

Predicción molecular de los triglicéridos de la grasa láctea de oveja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa

Por A.I. Nájera¹, Y. Barcina³, M. de Renobales² y L.J.R. Barron¹

1. Tecnología de los Alimentos y 2. Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Paseo de la Universidad, 7. 01006 Vitoria-Gasteiz.
3. Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra Campus Arrosadía, s/n. 31006 - Pamplona.

RESUMEN

Predicción molecular de los triglicéridos de la grasa láctea de oveja por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa.

El análisis por cromatografía líquida de alta eficacia de los triglicéridos de la leche de oveja obtuvo 115 picos individuales. Los triglicéridos componentes de los picos cromatográficos fueron estimados mediante ecuaciones matemáticas que relacionaban el log k' de los picos cromatográficos con las variables moleculares, número equivalente de carbonos (NEC) de los posibles triglicéridos, y longitud de cadena (LC) y número de dobles enlaces (DE) de cada uno de los ácidos grasos del triglicérido. Para la estimación de la composición triglicérida de la grasa láctea se consideraron solamente los 12 ácidos grasos mayoritarios obtenidos en el análisis por cromatografía de gases de la fracción triglicérida total.

Los triglicéridos que presentaron altos porcentajes según el cálculo de la composición al azar fueron considerados los principales componentes moleculares cuando en un pico cromatográfico se predecía más de un triglicérido. Los triglicéridos estimados más abundantes en la grasa láctea de oveja fueron $C_{4:0}-C_{16:0}-C_{16:0}$, $C_{6:0}-C_{14:0}-C_{16:0}$, $C_{4:0}-C_{14:0}-C_{16:0}$, $C_{4:0}-C_{16:0}-C_{18:1}$ y $C_{6:0}-C_{14:0}-C_{18:1}$.

PALABRAS-CLAVE: Cromatografía líquida de alta eficacia - Leche de oveja - Predicción molecular - Triglicérido.

SUMMARY

Molecular prediction of the triglycerides of sheep milk fat by reverse-phase high-performance liquid chromatography.

115 individual peaks were obtained by high-performance liquid chromatography of the sheep milk fat. Triglyceride components of the chromatographic peaks were predicted by means of mathematical equations relating the log k' of the chromatographic peaks to the molecular variables, equivalent carbon number (ECN) of the possible triglycerides, and chain length (CL) and number of double bounds (DB) of each of the fatty acids of the triglyceride. The 12 main fatty acids obtained by gas chromatography of the total triglyceride fraction were used to estimate the triglyceride composition of the sheep milk fat.

The triglycerides presenting high random percentages were considered the principal molecular species when more than one triglyceride were predicted in a chromatographic peak. The main estimated triglycerides of the sheep milk fat were $C_{4:0}-C_{16:0}-C_{16:0}$, $C_{6:0}-C_{14:0}-C_{16:0}$, $C_{4:0}-C_{14:0}-C_{16:0}$, $C_{4:0}-C_{16:0}-C_{18:1}$ and $C_{6:0}-C_{14:0}-C_{18:1}$.

KEY-WORDS: High-performance liquid chromatography - Molecular prediction - Sheep milk - Triglyceride.

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase inversa no acuosa ha sido uno de los métodos más utilizados para la separación de mezclas de triglicéridos de grasas naturales. Sin embargo, la identificación molecular continúa siendo una de las principales limitaciones del análisis cromatográfico de los triglicéridos debido, por una parte, a la escasez de sustancias puras comerciales para un amplio número de triglicéridos mixtos, y por otra, a la falta de resolución de pares críticos de triglicéridos con características moleculares muy similares. Así pues, distintos investigadores han trabajado en el desarrollo de sistemáticas de predicción molecular de los triglicéridos de grasas naturales. Todas estas sistemáticas se han basado en la búsqueda de relaciones lineales entre parámetros de retención y/o selectividad cromatográficos y variables moleculares específicas para caracterizar a los triglicéridos (Wada *et al.*, 1977; Herslöf *et al.*, 1979; Takahashi *et al.*, 1984, 1985; Barron y Santa-María, 1989).

