молочной продукции подтверждают возможность её применения.

Разработана методика определения состава стеролов методом обращено-фазовой ВЭЖХ. Пригодность методики подтверждена соответствием основных валидационных характеристик – специфичности, линейности, правильности, аналитического диапазона – критериям приемлемости.

Методика была одобрена в ТК и принята Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 августа 2018 г. №111-П по результатам голосования в АИС МГС). Ей присвоен номер ГОСТ 34456-2018.

5.4 Разработка методики определения триацилглицеридного состава молока и молочной продукции методом газовой хроматографии

Разделение и идентификацию состава триацилглицеридов осуществляли с применением метода газовой хроматографии с использованием хроматографа, снабженного пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой с неподвижной фазой состава 65% фенилметилсиликон.

Эмпирическим путем были подобраны следующие параметры хроматографического разделения: в качестве газа носителя использовали водород; температура T_1 колонки 100ºС, T_2 360ºС со скоростью 5гр/мин; температура испарителя 320ºС, детектора 370ºС; объем вводимой пробы – 0,5 мкл.

Интегрирование полученных результатов должны была соответствовать двум важным критериям. Первым критерием стало разделение семейств

триглицеридов согласно количеству атомов углерода, а вторым критерием является возможность выявления внутренней структуры каждого триглицерида.

Для калибровки использовался стандартный материал молочного жира CRM 519 с известным составом триглицеридов. Используя данный стандартный образец, было выделено 16 семейств триглицеридов состава C_{24}-C_{54}. Так же была отработана возможность установления второго критерия по разделению семейств триглицеридов на составляющие характерные для их внутренней структуры. Хроматограмма разделения триглицеридов молочного жира представлена на рисунке 40.

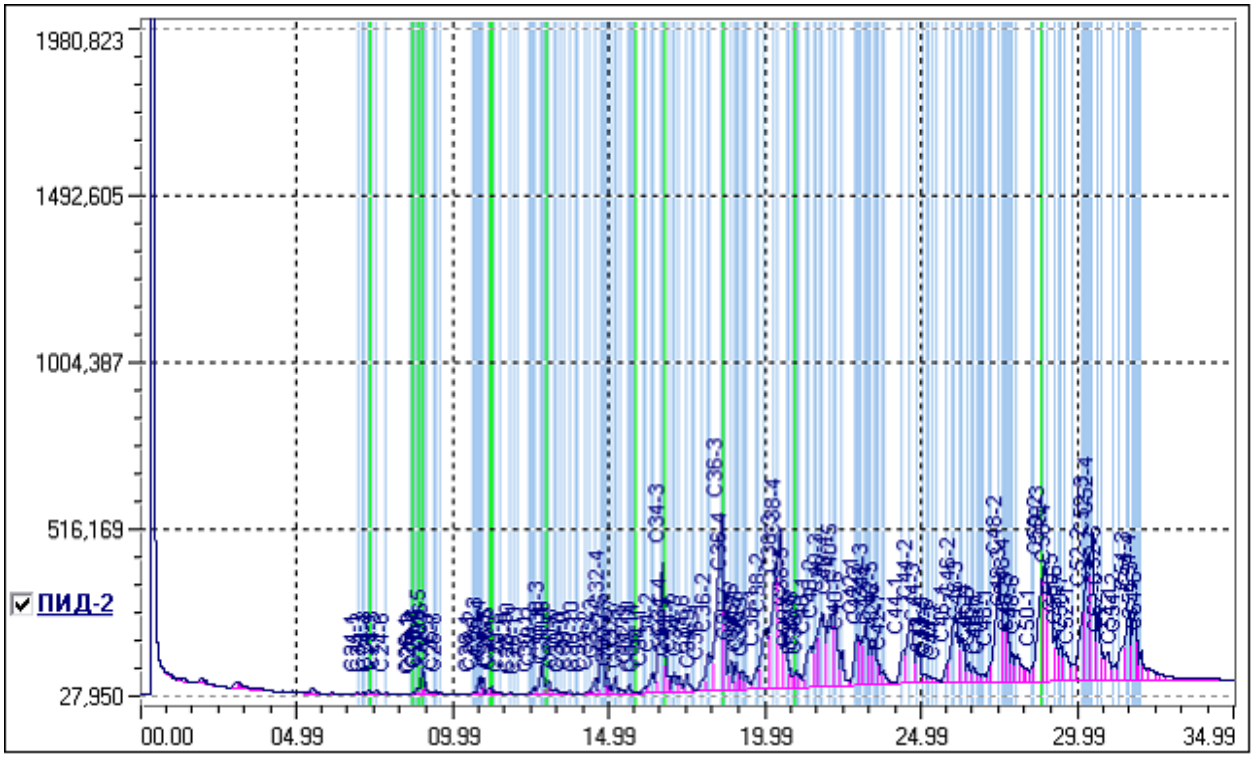


Рисунок 40 - Хроматограмма триацилглицеридов молочного жира

После завершения этапа изучения параметров хроматографического разделения и идентификации состава триацилглицеридов, была проведена валидация применяемой методики. Которую проводили по следующим характеристикам: повторяемость и стабильность.

Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории в течение

короткого промежутка времени. Результаты 10 параллельных измерений приведены в таблице 33.

Таблица 33- Результаты оценки повторяемости методики (n=10, p<0,95)

Семейства триацилглицеридов	Среднее значение	Стандартное отклонение SD, %	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Доверительный интервал среднего значения
C_{24}	0,171	0,003	1,76	0,16-0,17
C_{26}	0,815	0,015	1,91	0,80-0,82
C_{28}	1,07	0,020	1,88	0,93-1,21
C_{30}	1,65	0,025	1,51	1,63-1,67
C_{32}	3,06	0,033	1,08	3,04-3,08
C_{34}	6,63	0,096	1,45	6,58-6,68
C_{36}	12,33	0,136	1,10	12,22-12,44
C_{38}	14,66	0,228	1,56	14,57-14,75
C_{40}	13,03	0,28	1,98	12,90-13,16
C_{42}	12,3	0,192	1,56	12,22-12,38
C_{44}	4,87	0,074	1,53	4,82-4,92
C_{46}	5,25	0,089	1,69	5,18-5,32
C_{48}	7,79	0,125	1,84	7,72-7,86
C_{50}	8,68	0,138	1,59	8,59-8,77
C_{52}	7,76	0,142	1,83	7,67-7,85
C_{54}	3,67	0,072	1,96	3,63-3,71

Относительное стандартное отклонение RSD, % не превышает 2%, что говорит о пригодности хроматографической методики.

Оценку стабильности определяли на образцах молочного жира. Образцы в растворенном виде были помещены в различные условия хранения:

- при комнатной температуре (20±2°C);
- морозильная камера (-18-24°C);

- холодильная камера (+3-6°C).

Образцы анализировали через 24 часа. Также образцы были подвергнуты троекратному циклу разморозки и заморозки в течение 8 часов с последующим анализом. Образцы из той же серии анализировали сразу после процедуры приготовления. Анализ стабильности показал, что отклонения полученных значений концентраций изменяются в пределах от 0,29 до 2,31% и соответствуют требованиям (не более 10%). Что свидетельствует о стабильности образцов в течение 24 часов при многократном замораживании и размораживании, а также при хранении в холодильнике и при комнатной температуре.

Разработана методика анализа состава триацилглицеридов молока и молочной продукции. Пригодность методики подтверждена валидационными характеристиками для хроматографических разделений.

Разработанная методика рекомендована для включения в нормативную документацию в качестве способа определения триацилглицеридного состава молока и продуктов его переработки.

5.5 ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. Теоретически обоснована необходимость разработки алгоритма комплексной оценки жировой фазы молока и молочной продукции для аутентификации жировой фазы молока и молочной продукции.
2. Набранный массив статистических данных по определению жирно-кислотного и триглицеридного состава жировой фазы молока сырого позволил установить диапазоны содержания жирных кислот и триглицеридного состава с учетом региональных и сезонных особенностей. Установлены различия содержания ряда жирных кислот от установленных норм, в частности для пальмитиновой жирной кислоты (фактическое значение содержания составляет 28-30%), фактическое содержание олеиновой жирно кислоты было определено в 22,0-24,0%, тогда согласно нормированию допускается значение 32%.
3. Выявлено, что наибольшим изменениям содержания подвержены масляная ($C_{4:0}$) и линолевая ($C_{18:2}$) жирные кислоты как в процессе сквашивания, так и при термическом воздействии. Отмечено снижение содержание данных жирных кислот до 20-27% от начальной концентрации.
4. На модельных жировых системах установлена зависимость изменений триацилглицеридного и жирно-кислотного состава при внесении в различных соотношениях жиров немолочного происхождения. Определены контрольные точки идентификации жиров растительного и животного происхождения с применением метода газовой хроматографии. Разработаны формулы расчета массовой доли жиров немолочного происхождения в составе жировой фазы молока и молочной продукции по жирно-кислотному составу и составу триацилглицеридов.
5. Установлены идентификационные показатели жирно-кислотного и триглицеридного состава жировой фазы молока, на основе которых разработан алгоритм комплексной оценки жировой фазы молока и молочных продуктов.

