

Identifizierung von Milchfett in anderen Fetten mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie

Von J. Cerbulis und C. A. Zittle

Eastern Regional Research Laboratory*, Philadelphia, Pennsylvania

Es wird eine dünnschicht-chromatographische Methode zur Identifizierung von Milchfett in anderen Fetten beschrieben. Kuh-, Schafs- und Ziegenmilch sowie Kuhkolostrum zeigen im Triglycerid-Gebiet zwei Flecke, während alle anderen Fette nur einen Triglycerid-Fleck aufweisen. Der zweite Fleck im Chromatogramm der Milchfette besteht aus den langsamer wandernden Triglyceriden mit einer niedrigen C-Zahl der Fettsäure-Kette (C_{36} — C_{40}). 1 % Milchfett ist in einem Fettgemisch noch nachweisbar, wenn 200 bis 400 μg des Fettgemisches verwendet werden.

Detection of Milk Fat in other Fats by Thinlayer-Chromatography

A method is described for the detection of milk fat in other fats using thinlayer-chromatography. Cow, sheep, and goat milk fat and cow colostrum showed two spots in the triglyceride region; all other fats showed only one spot. Triglycerides with a lower total number of carbon atoms in fatty acid chains (C_{36} — C_{40}) migrate slower and show up as a second distinct spot, which is characteristic of milk fat only. One per cent of milk fat in a fat mixture is detectable when 200 to 400 μg of a fat mixture is applied.

Das Auffinden von Milchprodukten in anderen Nahrungsmitteln war der Gegenstand umfangreicher Untersuchungen der Vergangenheit. Diese Entdeckung basierte auf der Identifizierung der Fette und Proteine, der Lactose, der Sterine, Mineralstoffe oder anderer

Identification de la graisse de lait dans d'autres lipides à l'aide de la chromatographie sur couche mince

Le lait de vache, de brebis et de chèvre, ainsi que le colostrum de vache présentent dans la zone triglycéridique deux taches, tandis que tous les autres lipides n'en présentent qu'une seule. On peut déceler jusqu'à 1 % de graisse de lait dans un mélange lipidique, si l'on emploie 200 à 400 μg de celui-ci.

Идентификация молочного жира в других жирах с помощью тонкослойной хроматографии.

Описывается тонкослойно-хроматографический метод идентификации молочного жира в других жирах. Молоко коровы, овцы и козы и коровье молозиво имеют в области триглицеридов два пятна, все остальные жиры только одно пятно. Второе пятно хроматограммы молочных жиров состоит из более медленных триглицеридов с малимым числом С-атомов (C_{36} — C_{40}). При применении 200-400 μg жиромеси можно идентифицировать 1% молочного жира.

Bestandteile der Milch¹. Die Identifizierung von tierischen Fetten in Nahrungsmitteln bezog sich hauptsächlich auf die Anwesenheit von Cholesterin, das der wesentliche Bestandteil des tierischen Fettes ist, seien es Milch- oder Depotfette. Vor kurzem haben A. Kuksis und Mit-

* Eastern Utilisation Research and Development Division, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture.

¹ J. Cerbulis, Detection of Milk Products in Chocolate and other Foods by Paper-Chromatography, Rev. int. chocolat. 10, 342 [1955].

arb.² die gas-chromatographische Analyse der Triglyceride des Butterfettes durchgeführt. Die Entdeckung beruhte auf der Molekulargewichtsverteilung der Fett-Triglyceride.

Milchfette sind durch beträchtliche Anteile an kurzkettigen Fettsäuren gekennzeichnet. Die Betrachtung der Verteilung der Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge im Milchfett der Kuh, der Ziege, des Schafes und der Pferde^{3,4} zeigte allgemein, daß erhebliche Mengen von Fettsäuren der C₄- und der C₁₀—C₁₂-Gruppe vorkommen, obwohl die vorherrschenden Fettsäuren zu den C₁₆—C₁₈-Gruppen gehören.

Pflanzliche Fette und tierische Depotfette enthalten in der Hauptsache C₁₈-Fettsäuren^{2,4,5}. Kokosnußfett bildet eine Ausnahme; dieses enthält vornehmlich C₁₂-Fettsäure, während die C₁₄—C₁₈-Säuren den kleineren Bestandteil ausmachen⁵.