Wada *et al.*, (1977) fueron los primeros investigadores en establecer una relación lineal entre los factores de capacidad (k' ; $k' = tr-t_0/tr$, donde tr es el tiempo de retención en la fase estacionaria, y t_0 el tiempo muerto) de los picos cromatográficos y el denominado número de partición (NP), definido por ellos como $NP = NC - 2ND$, donde NC es el número total de carbonos y ND el número total de dobles enlaces presentes en los ácidos grasos del triglicérido. A partir de estos primeros estudios, Herslöf *et al.*, (1979) estimaron de forma teórica el número equivalente de carbonos (NEC; $NEC = NC - aND$) de triglicéridos insaturados, conociendo su tiempo de retención relativo (tr' ; $tr' = tr-t_0$), a partir de una relación lineal experimental entre los tr' y el NC de triglicéridos saturados. El NEC tiene un significado análogo al NP aunque la constante a depende de cada sistema cromatográfico (Barron y Santa-María, 1989). Ambas variables se utilizan habitualmente para caracterizar a los triglicéridos, aunque el NEC permite diferenciar triglicéridos con el mismo NP.

Profundizando en el significado del NEC, otros investigadores han indicado que el comportamiento cromatográfico de los triglicéridos en fase inversa depende no sólo del NC y ND sino también del número de ácidos insaturados (NAI) de la molécula, ya que triglicéridos con igual valor de NEC eluyen en orden creciente de número de ácidos saturados constituyentes (Hierro *et al.*, 1992; Nájera *et al.*, 1998).

Otros investigadores han propuesto otras variables análogas al NP y NEC para caracterizar molecularmente a los triglicéridos, como son el número teórico de carbonos (NTC) o la longitud equivalente de cadena (LEC), estableciendo relaciones lineales entre estas variables moleculares y los factores de capacidad (k') y/o selectividad (α), y estimando con un escaso margen de error la composición triglicéridica de diversas grasas naturales (El-Hamdy y Perkins, 1981; Goiffon *et al.*, 1981; Perrin y Naudet, 1983; Marini y Balestrieri, 1989; Dotson *et al.*, 1992).

La predicción de los triglicéridos de una grasa natural, a partir del NEC, se complica enormemente cuando el número de ácidos grasos componentes de los triglicéridos es elevado, por ejemplo más de 7 ácidos grasos, ya que el número de moléculas posibles, aún considerando las posiciones sn-estereoespecíficas equivalentes, es muy alto (Barron *et al.*, 1990). En este sentido, y como una segunda fase de la sistemática de predicción a partir del NEC, varios autores han propuesto la aplicación de las ecuaciones matemáticas desarrolladas por Takahashi *et al.*, (1984, 1985). Estos investigadores desarrollaron un modelo matricial con seis variables moleculares, correspondientes a la longitud de cadena (LC) y al número de dobles enlaces (DE) de cada uno de los tres ácidos grasos que esterifican al glicerol, considerando equivalentes las posiciones sn-estereoespecíficas. Esta consideración es evidente si se tiene en cuenta que los actuales métodos de análisis por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa no permiten la separación de estereoisómeros. El modelo matricial establece una relación lineal múltiple entre el logaritmo del factor de capacidad (k') de los triglicéridos, y las variables independientes LC y DE. Así pues, varios autores han predicho la composición triglicéridica de distintos tipos de grasas naturales a partir de la composición en ácidos grasos totales de la grasa, del cálculo del NEC y del modelo matricial anteriormente señalado (Takahashi *et al.*, 1986; Barron *et al.*, 1988; Hierro *et al.*, 1992; Nájera *et al.*, 1998).

A la vista de los estudios anteriormente señalados, puede indicarse que la predicción teórica de los triglicéridos de una grasa analizados por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa proporciona una información muy útil para la identificación analítica de los mismos, en particular cuando se trata de una mezcla compleja. Esta predicción propone un número de triglicéridos posibles para cada pico

cromatográfico, mayor o menor según la complejidad de la grasa y el error debido a las ecuaciones matemáticas utilizadas.

La composición triglicéridica de la grasa láctea presenta una enorme complejidad, ya que se han descrito más de 64 ácidos grasos, y si se consideraran solamente aquellos ácidos grasos presentes en la grasa láctea en proporciones superiores al 1%, serían más de 1300 los triglicéridos posibles (Walstra y Jenness, 1987). Uno de los primeros trabajos sobre la composición molecular de los triglicéridos de la leche fue el realizado por Nutter y Privett (1967), en el cual describieron, en el suero de la leche, 168 moléculas que presentaban de forma característica en su composición ácidos grasos de cadena corta. Posteriormente, varios autores han conseguido identificar un número amplio de triglicéridos en la grasa láctea de distintas especies animales. Así Barron *et al.*, (1990) identificaron un total de 116 triglicéridos individuales en la grasa láctea de vaca, oveja y cabra; Gresti *et al.*, (1993) 404 en la grasa láctea de vaca; Spanos *et al.*, (1995) más de 200 en la leche de vaca; y finalmente Ruiz-Sala *et al.*, (1996) identificaron 181 triglicéridos en la grasa de leche de vaca, oveja y cabra. En todos los trabajos anteriores se encontró que triglicéridos que presentaban en su composición ácido butírico constituían uno de los grupos más abundantes de la grasa láctea.