6. Разработаны методики измерений оценки жировой фазы молока и молочных продуктов с применением метода газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. На основе разработанных методик измерений осуществлена последующая их стандартизация: ГОСТ 32915-2014 «Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии»; ГОСТ 34456-2018 «Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»; Проект ГОСТ Р «Молоко и молочная продукция. Идентификация жировой фазы молока». Разработана методика измерений с применением метода «быстрой» газовой хроматографии для анализа состава жирных кислот в жировой фазе молока и молочной продукции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

МЖ – молочный жир

ПМ – пальмовое масло

КМ – кокосовое масло

ГЖ – говяжий жир

ГОСТ – государственный стандарт

НД – нормативная документация

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов, А.А. Пальмовое масло и его роль в производстве продуктов питания/ А.А. Анисимов, В.Ю. Румянцев // Масложировая промышленность. – 2002. – №2. – С. 22-24.
2. Арсеньева, Т.П. Физико-химические основы производства масла с комбинированным жиром/ Т.П. Арсеньева// Сыроделие и маслоделие. – 2005. – №1. – С. 39-44.
3. Технология переработки жиров/Арутюнян, Н.С., Корнена Е.П., Янова А.И. и др. / Под ред. // Пищепромиздат. – 1998. – 452 с.
4. Атраментова, В.Г. Изменение кислотного состава молочного жира / В.Г. Атраментова // Молочная промышленность. – 1983. – № 9. – С. 32-34.
5. Ашряпова, А.Х. Организация и проведение экспертизы и оценки качества продовольственных товаров (учебное пособие) / А.Х. Ашряпова. – М.: КНОРУС, 2018. – 120 с.
6. Букин, Ю.В. Незаменимые жирные кислоты: природные источники, метаболизм, физиологические функции и значение для здоровья – Москва, 1999. – 140 с.
7. Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза /Беккер, Ю. под ред. Курганова, А.А.//– М.:ТЕХНОСФЕРА, 2009. – 468 с.
8. Боев, А.И.Способ идентификации сливочного масла методом газовой хроматографии / А.И. Боев, С.Ю. Никитина, К.К. Полянский // Сыроделие и маслоделие. – 2001. – №2. – С. 42-43.
9. Берчфилд, Г. Газовая хроматография в биохимии / Г. Берчфилд, Э. Сторрс ; ред. К. В. Чмутов . – М. : Мир, 1964 . – 620 с.
10. Бегунов, А.А. Метрологические основы аналитики / А.А. Бегунов – СПб: РИМ, 2004 – 416 с.
11. Бережная, И.Ю. Фальсификация потребительских товаров / Бережная И.Ю., Калачян М.Г., Чернова Н.В. // 3 Общероссийская студенческая электронная

науч. - практ. конф., 08.июн. 2011., Академия естествознания – Москва: Типография Академии Естествознания, 2011 – №7 – С.79-80.

12. Белов, А. С. Тренды молочного рынка: вчера и сегодня / А. С. Белов // Переработка молока. – 2015. – № 12. – С. 32-35.
13. Бурыкина, И.М. Выявление посторонних веществ в молоке - сырье / Бурыкина И.М.// Молочная промышленность – 2008 – №2 – С.7-8
14. Виттенберг, А.Г. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. Парофазный анализ и родственные методы / А.Г. Виттенберг, Б.В. Иоффе. – Л.: Химия, 1982. – 279 с.
15. Вышемирский, Ф.А. и др. Масло с комбинированной жировой фазой — аналог коровьего// Всероссийская НТК «Прогрессивные технологии и оборудование пищевых производств» (тезисы докладов). С.Петербург. – 1999. – С.35-37.
16. Вышемирский, Ф.А. Масло из коровьего молока и комбинированное / Ф.А. Вышемирский. – Спб.: ГИОРД, 2004. – 720 с.
17. Верещагин, А.Г. Биохимия триглицеридов / А.Г. Верещагин. – М.: Наука, 1972. – 306 с.
18. Геккелер, К. Аналитические и препаративные лабораторные методы/ К. Геккелер, Х. Экштайн. – М.: Химия, 1994. – 164 с.
19. Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К.Горбатова – СПб: ГИОРД, 2003. – 320 с.
20. Горбатова, К.К. Химия и физика молока / К.К. Горбатова. – СПб.: ГИОРД, 2003. – 288 с.
21. ГОСТ 51483-99 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. – М.:Стандартинформ, 1999. - 7с.
22. Грачев, Ю. П. Математические методы планирования экспериментов / Ю. П. Грачев – М.: Пищевая промышленность, 1997. – 200 с.
23. ГОСТ 34456-2018 Определение состава стеринов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. – М.:Стандартинформ, 2018. - 7с.

