

DETECCIÓN DE GRASA EXTRAÑA EN GRASA LÁCTEA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESTADÍSTICA MULTIVARIABLE

DETECTION OF FOREIGN FAT IN MILK FAT BY GAS-CHROMATOGRAPHY AND MULTIVARIABLE STATISTIC

Rey Gutiérrez-Tolentino¹, Salvador Vega y León¹, Gilberto Díaz-González¹, Héctor J. Delgadillo-Gutiérrez², Georgina Urbán-Carrillo¹, Acacia Ramírez-Ayala¹, Clementina González-Cabrera¹ e Ignacio Méndez-Ramírez³

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal, ²Departamento de los Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. 04960. Calzada del Hueso 1100. Coyoacán, Distrito Federal. México. (reygut@correo.xoc.uam.mx). ³Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas. Universidad Nacional Autónoma de México. 04560. Circuito interior s/n. Ciudad Universitaria. Coyoacán, Distrito Federal. México.

RESUMEN

La adición de grasa no láctea (GNL) a la leche y sus derivados se considera una adulteración del producto. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una metodología estadística que permita detectar GNL en mezclas de GNL con grasa láctea (GL). Se realizó un muestreo de leche cruda del Altiplano Mexicano cada 15 d durante un año (total, 216 muestras). Las muestras de GNL fueron dos para cada aceite: pescado, girasol y canola, así como dos de manteca y sebo. Los porcentajes (% p/p) de contenido de triacilgliceroles (TAG) en cada materia grasa se obtuvieron por cromatografía de gases con detector de ionización de flama; los TAG identificados oscilaron entre 28 y 56 átomos de carbono. Se mezcló GL con las GNL: 95:5, 90:10, 85:15 y 80:20. Se hizo un análisis de regresión lineal múltiple y se obtuvieron tres ecuaciones para las GNL: 1) $Y = 1.71C42 + 11.76C44 - 1.93C46 + 3.13C52 - 0.25C54$ (aceite de pescado); 2) $Y = 4.24C38 - 2.18C40 + 2.33C42 + 2.19C44 - 0.03C48 + 2.86C50 - 0.69C52 + 2.20C54$ (aceites de canola y girasol, sebo); 3) $Y = 2.41C34 + 1.37C36 - 0.30C38 + 2.67C40 + 3.63C48 - 0.69C50 + 1.70C52 + 0.71C54$ (manteca). Con esas ecuaciones se detectaron 75.3 y 98.11% de los casos cuando las adulteraciones con GNL fueron 5 y 10%.

Palabras clave: Adulteración, grasa láctea, grasa no láctea, regresión lineal múltiple.

INTRODUCCIÓN

En varios países es ilegal incorporar grasa no láctea (GNL) a la leche y productos lácteos (Ulberth y Buchgraber, 2000; Boghra y Borkhatriya, 2004; Perotti *et al.*, 2005). En México la Norma Oficial Mexicana (NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas,

ABSTRACT

The addition of non-milk fat (NMF) to milk and its derivatives is considered to be an adulteration of the product. The objective of our study was to develop a statistical methodology that will make it possible to detect NMF in mixtures of NMF with milk fat (MF). A sampling was made of raw milk from the Mexican Highlands every 15 d during one year (total, 216 samples). The samples of NMF included two for each oil: fish, sunflower and canola, as well as two of lard and tallow. The percentages (% p/p) of triacylglycerols (TAG) in each fatty material were obtained by gas chromatography with flame ionization detector; the identified TAG varied between 28 and 56 carbon atoms. MF was mixed with the NMF: 95:5, 90:10, 85:15 and 80:20. A linear multiple regression analysis was made and three equations were obtained for the NMF: 1) $Y = 1.71C42 + 11.76C44 - 1.93C46 + 3.13C52 - 0.25C54$ (fish oil); 2) $Y = 4.24C38 - 2.18C40 + 2.33C42 + 2.19C44 - 0.03C48 + 2.86C50 - 0.69C52 + 2.20C54$ (canola and sunflower oils, tallow); 3) $Y = 2.41C34 + 1.37C36 - 0.30C38 + 2.67C40 + 3.63C48 - 0.69C50 + 1.70C52 + 0.71C54$ (lard). With these equations, 75.3 and 98.11% of the cases were detected when the adulterations with NMF were 5 and 10%.

Key words: Adulteration, milk fat, non-milk fat, multiple linear regression.

INTRODUCTION

It is illegal in several countries to incorporate non-milk fat (NMF) to milk and dairy products (Ulberth and Buchgraber, 2000; Boghra and Borkhatriya, 2004; Perotti *et al.*, 2005). In México, the Norma Oficial Mexicana (NOM-155-SCFI-2003, Milk, milk formula and combined milk product-Denominations, physiochemical specifications, commercial information and testing methods), establishes that whole milk for human consumption should contain only milk fat and comply with the specifications of its denomination.

Recibido: Octubre, 2006. Aprobado: Julio, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 733-742. 2007.

información comercial y métodos de prueba), establece que la leche entera para consumo humano debe contener sólo grasa propia de la leche y cumplir con las especificaciones de su denominación. Sin embargo, en algunos productos lácteos es posible adicionar GNL de origen vegetal, si se especifica en la información de la etiqueta; de lo contrario se considera adulteración.

Para comprobar la autenticidad de la grasa de leche se emplean técnicas cromatográficas para determinar la composición de ácidos grasos (AG), triacilglicérolos (TAG) y algunas fracciones del insaponificable (Juárez, 1991; Destailats *et al.*, 2006; Fontecha *et al.*, 2006). La presencia de GNL de origen vegetal se detecta fácilmente por análisis de los fitosteroles (β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol), hasta 1% de concentración con un nivel de confianza mayor a 95% (FIL/IDF, 1970; NMX-F-707-COFO-CALEC-2004). Sin embargo, la adición de hasta 10% de GNL de origen animal como aceite de pescado, sebo y manteca es difícil de detectar con un nivel de confianza aceptable (Pinto *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 2002; Perotti *et al.*, 2005).