El objetivo de este trabajo es determinar mediante la aplicación de ecuaciones matemáticas de predicción la composición molecular de los triglicéridos de la grasa láctea de oveja, analizados por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Análisis Físico-Químicos

La extracción de la grasa de la leche de oveja para el análisis de los triglicéridos se hizo según la Norma de la Federación Internacional de Lechería (1965), utilizando n-pentano (PANREAC) como disolvente de extracción. Seguidamente, se eliminó el disolvente a vacío a una temperatura de 35 °C, realizándose disoluciones en n-hexano (MERCK) de concentración 30 mg/mL.

Los triglicéridos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficacia según el método propuesto por Nájera *et al.*, (1998), utilizando un equipo cromatográfico compuesto por dos bombas modelos 422M y 422S (KONTRON), inyector modelo 7161 (RHEODYNE), y detector de difusión de luz modelo Sedex 45 (SEDERE). Se utilizaron 2 columnas (20 cm x 4.6 mm) en serie Nucleosil 120 C-18 (MACHERY NAGEL) de 3 μ de tamaño de partícula, y gradiente de elución de acetona (SCHARLAU, calidad HPLC) en acetonitrilo (SCHARLAU, calidad HPLC) desde 0 al 35% en 50 minutos, isocrático du-

rante 20 minutos, gradiente hasta el 80% en 75 minutos e isocrático final durante 10 minutos. La temperatura de la columna fue de 30 °C controlada mediante un baño termostático de agua modelo Precistern (SELECTA). Se inyectaron 10 µl de los extractos de grasa.

El análisis de los ácidos grasos de la fracción triglicéridica total de la grasa láctea se llevó a cabo previa derivatización en los ésteres metílicos correspondientes mediante saponificación con potasa metanólica (PANREAC) (Utrilla *et al.*, 1976), utilizando un cromatógrafo de gases modelo Autosystem (PERKIN-ELMER) equipado con un detector de ionización de llama (FID), y una columna capilar de tubo de sílice fundida (CHROMPACK) de 25 m de longitud y 0.33 mm de diámetro interno, con fase estacionaria químicamente ligada FFAP CB de 0.3 µ de espesor de fase, según describe Nájera *et al.*, (1998). Los ácidos grasos fueron cuantificados según porcentaje de área medio del análisis por triplicado.

Sistemática de predicción

La composición de todos los posibles triglicéridos de la grasa de la leche de oveja se determinó considerando los 12 ácidos grasos mayoritarios presentes en la fracción triglicéridica total, efectuando todas las combinaciones posibles de los ácidos grasos tomados de tres en tres, y considerando equivalentes las tres posiciones de esterificación en la molécula del glicerol.

Para el cálculo del número equivalente de carbonos (NEC) de los triglicéridos se utilizó la expresión $NEC = NC - 2.0ND - 0.2NAI$ donde NC es el número total de carbonos y ND el número total de dobles enlaces de los ácidos grasos constituyentes, y NAI el número de ácidos grasos insaturados en la molécula (Nájera *et al.*, 1998).

Debido a que el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia de los triglicéridos de la grasa de la leche de oveja se llevó a cabo en el mismo laboratorio, equipo y similares condiciones de análisis que el realizado por Nájera *et al.*, (1998), las ecuaciones matemáticas utilizadas para la predicción de los triglicéridos fueron las experimentalmente obtenidas en dicho trabajo.