24. ГОСТ 33490-2015 Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. – М.:Стандартинформ, 2015. – 13 с.
25. ГОСТ 31979-2012 Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринов. – М.:Стандартинформ, 2012. – 9 с.
26. ГОСТ 31663-2012 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот**.** – М.:Стандартинформ, 2012. – 8 с.
27. ГОСТ 31665-2012 Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. – М.:Стандартинформ, 2012. – 6 с.
28. ГОСТ 30418-96 Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. – М.:Стандартинформ, 1996. – 5 с.
29. ГОСТ 32915-2014 Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии. – М.:Стандартинформ, 2014. – 9 с.
30. ГОСТ 32189-2013 Маргарины, жиры для кулинарии, кондитерской, хлебопекарной и молочной промышленности. Правила приемки и методы контроля. – М.:Стандартинформ, 2014. – 4 с.
31. ГОСТ Р 52253-2004 Масло и паста масляная из коровьего молока. Общие технические условия. – М.:Стандартинформ, 2004. – 21 с.
32. Денисова, С.А. Пищевые жиры / С.А.Денисова, Т.В. Пилипенко. – М.:ОАО «Издательство Экономика», 1998. – 79с.
33. Дворкин, В.И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа/ В.И. Дворкин – М.: Химия, 2001. – 263 с.
34. Дмитриченко, М.И. Товароведение и экспертиза пищевых жиров, молока и молочных продуктов / М.И. Дмитриченко, Т.В. Пилипенко. – СПб.: Питер, 2004. – 352с.

35. Зайцева, Л.В. Новая эра: заменители молочного жира по ГОСТу / Л.В. Зайцева // Переработка молока. – 2011. – № 4. – С. 20-21.
36. Заяц, Н. И.О-64 Организация и технология испытаний промышленной продукции: Лабораторный практикум: учеб. - метод. пособие для студентов специальности 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» специализации 1-54 01 03 02 «Сертификация продовольственных товаров» / Н. И. Заяц. – Минск: БГТУ, 2010. – С.142
37. Зобкова, З.С. Растительные жиры в молочных продуктах /З.С. Зобкова, С.К. Кутилина// Молочная промышленность. – 1999. – №1 – С. 13-16.
38. Итоги 2008 г.: состояние и перспективы развития // Масложировая промышленность. – 2009. – №3. – С. 4-5.
39. Инюкина, Т.А. Контроль качества и безопасности сырого молока./ Инюкина Т.А. Гугушвили Н.Н // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Задачи и направления развития молочной отрасли в контексте реализации «Доктрины продовольственной безопасности РФ» – Адлер, 2009. – С.37-39.
40. Калашнова, Т.В. Вопросы выявления фальсифицированной и контрафактной продукции. /Калашнова Т.В., Карташова Л.Г.// Экологическая, продовольственная и медицинская безопасность человечества: материалы Первого Международного конгресса – М.: ФГБОУ ВПО «РЭУ им.Г.В.Плеханова», 2011. – С. 265-268.
41. Кирилова Л.Г.Метод определения фальсификации сливочного масла/ Л.Г. Кирилова, М.Б. Алесюк, Л.В. Батищева // Переработка молока – 2005. – №1. – С.14.
42. Корнева, Е.П.Экспертиза масел, жиров и продуктов их переработки. Качество и безопасность / Е.П. Корнева, С.А. Калманович, Е.В. Мартовщук, Л.В. Терещук, В.И. Мартовщук, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007. – 272 с.

43.Касторных, М.С. Товароведение и экспертиза пищевых жиров, молока и молочных продуктов/ М.С. Касторных, В.А. Кузьмина, Ю.С. Пучкова. – М.: Академия, 2003. – 288 с.

44.Коваленко, Д.Н. Фальсификация молока и молочных продуктов. / Д.Н. Коваленко // Переработка молока – 2011. – №3. – С.8-11.

45. Крусь, Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина. – М.: Колос. – 2000. – 368 с.

46.Курченко, В.П. Методы идентификации и контроля / В.П. Курченко, Н.В. Гавриленко, Т.Н. Головач // Переработка молока – 2009. – №8 – С.58-60.

47.Лапина, Г.П. Новые инновационные методы и подходы для обеспечения безопасности некоторых продтоваров. / Г.П. Лапина, В.В. Суворов, К.Г. Ипполитов, В.А. Волков// Экологическая, продовольственная и медицинская безопасность человечества: материалы Первого Международного конгресс.: в 2ч. – ч.1 – М.: ФГБОУ ВПО «РЭУ им. Г.В. Плеханова», 2011 – С. 335-337.

48.Лепилкина, О.В. Методы установления фальсификации жировой фазы продуктов / О.В. Лепилкина, Л.И. Тетерева// Сыроделие и маслоделие. – 2009. – №9. – С. 13-14.

49.Лабораторный практикум по химии жиров / Н.С. Арутюнян, Е.П. Корнена, Е.В. Мартовщюк и др. – СПБ.: ГИОРД, 2004. – 264 с.

50.Лишаева, Л.Н. Современное состояние Российского рынка растительных масел и жиров / Л.Н. Лишаева, Т.Н. Турчина, О.В. Кирилова, Н.И. Назарова // Масла и жиры. – 2009. – №2. – С. 13-16.