En México se ha estudiado la caracterización lipídica de leches en polvo y pasteurizada, particularmente la composición de AG y TAG (Vega *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2004). Pero en la literatura revisada no se encontró información para grasa de leche cruda, la combinación del perfil de triacilglicérolos y modelos estadísticos lineales en la aplicación de detección de GNL en leche y productos lácteos. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo estadístico de regresión lineal múltiple basado en el análisis de TAG por cromatografía de gases, que caracterice a la grasa láctea pura. La sensibilidad de las ecuaciones de regresión se probó en muestras de grasa láctea adulteradas con grasas no lácteas (vegetal y animal; 5, 10, 15 y 20%).

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra

Grasa de leche cruda

Se recolectaron 216 muestras de 1 L cada 15 d durante 12 meses, de dos unidades de producción del Distrito Federal (D.F.) (n=49, se obtuvo una muestra adicional), cuatro del Estado de México (n=107, se obtuvo 11 muestras adicionales) y tres del Estado de Hidalgo (n=60, en ocasiones no se completó el muestreo en las tres unidades de producción). La toma de muestras se realizó según la metodología de la FIL/IDF (1995) y de la Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006. La materia grasa se extrajo

However, in some milk products it is possible to add NMF of vegetable origin, when it is specified in the information on the label; otherwise, it is considered adulteration.

To verify the authenticity of milk fat, chromatographic techniques are used to determine the composition of fatty acids (FA), triacylglycerols (TAG) and some unsaponifiable fractions of the milk fat (Juárez, 1991; Destailats *et al.*, 2006; Fontecha *et al.*, 2006). The presence of NMF of vegetable origin is easily detected through analysis of the phytosterols (β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol), up to a concentration of 1% with a confidence level of over 95% (FIL/IDF, 1970; NMX-F-707-COFO-CALEC-2004). However, the addition of up to 10% of NMF of animal origin such as fish oil, tallow and lard is difficult to detect with an acceptable confidence level (Pinto *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 2002; Perotti *et al.*, 2005).

In México, studies have been made of the lipidic characterization of powder and pasteurized milk, especially the composition of FA and TAG (Vega *et al.*, 1989; Díaz *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2004). However, no information was found in the literature reviewed for raw milk fat, the combination of the triacylglycerols profile and linear statistical models in the application of the detection of NMF in milk and milk products. Therefore, the objective of the present study was to develop a multiple linear regression model based on the analysis of TAG by gas chromatography, to characterize pure milk fat. The sensitivity of the regression equations obtained was tested in samples of milk fat adulterated with non-milk fat (vegetable and animal; 5, 10, 15 and 20%).

MATERIALS AND METHODS

Taking samples

Raw milk fat

A collection was made of 216 samples of 1 L every 15 d during 12 months, from two production units of the Federal District (n=49, an additional sample was obtained), four from the State of México (n=107, 11 additional samples were obtained) and three from the State of Hidalgo (n=60, at times the sampling was not completed in the three production units). The taking of samples was carried out according to the methodology proposed by the FIL/IDF (1995) and by Norma Mexicana NMX-F-718-COFOCALEC-2006. The fatty material was extracted using a detergent (Frank *et al.*, 1975), and was kept at -20°C until its analysis.

usando un detergente (Frank *et al.*, 1975), y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Muestras de grasa no láctea

- Aceites. Se obtuvo dos muestras de 250 mL de cada uno de los siguientes aceites: pescado, canola y girasol, adquiridos en industrias aceiteras en el Distrito Federal, México.
- Manteca y sebo. Se obtuvo dos muestras de manteca y dos de sebo, (100 g cada una) en mercados populares del D.F. La materia grasa se extrajo y purificó de forma similar al tratamiento propuesto para mantequilla por la Federación Internacional de Lechería (FIL/IDF, 1995).

Preparación de triacilglicerolos

De acuerdo con la técnica de Firestone (1986), se pesaron 50 mg de grasa en frascos de 5 mL con tapa hermética y se disolvieron en 2.5 mL de hexano. Se inyectó 1 μL de la solución en el cromatógrafo de gases. Los lípidos de la leche contienen 97 a 98% de triacilglicerolos (Jensen, 2002).

Análisis cromatográfico

El análisis de TAG por cromatografía de gases (CG) se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem 9000, con detector de ionización de flama e integrador de áreas PE Nelson modelo 1022. Las condiciones de operación fueron: columna de fenil metil silicón a 5% con polaridad intermedia (HP5) y longitud 2 m \times 0.25 D.I. \times 0.25 grosor de capa; temperatura del inyector 340 $^{\circ}\text{C}$; temperatura del detector 350 $^{\circ}\text{C}$; flujo del gas de arrastre (He) 1 mL min^{-1} ; programa de temperaturas del horno: 1 = 200 $^{\circ}\text{C}$ 0 min, con incrementos de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 325 $^{\circ}\text{C}$; 2 = 325 $^{\circ}\text{C}$ 6 min; tiempo total de corrida 31 min; modo de inyección: splitless, tiempo de purga 0.75 min; volumen de inyección: 1 μL .