Die Fettsäuren kommen fast ausschließlich als Triglyceride vor, und zwar sowohl im tierischen als auch im pflanzlichen Fett fast nur Triglyceride mit 52 bis 54 Kohlenstoffatomen. Die C-Atomzahl der Triglyceride des Butterfettes jedoch liegt mehr bei C₃₆ bis C₄₀ und bei C₅₀ bis C₅₂^{2,6}.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode zur Bestimmung von Milchfett in anderen Fetten mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie, wobei zwei Flecke im Gebiet der Triglyceride erschienen, wo andere Fette nur einen Fleck zeigen. Der untere der beiden Flecke gibt vermutlich die Triglyceride mit den kurzkettigen Fettsäuren wieder.

Seit dem Beginn unserer ersten Beobachtungen ist eine Veröffentlichung⁷ erschienen, die unsere Vermutungen bestätigte. Wir hoffen, daß diese charakteristische Eigenschaft von Milchfett für die quantitative Bestimmung von Butterfett in Fettmischungen oder umgekehrt eine Hilfe sein wird.

Materialien und Methoden

Es wurden die dünn-schicht-chromatographischen Ausrüstungen der Firma *Desaga*, Heidelberg, benutzt; Silicagel G von *Merck*, Darmstadt; bei den übrigen Reagentien handelte es sich um p.a.-Substanzen.

Reagentien zur Identifizierung der Komponenten

1. Jod-Dämpfe und Permanganat-Sprühreagenz (ein Gemisch von 1 Teil 0.1 m KMnO₄-Lösung und 3 Teilen 10%iger Schwefelsäure)⁸.

² A. Kuksis u. M. J. McCarthy, Triglyceride Gas-Chromatography as a Means of Detecting Butterfat Adulteration, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **41**, 17 [1964].

³ D. R. Dhingra, The Component Fatty Acids and Glycerides of the Milk Fats of Indian Goats and Sheep, Biochem. J. **27**, 851 [1933].

⁴ T. P. Hilditch, The Chemical Constitution of Natural Fats, J. Wiley & Sons, New York 1956, 3rd edit.

⁵ G. S. Jamieson, Vegetable Fats and Oils, Reinhold Publishing Corp., New York 1943, 2nd edit.

⁶ A. Kuksis, M. J. McCarthy u. J. M. R. Beveridge, Quantitative Gas-Liquid-Chromatographic Analysis of Butterfat Triglycerides, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **40**, 530 [1963].

⁷ M. L. Blank u. O. S. Privett, Structure of Milk Fat Triglycerides, J. Dairy Sci. **47**, 481 [1964].

⁸ D. C. Leegwater, C. G. Youngs, J. F. T. Spencer u. B. M. Craig, Investigations into the Production of Lipids by Submerged Cultures of the Mushroom *Tricholoma Nudum*, I. Fatty Acid Composition of Neutral Lipids and Phospholipids as a Function of Time, Canad. J. Biochem. Physiol. **40**, 847 [1962].

2. Eine 10%ige Lösung von Phosphormolybdänsäure⁹.

Beschreibung der Methode

Es wurden Dünnschicht-Platten nach einer von E. Stahl¹⁰ beschriebenen Methode hergestellt, indem man 30 g Silicagel G und 60 ml Wasser benutzte und 1 bis 2 Std. trocknete. Fettproben (8- bis 10%iger Konzentration) wurden in Benzol gelöst und mit Mikropipette auf die Platten aufgetropft. Eine Menge von 200 bis 400 µg eines Fettgemisches, das bis 3% Milchfett enthält, ist für 1.5 bis 2 µg der kurzkettigen Triglyceride ausreichend. Die Platten wurden bei Raumtemperatur entwickelt, bis die Lösungsmittelfront die Spitzen der Platte erreicht hatte (60 bis 120 Min.). Dann wurden die Triglycerid-Flecke folgendermaßen identifiziert: Die Platten wurden in eine Joddampf-Atmosphäre gebracht. Diese Methode ist sehr empfindlich, die erhaltenen Flecke sind aber nicht beständig. Sollen die Flecke für längere Zeit noch sichtbar sein, dann wird der Joddampf abgedampft, dann das Chromatogramm mit Permanganat-Lösung besprüht und 15 bis 20 Min. auf 110° bis 120° C erhitzt. Auf weißem Untergrund wurden braunschwarze Flecke sichtbar. Als Sprühhlösung wurde auch Phosphormolybdänsäure benutzt. Alle drei Sprühreagentien waren gleich empfindlich.