51.Матисон, В.А.Особенности фальсификации /В.А. Матисон, П.Б. Авчиева, Т.В. Тулякова, Е.Л. Беленко // Пищевая промышленность. – 2010. – №5. – С. 20-21.

52.Методические указания по оценке подлинности и выявлению фальсификации молочной продукции. МУ 4.1./4.2.2484-09/ Федеральная служба по надзору в свете защиты прав потребителей – М.: 2009. – 26 с.

53.МУК 4.1/4.2.2484-09 «Методы контроля. Химические и микробиологические факторы. Оценка подлинности и выявление фальсификации молочной

продукции», утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 11.09.2009 г.

54. Николаева М.А. Идентификация и фальсификация пищевых продуктов / М.А. Николаева, Д.С. Лычников, А.Н. Неверов. – М.: ОАО «Издательство Экономика», 1998. – С. 84-95.

55. Николаева, Е.А. Сезонные изменения состава, свойств молока и качества сыра / Е.А. Николаева, М.С. Уманский // Современные пищевые технологии. – 2011. – №3. – С.81 - 83.

56. Новые жировые продукты повышенной биологической ценности отечественного производства / М.П. Азнаурьян, Н.А. Калашева, А.Г. Анисимова и др.// Масложировая промышленность. – 1999. – №3. – С. 22.

57. Оносовская, Н.Н. Идентификация молока и молочной продукции/ Н.Н. Оносовская // Сыроделие и маслоделие. – 2011. – №3. – С. 13-14.

58. О'Брайен, Р. Жиры и масла. Производство, состав и применение / Р. О'Брайен. – СПб: Профессия, 2007. – 752 с.

59. Пешук, Л.В. Сравнительный анализ жирнокислотного состава традиционных и экзотических видов сырья / Л.В. Пешук, И.Г. Радзиевская, В.А. Кищенко, И.В. Левчук// Хранение и переработка сельхоз сырья. – 2011. – №7. – С. 29-33.

60. Пищевая химия / Под Ред. Нечаева, А.П. – СПб.: ГИОРД. – 2001. – 580 с.

61. Полянский, К.К. Определение жирнокислотного состава молочного жира и его фальсификации /К.К. Полянский, Л.В. Голубева, О.И. Долматова //Сыроделие и маслоделие. – 2002. – №1. – С.10.

62. Рудаков, О.Б. Развитие метода интерпретации хроматограмм животных жиров / О.Б. Рудаков, К.К. Полянский // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. – №10. – С. 40-42.

63. Рудаков, О.Б. Качественная идентификация молочного жира по хроматографическим данным/О.Б. Рудаков, К.К. Полянский, М.Л. Алесюк // Журнал аналитической химии. – 2002. – №12. – С. 1267-1275.

64. Рудаков, О.Б. Жиры. Химический состав и экспертиза качества / О.Б. Рудаков, А.Н. Пономарев, К.К. Полянский, А.В. Любарь. – М.: ДеЛи принт, 2005. – 312 с.

65. Рудаков, О.Б., Полянский К.К., Ходырева О.Е. Инулин контроль и содержание в продукции / О.Б. Рудаков, К.К. Полянский, О.Е. Ходырева // Переработка молока. – 2017. – №2. – С. 44-47.

66. Сарсембаев, Х.С. Функциональный продукт на основе кобыльего молока / Х.С. Сарсембаев, Ю.А. Синявякий, Ж.Т. Лесова// Вестник алматинского технологического университета. – 2016. – №2. – С.71-77.

67. Состав и свойства молока как сырья для молочной промышленности. Справочник – М.: Агропромиздат, 1986. – 239с.

68. Святкина, Л.И. О фальсификации молочной продукции / Л.И. Святкина, В.Я. Андрухова, // Молочная промышленность. – 2011. – №10. –С.39-40.

69. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии: монография / О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров, др. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528с.

70. Стопский В.С., Ключкин В.В., Андреев Н.В. Химия жиров и продуктов переработки жирового сырья. – М.: Колос, 1992. – 286 с.

71. Тепел, А. Химия и физика молока / А. Тепел. – СПб:ИД, Профессия, 2012. – 832 с.

72. Твердохлеб, Г.В. Химия и физика молока и молочных продуктов /Г.В. Твердохлеб, Р.И. Раманаус. – М.:ДеЛи принт, 2006. – 358с.

73. Твердохлеб, Г.В. Технология молока и молочных продуктов /Г.В. Твердохлеб, Г.Ю. Сажинов, Р.И. Раманаускас. – М: ДеЛи принт, 2006. – 614с

74. Технический регламент Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»: [принят Комиссии Таможенного союза 9 декабря 2011 г. №880].

75. Технический регламент Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочных продуктов»: [принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии 9 октября 2013г. №67].