Los resultados se corrigieron usando una mezcla estándar de cinco TAG (20% cada uno) con pureza mayor a 99% (Sigma 178-11), de concentración de 20 mg mL^{-1} en hexano de tricaprilina, C24; tricaprina, C30; trilaurina, C36; trimiristina, C42; tripalmitina, C48. Para identificar y cuantificar los TAG se compararon los cromatogramas (tiempos de retención y áreas de los picos) obtenidos de grasa de leche con el cromatograma de la mezcla estándar. Los porcentajes de TAG logrados se normalizaron de acuerdo con los factores de corrección determinados para los estándares C24, C30, C36, C42 y C48, considerando que el C36 (trilaurina) es recuperado completamente de la columna. Los factores de corrección para cada uno de los restantes TAG se calcularon con la ecuación (Pinto *et al.*, 1987):

$$f_i = (C_{si} / C_1) \times (A_1 / A_{si})$$

donde, f_i = factor de corrección del TAG i ; A_1 = área de trilaurina; A_{si} = área del TAG estándar i ; C_1 = concentración (mg mL^{-1}) de trilaurina; C_{si} = concentración (mg mL^{-1}) del TAG estándar i . Los

Samples of non-milk fat

- Oils. Two samples were obtained of 250 mL of each of the following oils: fish, canola and sunflower, acquired in oil industries in the Federal District.
- Lard and beef fat. Two samples were obtained of lard and two of tallow, (100 g each) in popular markets of the Federal District. The fatty material was extracted and purified in a way similar to that proposed for butter by the International Dairy Federation (FIL/IDF, 1995).

Preparation of triacylglycerols

According to the technique of Firestone (1986), 50 mg of fat were weighed in 5 mL jars with hermetic cover and were dissolved in 2.5 mL of hexane. One μL of the solution was injected into the gas chromatograph. The milk lipids contain 97 to 98% of triacylglycerols (Jensen, 2002).

Chromatographic analysis

The analysis of TAG by gas chromatography (GC) was carried out in a Perkin Elmer Autosystem 9000 gas chromatograph, with flame ionization detector and PE Nelson model 1022 area integrator. The operating conditions were as follows: phenyl methyl silicon column at 5% with intermediate polarity (HP5) and length of 2 m \times 0.25 D.I. \times 0.25 layer thickness; injector temperature 340 $^{\circ}\text{C}$; detector temperature 350 $^{\circ}\text{C}$; carrier gas flow (He) 1 mL min^{-1} ; oven temperature program: 1=200 $^{\circ}\text{C}$ 0 min, with increases of 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 325 $^{\circ}\text{C}$; 1=325 $^{\circ}\text{C}$ 6 min; total run time 31 min; injection mode: splitless, purge time 0.75 min; injection volume: 1 μL .

The results were corrected by using a standard mixture of five TAG (20% each one) with purity of over 99% (Sigma 178-11), concentration of 20 mg mL^{-1} in hexane of tricaprilyn, C24; tricaprín, C30; trilaurín, C36; trimiristín, C42; tripalmitín, C48. To identify and quantify the TAG, a comparison was made of the chromatograms (retention times and peak areas) obtained from the milk fat with the chromatogram of the standard mixture. The percentages of TAG obtained were normalized according to the correction factors determined by the standards C24, C30, C36, C42 and C48, considering that the C36 (trilaurin) is completely recovered from the column. The correction factors for each of the remaining TAG were calculated from the following equation (Pinto *et al.*, 1987):

$$f_i = (C_{si} / C_1) \times (A_1 / A_{si})$$

where, f_i = correction factor of the TAG i ; A_1 = area of trilaurin; A_{si} = area of the standard TAG i ; C_1 = concentration (mg mL^{-1}) of trilaurin; C_{si} = concentration (mg mL^{-1}) of the standard TAG i . The correction factors were determined when 1 μL of the standard mixture of TAG was injected seven times. A simple regression analysis was made, taking as dependent variable the

factores de corrección se determinaron inyectando siete veces 1 μL de la mezcla estándar de TAG. Se realizó un análisis de regresión simple, tomando como variable dependiente el tiempo de retención de cada pico de TAG y como variable independiente el número de carbonos correspondiente. La ecuación de la recta encontrada se usó para determinar los tiempos de retención del resto de TAG. El intervalo de los factores de corrección fue 0.96 a 1.15, el cual es aceptado para la corrección de los valores de TAG (Pinto *et al.*, 1987). Factores de corrección mayores a 1.15 son insatisfactorios y se aumenta el flujo del gas de arrastre para obtener factores aceptables.

Descripción de datos y variables

Se definieron las variables independientes (x) como porcentaje de TAG con número de carbono j . Se formaron dos grupos de datos: 1) grasas lácteas: 14 variables, desde el TAG de C28 al C54; 2) grasas no lácteas: 4 a 6 variables desde el TAG de C36 a C56, según el tipo de grasa estudiada.

Para el análisis de regresión lineal múltiple (RLM) se definió Y como: grado de pureza que contiene una grasa láctea y, por tanto, se trata de una variable categórica. Así, se asignó un valor de 100 para definir la grasa láctea pura, debido a que se encuentra 100% pura (0% adulterada). Así, al probar la ecuación de regresión encontrada en las grasas lácteas adulteradas de 5, 10, 15 y 20% la respuesta Y fuera 95, 90, 85 y 80. El valor de 100 es arbitrario y elegido porque es fácil interpretar la respuesta cuando se trata de grasas lácteas adulteradas.

Población de datos

Para definir los grupos utilizados en el análisis de RLM se consideraron diferentes niveles de adulteración, empleando como adulterante cada una de las GNL, como sigue:

Grupo 1, muestras de grasa láctea pura (0% de adulteración); Grupo 2, muestras adulteradas en 5% (95% GL y 5% GNL); Grupo 3, muestras adulteradas en 10% (90% GL y 10% GNL); Grupo 4, muestras adulteradas en 15% (85% GL y 15% GNL); Grupo 5, muestras adulteradas en 20% (80% GL y 20% GNL).

Preparación de muestras adulteradas

El procedimiento para las muestras de grasa láctea pura, adulteradas en diferentes niveles con las grasas no lácteas, se basó en la siguiente fórmula de simulación (Timms, 1980; Pinto *et al.*, 2002):

$$C_i^{MEZ} = x C_i^{GNL} + (1 - x) C_i^{GLP}$$

donde, x = fracción de grasa no láctea; C_i = porcentaje de TAG con número de carbono i ; MEZ , GNL , GLP = mezcla, grasa no láctea y grasa láctea pura.