Fließmittel: a) Benzol, b) Petroläther (30° bis 60° C) — Diäthyläther — Essigsäure (80 : 20 : 1).

Fettproben: 33 verschiedene Fette wurden erprobt:

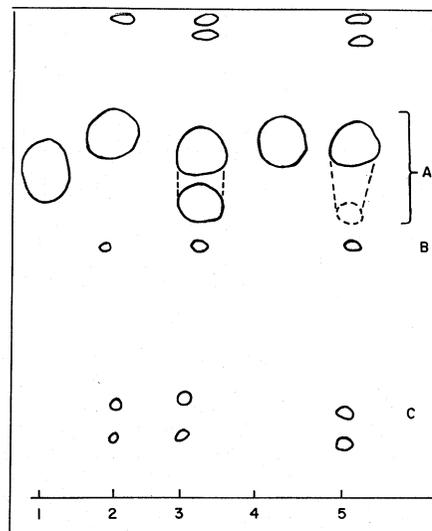


Abb. 1. Dünnschicht-Chromatogramm

Fließmittel: Petroläther/Diäthyläther/Essigsäure (80 : 20 : 1)
Sichtbarmachung mit Joddampf

1. Kokosnußöl
 2. Kakaobutter
 3. Kuhmilchfett
 4. Rinderfett
 5. Fettgemisch mit 1 bis 3% Milchfett und Milkschokolade-Fett
- A. Triglyceride
B. Freie Fettsäuren (reine Stearin-, Palmitin- und Ölsäure wurden als Vergleichssubstanzen benutzt)
C. Cholesterin (reines Cholesterin wurde als Vergleichssubstanz benutzt)

⁹ D. Kritchevsky u. M. R. Kirk, Detection of Steroids in Paper-Chromatography, Arch. Biochem. Biophysics **35**, 346 [1952].

¹⁰ E. Stahl, Thinlayer-Chromatography, II. Standardization, Detection, Documentation, and Application, Chemiker-Ztg. **82**, 323 [1958].

a) Tierische Fette

Kuhmilch, Kuhkolostrum, Ziegenkäse (aus Frankreich) und Schafkäse (aus Jugoslawien); Ochsen-, Schweine-, Gänse-, Enten-Küken-Depotfette wurden in diesem Labor für die Untersuchung vorbereitet.

Fischleberöl, Fischöl (kaltes Verfahren) und Hundedepotfett waren handelsübliche Produkte.

b) Pflanzliche Fette

Das Fett von Kakao, Sonnenblumen, Erdnüssen, Sojabohnen, Haselnüssen und Kürbis wurde in diesem Labor isoliert; ferner wurden untersucht: Baumwollsaat-, Oliven-, Tung-, Lein-, Ricinus-, Mais-, Kokosnuß- und Pfirsichkernöle sowie Margarine als handelsübliche Produkte.

c) Milchsokolade-Fett wurde aus handelsüblicher Milchsokolade extrahiert.

d) Fett-Gemische

1 bis 2% Kuhmilchfett enthaltende Mischungen wurden im eigenen Laboratorium hergestellt.

Ergebnisse

Die Lage der Triglyceride auf den Dünnschicht-Platten bildete die Grundlage für die Erkennung der Unterschiede zwischen Milchfett und Nicht-Milchfett. Alle Milchfette (Kuh, Ziege, Schaf und Kuhkolostrum) ergaben zwei Triglycerid-Flecke. Alle anderen Fette zeigten nur einen Triglycerid-Fleck. Kokosnußöl gab einen Fleck, dessen Rf-Wert etwas kleiner war als diejenigen der übrigen pflanzlichen und tierischen Depotfett-Glyceride; die Wanderungsgeschwindigkeit liegt etwa in der Mitte zwischen den langsam bzw. schneller wandernden Milchfett-Triglyceriden. Ricinusöl weist nur einen schwachen Fleck im Triglycerid-Gebiet auf. Die Hauptkomponente des Ricinusöles blieb in der Nähe des Startpunktes. *R. Maier* und *R. T. Holman*¹¹ kamen mit Ricinusöl zu ähnlichen Ergebnissen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Triglyceride mit 48 bis 54 C-Atomen in der Fettsäurekette schneller wandern als die Triglyceride mit kurzkettigen Fettsäuren und daß sie einen intensiven Fleck geben. Triglyceride mit kurzkettigen Fettsäuren wandern langsamer und zeigen einen zweiten deutlichen Fleck (Abb. 1). Der zweite Fleck ist charakteristisch für Milchfett und ermöglicht einen Weg zur Unterscheidung von Milchfett von anderen Fetten. Mit Benzol als Lösungsmittel wurde ein dritter kleiner Fleck zwischen den beiden größeren beobachtet.