76. Тютюнников, Б.Н. Химия жиров / Б.Н. Тютюнников, Ф.Ф. Гладкий, З.И. Бухштаби др. – М.: Колос, 1992. – 448 с.

77. Тюкавкина Н.А. Биоорганическая химия: учебник для вузов. – М.: Дрофа, 2007, - 542 с.

78. Химия пищевых продуктов. /Под ред. Шринивасан Дамодаран, Кирк Л.Паркин, Оуэн Р.Феннема/ - Перев. С англ. – СПб:ИД «Профессия», 2012 . – 1040 с.

79. Химия жиров / Б.Н. Тютюнников, Ф.Ф. Гладкий, З.И. Буштаб и др. – М.: Колос, 1992.-48 с.

80. Химия липидов / Р.П. Евстигнеева, Е.Н. Звонкова, Г.А. Серебренникова и др. – М.: Химия, 1983. – 296 с.

81. Богатова, О.В. Б73 Химия и физика молока: Учебное пособие / О.В. Богатова, Н.Г. Догарева. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. – 137 с.

82. Чепурной, И.П. Идентификация и фальсификация продовольственных товаров. / И.П. Чепурной. – М.: издательско-торговая корпорация «Дашков и К0», 2004. – 460 с.

83. Шевелёва, Г.И. Контроль качества продукции / Г.И. Шевелёва. – Кемерово. – 2004. – 141 с.

84. Шипилов, С.Н. Современные методы анализа и оборудование в санитарно-гигиенических исследованиях (научно-практическое руководство) / С.Н. Шипилов, А.С. Плешивцев. – М.: ФГУП «Интерсэн», 1999. – С. 496

85. Шубина, О.Г. Фитостерины, их физиологические преимущества и возможности использования в пищевых системах/О.Г. Шубина, Д.Г. Карпухин, А.А. Кочеткова // Пищевые ингридиенты: сырье и добавки. – 2004. – №2. – С. 26-29.

86. Эллер, К.И. Аналитические методы контроля качества и подлинности масложировой продукции. /К.И. Эллер, С.В. Волкович// Масла и Жиры. –2006. – №11. – С. 16.

87. Юрова, Е. А. Фальсификация жировой фазы молочных продуктов жирами немолочного происхождения / Е. А. Юрова // Молочная промышленность. – 2015. – № 11. – С. 24-26.

88. Юрова, Е.А. Современные методы контроля молочного сырья и молочной продукции // Сборник материалов VIII Специализированного конгресса «Молочная промышленность Сибири». – Барнаул. – 2012 – 3 с.

89. Юрова, Е.А. Исследование влияния состава и свойств молочного сырья на качество молочной продукции: специальность 05.18.04 Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Юрова Елена Анатольевна ; Всерос. науч.-исслед. ин-т мясной пром-сти им. В.М. Горбатова.- г. Москва, 2012.- 196 с. ил.

90. Харитонов, Е.Л Кормовые и метаболические факторы формирования жирнокислотного состава у коров / Е.Л. Харитонов, Д.Е. Панюшкин // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2016. – №2. – С. 76-106.

91. Alonso, L. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography / L Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M. Juarez // J. Am. Oil Chem. Soc . – 1997. – № 74. – P.131–135.

92. Angers, P. Regiospecific analysis of fractions of bovine milk fat triacylglycerols with the same partition number / P. Angers, E. Tousignant, A. Boudreau, J. Arul // Lipids. – 1998. – № 33. – P.1195–1201.

93. AOCS, “Sampling and analysis of commercial fats and oils,” in OfficialMethods and Recommended Practices of the AOCS, V. C. Mehlenbacher and E. M. Sallee, Eds., pp. Ce2–Ce66, Amer Oil Chemists Society, Champaign, Ill, USA, 2009.

94. Battelli, G. Detection of non-dairy fat in cheese by gas chromatography of triglycerides/ G. Battelli, L. Pellegrino // Ital. J. Food Sci. – 1994. – № 4. – P. 407–419.

95. Bondia-Pons, I Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination / I. Bondia-Pons, A. I. Castellote, M. C. L´opez-Sabater // Journal of Chromatography. – 2004. – B 809. – P. 339–344.

96. Casirighi, E. Cholesterol determination in butter by high performance chromatography / E. Casirighi, M. Lucisano, C. Pompei, C. Dellea // Milchwissenschaft. – 1994. – № 49. – P. 194–196.

97. Careri, M. Liquid chromatography – UV determination and liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterizationof sitosterol and stigmasterol in soybean oil / M. Careri, L. Elvin, A. Mangia // Journal of Chromatography. – 2001. – A 935. – P. 249–257.