El procedimiento de aplicación de la fórmula puede explicarse más fácilmente a través de un ejemplo: suponiendo que la GLP, para la muestra i fue adulterada en 10% con GNL, y que el TAG

retention time of each peak of TAG, and as independent variable the corresponding number of carbons. The equation of the straight line found was used to determine the retention times of the rest of TAG. The interval of the correction factors was 0.96 to 1.15, which is accepted for the correction of the values of TAG (Pinto *et al.*, 1987). Correction factors higher than 1.15 are unsatisfactory, and the carrier gas flow is increased to obtain acceptable factors.

Description of data and variables

The independent variables (x) were defined as percentage of TAG with number of carbon j . Two groups of data were formed: 1) milk fats: 14 variables, from TAG of C28 to C54; 2) non-milk fats; 4 to 6 variables from TAG of C36 to C56, depending on the type of fat studied.

For the analysis of multiple linear regression (MLR), Y was defined as: degree of purity contained by a milk fat, and therefore, is a categorical variable. Thus, a value of 100 was assigned to define pure milk fat, due to the fact that it is 100% pure (0% adulterated). Thus, when testing the regression equation found in the adulterated milk fats of 5, 10, 15 and 20%, the Y response was 95, 90, 85 and 80. The value 100 is arbitrary and chosen because it is easy to interpretate the response when adulterated milk fats are involved.

Population of data

To define groups used in the MLR analysis different levels of adulteration were considered, using as adulterant each one of the NMF as follows:

Group 1, samples of pure milk fat (0% adulteration); Group 2, adulterated samples by 5% (95% MF and 5% NMF); Group 3, adulterated samples by 10% (90% MF and 10% NMF); Group 4, adulterated samples by 15% (85% MF and 15% NMF); Group 5, adulterated samples by 20% (80% MF and 20% NMF).

Preparing adulterated samples

The procedure for the samples of pure milk fat, adulterated in different levels of non-milk fats, was based on the following simulation formula (Timms, 1980; Pinto *et al.*, 2002):

$$C_i^{MIX} = x C_i^{NMF} + (1 - x) C_i^{PMF}$$

where, x = non-milk fat fraction; C_i = percentage of TAG with carbon number i ; MIX , NMF , PMF = mixture, non-milk fat and pure milk fat.

The application procedure of the formula can be more easily explained through an example: assuming that the PMF for sample i was adulterated in 10% with NMF , and that the TAG with carbon number 40 (C40) is present in the PMF in 11.25% and in the NMF in 0.75%, then the % of the C40 in the mixture is:

con carbono número 40 (C40) está presente en la GLP en 11.25% y en la GNL en 0.75%, entonces el % del C40 en la mezcla es:

$$C40^{MEZ} = (0.1)(0.75)^{GNL} + (1 - 0.1)(11.25)^{GLP} = 10.22$$

Técnicas estadísticas utilizadas

Exploración de datos, estadística descriptiva, análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey, regresión lineal simple y múltiple. Se usó el paquete estadístico SPSS™ (1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Triacilgliceroles presentes en grasa láctea

Las condiciones cromatográficas permitieron obtener en grasa de leche cruda picos bien desarrollados desde los TAG de peso molecular (PM) bajo (C28 a C32) hasta los de PM alto (C34 a C54). Los perfiles presentaron un comportamiento bimodal, la primera moda se presentó en C38, y la segunda en C52; C44 fue el límite entre ambas zonas modales (Figura 1). Estos resultados son semejantes a los publicados por Precht (1992), Destailast *et al.* (2006) y Fontecha *et al.* (2006).

Los valores medios y las desviaciones estándar de las variables C28 a C54 para las tres áreas de muestreo se presentan en el Cuadro 1. Hubo significancia estadística para los TAG C28, C40, C42, C44, C46, C50 y C52 de las grasas lácteas del D.F. y el Estado de México. Para el Estado de Hidalgo se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en C28 con respecto al D.F., y en el conjunto de C40, C42, C44, C50 y C52 con relación al Estado de México. Por tanto, para

$$C40^{MIX} = (0.1)(0.75)^{NMF} + (1 - 0.1)(11.25)^{PMF} = 10.22$$

Statistical methods employed

Exploration of data, descriptive statistics, variance analysis followed by the Tukey test, simple and multiple linear regression were the statistical methods employed. The statistical package used was SPSS™ (1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Triacylglycerols present in milk fat

The chromatographic conditions made it possible to obtain well developed peaks in raw milk fat from the TAG of low (C28 to C32) molecular weight (MW) to those of high (C34 to C54) MW. The profiles presented a bimodal behaviour, the first mode appeared in C38, and the second in C52; C44 was the limit between the two modal zones (Figure 1). These results are similar to those published by Precht (1992), Destailast *et al.* (2006) and Fontecha *et al.* (2006).

The mean values and the standard deviation of the variables C28 to C54 for the three sampling areas are shown in Table 1. There was statistical significance for TAG C28, C40, C42, C44, C46, C50 and C52 of the milk fats of the Federal District and the State of Mexico. For the State of Hidalgo, significant difference was found ($p \leq 0.05$) in C28 with respect to the Federal District, and in the group of C40, C42, C44, C50 and C52 with respect to the State of México. Therefore, for the States of México and Hidalgo, there is different behaviour in the TAG which form