Diese Methode wurde auch zur Untersuchung der Silicagelsäule-Eluate der Triglycerid-Fractionen von Milchfetten verwendet. Die Ergebnisse zeigten, daß höhermolekulare Triglyceride schneller als solche mit niedrigerem Molekulargewicht eluiert wurden.

Mischungen von Fetten mit 1 und 2% Kuhmilchfett zeigten im Triglycerid-Gebiet einen schwachen, aber

merklich langsamer wandernden Fleck, wenn 200 bis 400 µg der Fettmischung aufgetropft wurden. Dieser kleinere Fleck ist charakteristisch für Milchfett-Mischungen mit Kokosnußfett. Jedoch konnte nicht mit derselben Genauigkeit getrennt werden, vermutlich wegen des hohen Gehaltes an kurzkettigen Fettsäuren.

Diskussion

Die am einfachsten durchzuführende Identifizierung von Milchfett in anderen Fetten wurde dünnschicht-chromatographisch auf modifizierten Silicagel-G-Platten erhalten. Durch Imprägnierung der Platten mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ¹² oder Auswaschen mit einer Äther-Methanol-Mischung (20:80)¹¹ konnte die Trennung nicht verbessert werden. Eine benzolische Lösung ergab etwas längliche Flecke, die Trennung zwischen den beiden Flecken war jedoch gut zu erkennen. Durch Mehrfach-Entwicklung war es möglich, die Trennung zu verbessern.

Mit einem Gemisch aus Petroläther-Äther-Essigsäure (80:20:1) als Fließmittel wurden runde Flecke mit höheren Rf-Werten erhalten, allerdings trat mitunter Schwanzbildung zwischen den beiden größeren Flecken auf. Die Identifizierung von Milchfett in anderen Fetten war jedoch noch sehr gut. Die anderen Systeme ergaben für alle Triglycerid-Fractionen nur einen Fleck. Diese dünnschicht-chromatographisch erhaltenen Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem Befund von *A. Kuksis* und Mitarb., die die Gas-Chromatographie zur Untersuchung anwandten.

Frühere Versuche haben gezeigt, daß 1% Milchfett in Ochsenfett und verschiedenen anderen Fetten dünnschicht-chromatographisch identifiziert werden kann. Um diese Methode zur Bestimmung von anderen Fetten in Butterfett einsetzen zu können, wäre eine quantitative Bestimmung des Gewichtsverhältnisses der beiden Triglycerid-Gruppen im Butterfett erforderlich. Wenn das Verhältnis ausreichend konstant bleibt, könnte aus dem schneller wandernden Fleck das Nicht-Milchfett bestimmt werden. Andere Methoden mögen ebenfalls anwendbar sein. *M. L. Blank*, *J. A. Schmit* und *O. S. Privett*¹³ haben kürzlich eine dünnschicht-chromatographische Methode zur Trennung von Lipiden beschrieben. Diese Methode erfordert ein starkes Erhitzen der Chromatographier-Platten unter normalen Bedingungen und eine Analyse mit dem Densitometer. Zur endgültigen Identifizierung von Milchfett in Fettgemischen können die Triglyceride des langsamer wandernden Fleckes durch Gas-Chromatographie (*Kuksis*-Methode) oder die kürzerkettigen Fettsäuren nach der Verseifung analysiert werden.

Die Autoren möchten auch an dieser Stelle den Herren *Daniel G. Pitcher*, *R. W. Riemenschneider* sowie *H. E. Kenney* für das großzügige Zurverfügungstellen von Fettproben danken.

¹¹ *R. Maier* u. *R. T. Holman*, Naturally Occurring Triglycerides Possessing Optical Activity in the Glycerol Moiety, *Biochemistry* **3**, 270 [1964].

¹² *L. A. Horrocks*, Thinlayer-Chromatography of Brain Phospholipids, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* **40**, 235 [1963].

¹³ *M. L. Blank*, *J. A. Schmit* u. *O. S. Privett*, Quantitative Analysis of Lipids by Thinlayer-Chromatography, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* **41**, 371 [1964].