98. Destaillats F. Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols. Application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils./ Destaillats F, de Wispelaere M, Joffre F, Golay PA, Hug B, Giuffrida F, Fauconnot L, Dionisi FJ// Chromatogr A. 2006 Oct 27; 1131(1-2):227-34

99. Ruiz-Samblɾas, C. Triacylglycerols determination by high-temperature gas chromatography in the analysis of vegetable oils and foods: a review of the past 10 years / C. Ruiz-Samblɾas, A. Gonzɾalez-Casado, L. Cuadros-Rodrrıguez // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2015. – vol. 55, no. 11. – pp. 1618–1631.

100. Creamer, L.K. Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids / L.K. Creamer, A. MacGibbon // International Dairy Journal. – 1996. – № 6. – P. 539-568.

101. Chilliard, Y. Dietary lipids and fresh forage interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties / Y. Chilliard, A. Ferlay // Reproduction Nutritional Development. – 2004. – № 44. – P. 467-492.

102. DePeters, E. J. Fatty acid composition of milk fat from three breeds of dairy cattle / E. J. DePeters, J. F. Medrano, B. A. Reed // Can. J. Anim. Sci. – 1995. – № 75. – P .267–269.

103. Precht, D. Detection of adulterated milk fat by fatty acid an triglyceride analysis / D. Precht // Fat Science Technology. – 1991. – vol. 93, no. S4. – pp. 538–544.

104. Delmonte, P. Separtion characteristics of fatty acid methyl ester using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column / P. Delmonte, Kia A. R. Fardin, j. K. G. Kramer, M. M. Mossoba, L. Sidisky, J. I. Rader // Journal of Chromatography. – 2011. – A 1218. – P. 545–554.

105. Daniele Naviglio. Analysis Procedures for Triglycerides and Fatty Acids as Pentyl and Phenethyl Esters for the Detection of Butter Adulteration Using Chromatographic Techniques./ Daniele Naviglio,[1]Marina Dellagreca, Francesco Ruffo, Anna Andolfi // Journal of Food Quality.- 2017.- P. 345-356.

106. Fletouris, D. L. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography / D. L. Fletouris, N. A. Botsoglou, J. E. Psomas, A. I. Mantis // J. Dairy Sci. – 1998. – № 81. – P. 2833–2840.

107. Fontecha, J. Identify of the major triacylglycerols in ovine milk fat / J. Fontecha, H. Goudjil, J. J. Rìos, M. J. Fraga, M. Juàrez // International Dairy Journal. – 2005. – № 15**.** – P. 1217-1224.

108. Goudjil, H. TAG composition of ewe's milk fat. Detection of foreign fats / H. Goudjil, J. Fontecha, M. J. Fraga, M. J. Juarez/ / Am. Oil Chem. Soc. – 2003. – № 80. – P. 219–222.

109. Griinari, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants / J.M. Griinari, D.E. Bauman // Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. – 1999. – Vol. 1. – pp. 180-200.

110. Gebauer S., Harris W.S., Kris-Etherton P.M. and Etherton T.D. (2005) Dietary n-6: n-3 fatty acid ration and health.Chapter 11. In: Healthful Lipids. Akon C.C. and Lai O-M Eds, AOCS Press, Champaign, Illinois.

111. German J.B. and Dillard C. J. Fractionated milk fat: composition, structure, and functional properties. Food Technology. -1998.-№5. - P. 33-52.

112. Helena Bermingstom, Bo Angelin Paolo Parini Novel formulation of plant sterol in solution/ Cholesterol-lowering effect in hyperand normocholesterolemic subjects//NutraFoods. – 2003. - V.2. - №2. – P. 5-11.

113. Innis, S.M. Human milk: maternal dietary lipids and infant development / S.M. Innis // Proceedings of the Nutritional Society. – 2007. – № 66. - P. 397-404.

114. Jensen R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000 / R.G. Jensen // Journal of Dairy Science. – 2002. – № 85. – P. 295-350.

115. Johnson R. Food Fraud and “Economically Motivated Adulteration” of Food and Food Ingredients.-2014. - №32. - P. 1-40.

116. Kisza, J. Determination of cholesterol in milk fat by gas chromatography (GC) / J. Kisza, B. Stanlewski, M. Juskiewicz // Polish J. Food Nutr. Sci. – 1994. – № 3. – P. 75–81.

117. Klatt, L. V. Cholesterol analysis in foods by direct saponification-gas-chromatographic methodcollaborative study / L. V. Klatt, B. A. Mitchell, and R. L. Smith // J. AOAC Int. – 1995. – № 78. – P. 75–79.

118. Laakso, P. Identification of milk fat triacylglycerols by capillary supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / P. Laakso, P. Manninen // Lipids. – 1997. – № 32. – P. 1285–1295.

119. Lipp, M. Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: Application for studies of milk quality and adulteration / M. Lipp // Food Chem. – 1995. – № 54. – P. 213–221.