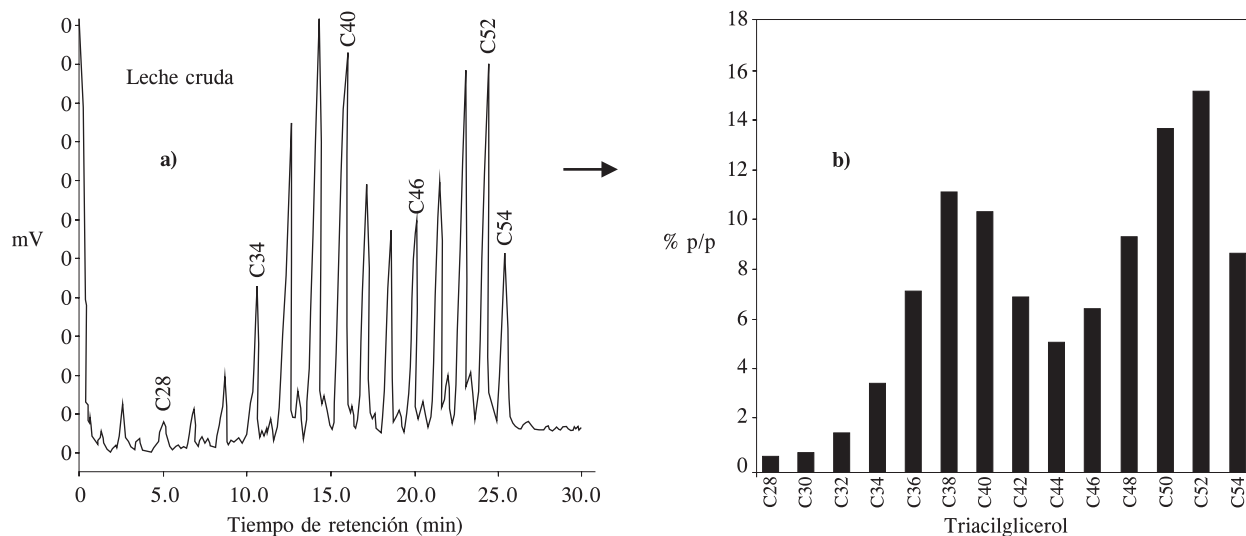


Figura 1. a) Cromatograma de triacilgliceroles de grasa láctea auténtica; b) gráfica del comportamiento bimodal. Figure 1. a) Chromatogram of triacylglycerols of authentic milk fat; b) graph of the bimodal behaviour.

los Estados de México e Hidalgo hay comportamiento diferente en los TAG que forman el valle de la bimodal (Figura 1). La dispersión de los datos con respecto a las medias se calculó con la desviación estándar, alcanzando hasta tres veces lo informado por Timms (1980), Pinto *et al.* (1987) y Fontecha *et al.* (2006) para grasas lácteas australianas, chilenas y españolas.

Los intervalos de la composición global de TAG (% p/p) de grasa de leches producidas en las tres áreas de muestreo y otros reportados en la literatura se describen en el Cuadro 2. De acuerdo con las estadísticas obtenidas para cada área, se consideró que estos valores son predictores de la composición triglicéridica de la grasa de leche producida en el Altiplano Mexicano. La variabilidad en los resultados del presente trabajo fue mayor que en la de resultados publicados por investigadores de otros países (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 se presentan los valores medios de TAG (% p/p) de las GNL estudiadas. El aceite de pescado presentó una mezcla compleja con TAG entre C46 y C56, con una proporción de 70.59% para el conjunto de C50, C52 y C54, y presenta AG con longitud de cadena C14 a C22 y con diferentes grados de insaturación. Así, como la grasa de leche, ofrece una gran cantidad de especies moleculares (Pinto *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 2000). La manteca se caracterizó por que el conjunto de C50, C52 y C54 alcanzó 97.61%, mientras que en el sebo los TAG C50, C52

the valley of the bimodal (Figure 1). The dispersal of the data with respect to the means was calculated with the standard deviation, reaching as much as three times what was reported by Timms (1980), Pinto *et al.* (1987) and Fontecha *et al.* (2006) for Australian, Chilean and Spanish milk fats.

The intervals of the global composition of TAG (% p/p) of fat in milk produced in the three sampling areas and others reported in the literature are described in Table 2. According to the statistics obtained for each area, it was considered that these values are predictors of the triglyceric composition of the fat in milk produced in the Mexican Highlands. The variability of the results of our study was higher than in that of the results published by investigators of other countries (Table 2).

The mean values of TAG (% p/p) of the NMF studied are shown in Table 3. Fish oil presented a complex mixture with TAG between C46 and C56, with a proportion of 70.59% for the group of C50, C52 and C54, and presents FA with chain length C14 to C22 and with different degrees of insaturation. Thus, like milk fat, it offers a large amount of molecular species (Pinto *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 2000). The lard was characterized by the fact that the group of C50, C52 and C54 reached 97.61%, while in tallow the TAG C50, C52 and C54 represented 85.43%. The vegetable oils had the highest proportion in the sum of C52 and C54, the minimum value was for sunflower oil (92.15%) and the maximum for canola oil (97.61%). These results are due to the fact that the content of long chain FA in the molecule of the TAG is high, principally saturated and unsaturated FA with 16 and 18 carbons (Kallio *et al.*, 2001; Destailast *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Niveles medios de triacilglicérols (% p/p) en leche cruda de tres áreas de muestreo del Altiplano Mexicano.

Table 1. Mean levels of triacylglycerols (% p/p) in raw milk of three areas of sampling of the Mexican Highland.

TAG	D.F. (n=49)		Estado de México (n=107)		Hidalgo (n=60)	
	Media	D. E. †	Media	D. E.	Media	D. E.
C28	0.53a	0.18	0.39b	0.19	0.44b	0.21
C30	0.57a	0.35	0.53a	0.21	0.65a	0.25
C32	1.48a	0.69	1.33a	0.48	1.53a	0.40
C34	3.43a	1.09	3.40a	1.03	3.40a	0.80
C36	7.12a	1.65	7.15a	1.66	7.07a	1.41
C38	11.40a	2.02	10.76a	2.12	11.62a	1.80
C40	11.38a	2.90	9.49b	3.02	11.16a	3.79
C42	7.92a	3.07	6.01b	2.87	7.86a	3.85
C44	5.62a	1.63	4.70b	1.53	5.50a	1.85
C46	7.03a	1.62	6.16b	1.24	6.57ab	1.27
C48	9.67a	2.01	9.42a	1.23	8.94a	1.34
C50	12.91b	3.38	14.53a	2.80	12.86b	3.62
C52	13.02b	4.42	16.68a	5.24	14.23b	5.29
C54	7.91a	3.69	9.75a	3.93	8.18a	2.94

Letras diferentes en una fila indican diferencia significativa (p≤0.05).

† D. E. = desviación estándar.

Detection of non-milk fat in milk fat, multiple regression and its application in the detection of adulterations in milk fat

For the optimum use of the MLR analysis, a step-by-step selection was made of the potentially predictive variables. The equations found for the criterion (Y = 100, arbitrary value assigned to authentic MF), as well as the standard errors and the determination coefficients were as follows:

- 1) Fish oil:
 $Y = 1.71C42 + 11.76C44 - 1.93C46 + 3.13C52 - 0.25C54$; standard error=4.30; $R^2=0.99$
- 2) Canola and sunflower oils, tallow:
 $Y = 4.24C38 - 2.18C40 + 2.33C42 + 2.19C44 - 0.03C48 + 2.86C50 - 0.69C52 + 2.20C54$; standard error=1.06; $R^2=0.99$

Cuadro 2. Intervalos de concentraciones de triacilglicérols (% p/p) presentes en grasas lácteas de varios países.
Table 2. Intervals of concentrations of triacylglycerols (% p/p) present in milk fat of various countries.

TAG	México	España ^a	EE.UU. ^b	Bélgica ^c	Alemania ^d	Chile ^e
C28	0.0 - 1.2	0.5 - 0.7	0.3 - 1.3	0.5 - 0.8	0.4 - 0.8	0.3 - 1.4
C30	0.1 - 2.4	0.9 - 1.2	0.7 - 1.5	0.9 - 1.6	0.8 - 1.6	0.6 - 2.1
C32	0.1 - 4.8	1.9 - 2.7	1.8 - 4.0	2.0 - 3.3	1.6 - 3.8	1.7 - 3.5
C34	1.5 - 7.2	4.7 - 6.1	4.0 - 8.0	4.8 - 6.5	3.9 - 7.9	4.6 - 6.9
C36	2.3 - 13.6	9.1 - 10.7	9.0 - 14.0	9.3 - 11.5	8.2 - 13.8	9.0 - 13.1
C38	6.7 - 19.0	11.6 - 12.6	10.0 - 15.0	11.9 - 13.2	10.0 - 14.0	13.7 - 15.7
C40	5.7 - 19.4	9.1 - 10.4	9.0 - 13.0	9.7 - 10.9	8.6 - 10.8	10.9 - 13.7
C42	2.9 - 14.8	5.8 - 6.8	6.0 - 7.0	6.1 - 7.6	5.1 - 8.6	6.7 - 8.4
C44	2.5 - 8.8	5.1 - 6.7	5.0 - 7.5	5.5 - 7.4	4.2 - 8.9	5.2 - 6.7
C46	3.5 - 10.0	6.1 - 8.1	5.0 - 7.0	6.5 - 8.1	5.2 - 9.7	5.4 - 7.1
C48	5.2 - 13.2	8.2 - 10.3	7.0 - 11.0	8.4 - 9.4	7.9 - 10.6	6.2 - 8.5
C50	5.7 - 18.8	11.1 - 12.5	8.0 - 12.0	9.9 - 12.5	8.2 - 13.4	8.6 - 12.3
C52	5.4 - 27.1	9.5 - 13.5	7.0 - 11.0	7.9 - 12.7	5.1 - 15.5	8.3 - 13.2
C54	2.8 - 18.6	4.1 - 8.4	1.0 - 5.0	3.2 - 7.5	1.5 - 11.1	2.3 - 7.4

a: Fontecha *et al.*, 2006 (leche cruda); b: Jensen, 2002 (leche cruda); c: Van Renterghem, 1997 (mantequilla); d: Precht, 1991 (mantequilla); e: Pinto *et al.*, 1987 (leche cruda).

Cuadro 3. Niveles medios de triacilglicérols (% p/p) en grasas no lácteas.
Table 3. Mean levels of triacylglycerols (% p/p) in non-milk fats.

Muestra	C36	C44	C46	C48	C50	C52	C54	C56
Aceites:								
Pescado (n=2)	n.d.	n.d.	2.63	11.38	20.98	25.59	24.02	15.39
Canola (n=2)	1.99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15.09	77.06	5.86
Girasol (n=2)	1.83	n.d.	n.d.	n.d.	2.11	20.46	75.60	n.d.
Manteca (n=2)								
Sebo (n=2)	n.d.	n.d.	n.d.	2.39	18.04	61.88	17.69	n.d.
	n.d.	n.d.	2.69	11.88	24.80	36.25	24.38	n.d.

n.d. <0.01 (% p/p).

y C54 representaron 85.43%. Los aceites vegetales tuvieron la mayor proporción en la suma de C52 y C54, el valor mínimo fue para el aceite de girasol (92.15%) y el máximo para canola (97.61%). Estos resultados se deben a que el contenido de AG de cadena larga en la molécula del TAG es alto, principalmente AG saturados e insaturados con 16 y 18 carbonos (Kallio *et al.*, 2001; Destailast *et al.*, 2006).

Detección de grasa no láctea en grasa láctea regresión múltiple y su aplicación en la detección de adulteraciones en grasa láctea

Para la utilización óptima del análisis de RLM se seleccionaron paso a paso las variables potencialmente predictoras. Las ecuaciones encontradas para el criterio ($Y=100$, valor arbitrario asignado a GL auténtica), así como los errores estándar y los coeficientes de determinación fueron:

- 1) Aceite de pescado:
 $Y=1.71C42+11.76C44-1.93C46+3.13C52-0.25C54$; error estándar=4.30; $R^2=0.99$

- 3) Lard:
 $Y=2.41C34+1.37C36-0.30C38+2.67C40+3.63C48-0.69C50+1.70C52+0.71C54$;
 standard error =0.81; $R^2=0.99$

According to the analysis of MLR, the errors present an approximately normal distribution. Thus, the confidence intervals of the prediction for the averages of the pure milk fats with respect to the type of adulterating fat were formed using the following formula:

$$100 \pm t_{(n-p); 0.975} S_e$$

where, 100 = constant for pure milk fat; t = value of the t statistic; S_e = standard error of the regression.