120. Manninen, P. Method for characterization of triacylglycerols and fat-soluble vitamins in edible oils and fats by supercritical fluid chromatography / P. Manninen, P. Laakso, H. Kallio // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1995. – № 72. – P. 1001–1008.

121. Mondello, L. Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry in the analysis of lipids / L. Mondello, A. Casilli, P. Quinto Tranchida, R. Costa, B. Chiofalo, P. Dugo, G. Dugo // Journal of Chromatography. – 2004. – A 1035. – P. 237–247.

122. Molkentin, J. Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk / J. Molkentin // Nahrung. – 1999. – 43(3). – S. 185– 189.

123. Buchgraber, M. Method validation for detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate / M. Buchgraber, F. Ulberth, E. Anklam // Journal of AOAC International. – 2004. – vol. 87, no. 5. – pp. 1164–1172.

124. Mele, M. Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability / M. Mele, G. Contarini, L. Cercaci, A. Serra, A. Buccioni,

M. Povolo, G. Conte, A. Funaro, S. Banni, G. Lercker, P. Secchiari // International Dairy Journal. – 2011. – № 21. – P. 365-372.

125. Miller G.D., Jarvis J.K. and McBean L.D. (2007) the importance of milk and milk products in the diet. In: Handbook of Dairy Foods and Nutrition. Third Edition. National Dairy Council. CRC Press. Boca Raton, USA. 2000-32183

126. MacGibbon A.K.H. and Taylor M.W. (2006) Composition and structure of bovine milk lipids. In: Advanced Dairy Chemistry. Volume 2 Lipids. Third Edition. Fox P.F. and McSweeney P.L.H., Eds. Springer, USA.

127. Nielsen, J. H., C. E. Olsen, J. Lyndon, J. Sorenson, and L. H. Skibstead. 1996b. Cholesterol oxidation in feta cheese produced Journal of Dairy Science Vol. 85, No. 2, 2002 from high-temperature bleached and from non-bleached butteroil from bovine milk. J. Dairy Res. 63:615–621.

128. Nicholas D.S. and Sanderson K. (2002).The nomenclature, structure, and properties of food lipids. In: Chemical and Functional Properties of Food Lipids. Zdzislaw Z. E. Sikorski and Anna Kolakowska, Eds. CRC Press, Boca Raton, USA.

129. Parodi, P.W. Conjugated linolenic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat / P.W. Parodi // Journal of Dairy Sciences. – 1999. – № 82. – P.1339-1349.

130. Parody, P.W. Positional distribution of fatty acids in the triglycerides classes of milk fat / P.W. Parody // Journal of Dairy Sciences. – 1992. – № 49. – P. 73-90.

131. Rombaut, R. Triacylglycerol analysis of fats and oils by evaporative light scattering detection / R. Rombaut, N. De Clercq, I. Foubert, K. Dewettinck // JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2009. – vol. 86. No. 1. – pp. 19–25.

132. Robinson, N.P. Determination of the conjugated linoleic acid containing triacylglycerols in New Zealand milk fat / N.P. Robinson, A.K.H. MacGibbon // Lipids. – 2000. – № 35. – P. 789–796.

133. Stanton, C. Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11- conjugated linoleic acid content / C. Stanton, F. Lawless, G. Kjellmer, D. Harrington, R. Devery, J.F. Connolly, J. Murphy // Journal of Food Sciences. – 1997. – № 62. – P. 1083-1086.

134. Sanchez-Juanes, F. Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membrane: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic Escherichia coli strains /F. Sanchez-Juanes, J.M. Alonso, L. Zancada, P. Hueso // Biological Chemistry. – 2008. – 390(1). – P. 31-40.

135. Short communication: rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy. Ntakatsane MP, Liu XM, Zhou P J Dairy Sci. 2013 Apr; 96(4):2130-2136.

136. Tvrzicka, E. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – A review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions / E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak // Biomedical Papers of the Faculty of Medicine and Dentistry of Palacky University, Olomouc Czech Republic. – 2011. – 155(2). – P. 117-130.

137. Spitzer, V. Structure analysis of fatty acids by gas chromatography—lowresolution electron impactmass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives—a review / V. Spitzer // Progress in Lipid Research. – 1996. – vol. 35. No. 4. – pp. 387–408.

138. Christie, W.W. A comparison of pyrrolidide and picolinyl ester derivatives for the identification of fatty acids in natural samples by gas chromatography-mass spectrometry / W.W. Christie, E. Y. Brechany, S. B. Johnson, R. T. Holman // Lipids. – 1986. – vol. 21. No. 10. – pp. 657–661.

139. Christie, W.W. Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids / W. W. Christie // Analusis. – 1998. – vol. 26. No. 3. – pp. M34–M40.

140. Christie, W.W. Gas chromatography-mass spectrometry Methods for structural analysis of fatty acids / W. W. Christie // Lipids. – 1998. – vol. 33. No. 4. – pp. 343–353.