The confidence intervals with 95% probability were:

- 1) Fish oil: (91.49-108.51)
 2) Canola and sunflower oils, tallow: (97.9-102.1)
 3) Lard: (98.4-101.6).

- 2) Aceites de canola, girasol, sebo:
 $Y=4.24C38-2.18C40+2.33C42+2.19C44-0.03C48+2.86C50-0.69C52+2.20C54$; error estándar=1.06; $R^2=0.99$
- 3) Manteca:
 $Y=2.41C34+1.37C36-0.30C38+2.67C40+3.63C48-0.69C50+1.70C52+0.71C54$; error estándar=0.81; $R^2=0.99$

De acuerdo con el análisis de RLM, los errores presentan distribución aproximadamente normal. De esta manera, los intervalos de confianza de la predicción para los promedios de las GL puras con relación al tipo de grasa adulterante, se formaron usando la siguiente fórmula:

$$100 \pm t_{(n-p); 0.975} S_e$$

donde, 100 = constante para grasa láctea pura; t = valor del estadístico t ; S_e = error estándar de la regresión.

Los intervalos de confianza con 95% de probabilidad fueron:

- 1) Aceite de pescado: (91.49-108.51)
- 2) Aceites de canola, girasol, sebo: (97.9-102.1)
- 3) Manteca: (98.4-101.6).

De los 216 casos de GL pura, 93.4 a 97.4% estuvieron dentro de los intervalos de confianza de la predicción ($p \leq 0.05$) (Cuadro 4).

Para probar la sensibilidad de las ecuaciones de regresión (1 a 3) se calcularon los valores YMEZ, es decir, la respuesta dada por las ecuaciones (1 a 3) al introducirles una mezcla adulterada en diferentes niveles. Luego se determinó el número de muestras dentro de los intervalos de confianza (1 a 3) definidos para las GL puras con relación al adulterante. En el Cuadro

Of the 216 cases of pure MF, 93.4 to 97.4% were within the confidence intervals of the prediction ($p \leq 0.05$) (Table 4).

To test the sensitivity of the regression equations (1 to 3), the values YMEZ were calculated, that is, the response given by the equations (1 to 3) when an adulterated mixture at different levels is introduced. Next, the number of samples was determined within the confidence intervals (1 to 3) defined for the pure MF with respect to the adulterant. The percentages of correct classification in the adulteration of the MF are shown in Table 4.

Taking into account the confidence intervals for pure MF at a level of 95%, 100% of the samples adulterated with 10, 15 and 20% of canola and sunflower oils and lard were correctly classified, that in all of the values YMEZ were outside of the intervals defined for pure fats. With fish oil and tallow as adulterants, acceptable levels of correct classification were not obtained. For the samples adulterated at 5%, 75.3% of the total was correctly classified. When the adulterants were lard and canola and sunflower oils, the levels of correct classification were close to those obtained by Timms (1980) and Pinto *et al.* (1987), who used multiple regression analysis to identify adulterations of MF with foreign fats.

CONCLUSIONS

The analysis by gas chromatography of the bovine milk fat produced in the Mexican Highland revealed the presence of triacylglycerols of C28 to C54. When studies were made of mixtures (100-0, 95-5, 90-10, 85-15 and 80-20) of milk fat with non-milk fat of vegetable origin (canola and sunflower oils) and of animal origin (fish oil, lard and tallow), the profiles of triacylglycerols were found to be modified. Based on the above, through an analysis of multiple linear regression and using potential variables of prediction of adulteration: C42, C44, C46, C52 and C54 (fish

Cuadro 4. Niveles de adulteración con grasas no lácteas y porcentajes de clasificación correcta según ecuaciones de regresión lineal múltiple.

Table 4. Levels of adulteration with non-milk fats and percentages of correct classification according to equations of multiple linear regression.

	Aceites de:			Manteca	Sebo
	Pescado	Canola	Girasol		
	Porcentajes de clasificación correcta (%):				
Grasa láctea pura (n=216)	94.5	95.3	96.6	97.3	95.9
5% adulteración	35.5	73.2	97.6	79.4	9.1
10% adulteración	53.2	98.5	100.0	100.0	32.3
15% adulteración	56.5	100.0	100.0	100.0	53.5
20% adulteración	64.3	100.0	100.0	100.0	63.4

4 están los porcentajes de clasificación correcta en la adulteración de la GL.

Tomando en cuenta los intervalos de confianza para GL puras a un nivel de 95%, se clasificó correctamente 100% de las muestras adulteradas con 10, 15 y 20% con aceites de canola, girasol y manteca, es decir, todos los valores YMEZ quedaron fuera de los intervalos definidos para grasas puras. Con el aceite de pescado y sebo como adulterantes, no se lograron niveles aceptables de clasificación correcta. Para las muestras adulteradas en 5%, se clasificó correctamente 75.3% del total. Cuando los adulterantes fueron manteca y aceites de canola y girasol los niveles de clasificación correcta fueron cercanos a los obtenidos por Timms (1980) y Pinto *et al.* (1987), quienes utilizaron el análisis de regresión múltiple para identificar adulteraciones de la GL con grasas extrañas.

CONCLUSIONES

El análisis por cromatografía de gases de la grasa de leche de vaca producida en el Altiplano Mexicano, reveló la presencia de triacilglicérols de C28 hasta C54. Cuando se estudiaron mezclas (100-0, 95-5, 90-10, 85-15 y 80-20) de grasa láctea con grasa no láctea de origen vegetal (aceites de canola y girasol) y de origen animal (aceite de pescado, manteca y sebo de vacuno) se encontraron modificados los perfiles de triacilglicérols. Con base en ello, a través de un análisis de regresión lineal múltiple y usando variables potenciales de predicción de adulteración: C42, C44, C46, C52 y C54 (aceite de pescado); C40, C42, C44, C50, C52 y C54 (aceites de canola y girasol y sebo) y C34, C36, C38, C40, C48, C50, C52 y C54 (manteca), se desarrollaron ecuaciones que detectaron 75.3 y 98.11% de los casos estudiados, para adulteraciones de 5 y 10%.

LITERATURA CITADA

Boghra, V. R., and V. N. Borkhatriya. 2004. Detection of vegetable oils in milk and milk fat by a rapid method. *J. Food Sci. Technol-Mysore* 41: 461-464.

Destailats, F., M. de Wispelaere, F. Joffre, P. A. Golay, B. Hug, F. Giuffrida, L. Fauconnot, and F. Dionisi. 2006. Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols: application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils. *J. Chromatogr. A* 1131: 227-234.

Díaz, G., R. Gutiérrez, N. Pérez, S. Vega y León, M. González, G. Prado, G. Urbán, A. Ramírez, y M. Pinto. 2002. Detección de adulteraciones en la grasa de leche pasteurizada mexicana. *Rev. Salud Anim.* 24: 54-59.

FIL/IDF (International Dairy Federation). 1970. Detection of vegetable fat in milk fat by gas-liquid chromatography of sterols. *Bull.* 54. Brussels, Belgium. 6 p.

FIL/IDF. International Dairy Federation. 1995. Milk and milk products. Guidance sampling: FIL-IDF Standard 50C. Brussels, Belgium. 19 p.

oil); C40, C42, C44, C50, C52 and C54 (canola and sunflower oils and tallow) and C34, C36, C38, C40, C48, C50, C52 and C54 (lard), equations were developed that detected 75.3 and 98.11% of the cases studied, for adulterations of 5 and 10%.

—End of the English version—



Firestone, P. 1986. Triglycerides in fats and oils gas chromatography method, IUPAC-AOAC method. *J. Assoc. Anal. Chem.* 69: 346-365.

Fontecha, J., G. T. Mayo, and M. Juárez. 2006. Triacylglycerol composition of protected designation of origin cheeses during ripening. *Authenticity of milk fat. J. Dairy Sci.* 89: 882-887.

Frank, C., E. H. Smith, H. E. Brauwn, A. Holdrinet, and J. W. Mc Wade. 1975. Organochlorine insecticides and industrial pollutants in the milk supply of the Southern Region of Ontario, Canada. *J. Milk Food Technol.* 38: 65-72.

Gutiérrez, R., G. G. Díaz, S. Vega y León, I. Méndez, G. H. J. Delgadillo, F. N. Pérez, y C. M. Pinto. 2004. Determinación de los niveles de triacilglicérols (% p/p) presentes en grasas de origen animal y vegetal. *Agro Sur* 32: 68-75.

Jensen, R. J. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85: 295-350.

Juárez, M. 1991. Criterios analíticos para establecer la genuinidad de la grasa de leche. *Rev. Española de Lechería* 30-34.

Kallio, H., K. J. Yli, J. P. Kurvinen, O. Sjövall, and R. Tahvonon. 2001. Regioisomerism of triacylglycerols in lard, tallow, chicken skin, palm oil, palm olein, palm stearin, and a transesterified blend of palm stearin and coconut oil analyzed by tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3363-3369.

Kumar, A., L. Darshan, S. Raman, and S. Rajan. 2002. Recent trends in detection of adulteration in milk fat: a review. *Ind. J. Dairy Sci.* 55: 319-330.

Norma Oficial Mexicana. NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. México. 46 p.

Norma Mexicana. NMX-F-707-COFOCALEC-2004. Sistema producto leche-Determinación de fitosteroles en leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado, queso, crema y mantequilla, por cromatografía de gases-Método de prueba. México. 14 p.

Norma Mexicana. NMX-F-718-COFOCALEC-2006. Sistema producto leche-Alimentos-Lácteos-Guía para el muestreo de leche y productos lácteos. México. 32 p.

Perotti, M.C., S. R. Rebecchi, and S. M. Bernal. 2005. Detection of adulterations in milk fat by multiple regression analysis of total fatty acids profile. *Grasas y Aceites* 56: 67-74.

Pinto, M. C., P. Fernández de la Reguera, y B. S. Villanueva. 1987. Detección y cuantificación de adulteraciones en grasa láctea. *Análisis de regresión múltiple. Agro Sur* 15: 32-38.

Pinto, M. C., M. O. Contreras, E. R. Carrasco, C. C. Brito, L. H. C. Molina, K. A. Shun KA, y S. L. Vega. 2002. Determinación de la autenticidad de grasas lácteas. *Análisis discriminante lineal de triacilglicéridos. Agro Sur* 30: 59-67.

Precht, D. 1991. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 43: 219-242.

Precht, D. 1992. Detection of foreign fat in milk fat. *Lebensm. Unters. Forsch.* 194: 107-114.

Romero, N. P., P. C. Robert, L. S. Masson, y R. L. Pineda. 2000. Composición en ácidos grasos y proximal de siete especies de pescado de Isla de Pascua. *Arch. Latin. Nutr.* 50: 304-308.

- SPSS. 1997. Guía del Usuario del Sistema Base de SPSS™ 7.5 para Windows. Irlanda. 462 p.
- Timms, R. E. 1980. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. *J. Dairy Res.* 47: 295-303.
- Ulberth, F., and M. Buchgraber. 2000. Aunthenticity of fat and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 687-694.
- Van Renterghem, R. 1997. The triglyceride composition of belgiam butter in view of EU controls on milk fat. *Milchwissenschaft* 52: 79-82.
- Vega, S., N. Pérez, M. Pinto, G. Díaz-González, R. Gutiérrez, G. Urbán, M. M. González, G. Prado, y A. Ramírez 1999. Composición en ácidos grasos y triglicéridos de leche pasteurizada comercializada en la Ciudad de México. *Rev. Salud Anim.* 21: 1-4.