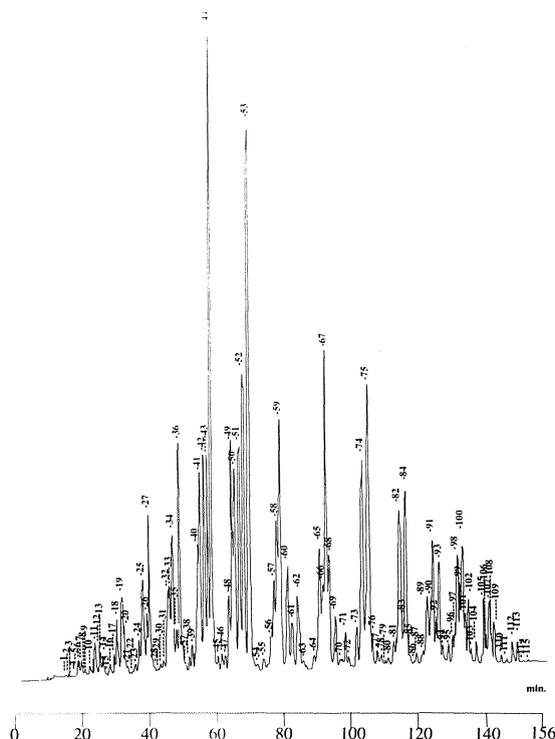
Así pues, la sistemática de predicción consistió en primer lugar en estimar el NEC de los picos obtenidos en el análisis cromatográfico de la muestra de grasa mediante la ecuación que relacionaba el NEC y el log k'. En segundo lugar, se realizó una nueva estimación mediante las ecuaciones matemáticas que relacionaban la LC y DE, de los tres ácidos grasos presentes en los triglicéridos posibles según su valor de NEC, con el log k'.

Finalmente, se utilizó el cálculo de la composición al azar para establecer la mayor probabilidad de la presencia de los triglicéridos en cada pico cromatográfico cuando se predecía más de una molécula.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 12 ácidos grasos mayoritarios obtenidos en el análisis por cromatografía de gases correspondiente a la fracción triglicéridica total de la leche de oveja fueron C_{16:0} (22.91%), C_{18:1} (17.34%), C_{14:0} (10.48%), C_{10:0} (9.57%), C_{18:0} (9.25%), C_{12:0} (4.82%), C_{8:0} (3.47%), C_{6:0} (3.34%), C_{4:0} (3.31%), C_{18:2} (2.32%), C_{15:0} (1.22%) y C_{18:3} (1.11%). Así, el número total de posibles triglicéridos de la grasa láctea, obtenidos como resultado de las combinaciones de dichos 12 ácidos grasos tomados de 3 en 3, y considerando las posiciones *sn*-estereoespecíficas equivalentes, fue de 364.

En la Tabla I se recogen los resultados finales de la aplicación de la sistemática de predicción de los triglicéridos de la grasa láctea de oveja para cada uno de los picos cromatográficos diferenciados en la Figura 1. Como puede observarse, el número de triglicéridos estimados para cada pico cromatográfico osciló entre 8, para los picos 50, 51 y 52, y un sólo triglicérido para 22 de los picos obtenidos. Por otra parte, en 13 de los picos cromatográficos no se estimó ningún triglicérido formado con los ácidos grasos considerados en la predicción. Debe señalarse que en la mayoría de los picos cromatográficos, considerados individualmente, se estimaron triglicéridos con un mismo valor de NEC, excepto para 14 de los picos, lo que puso de manifiesto, por una parte, la gran complejidad de la grasa láctea y por otra, la gran dificultad para separar moléculas con igual valor de NEC.



Además, si en la sistemática de predicción se incluían otros ácidos grasos minoritarios, como C_{16:1}, C_{17:0}, C_{14:1} y C_{13:0}, era posible predecir distintos tipos de triglicéridos para algunos de los picos cromatográficos en los que la predicción a partir de los ácidos grasos mayoritarios no proporcionó ningún resultado.

En los casos en los que la sistemática de predicción asignó más de un triglicérido para un sólo pico cromatográfico se utilizó el cálculo de la composición al azar como indicativo de la mayor o menor probabilidad de la presencia de los triglicéridos en el pico cromatográfico. Así, aunque han sido descritas diferencias significativas entre la composición cuantitativa experimental y la composición teórica al azar para los triglicéridos de grasas naturales (Bugaut y Bezard, 1979; Gresti *et al.*, 1993), esta última puede proporcionar, desde un punto de vista cualitativo, una información muy útil para completar la predicción molecular de los triglicéridos. No obstante, puede observarse también que un número importante de triglicéridos fueron estimados en distin-

tos picos cromatográficos con el mismo valor de NEC asignado, debido a la imposibilidad de conocer a priori el orden de elución de determinados triglicéridos con igual valor de NEC, por ejemplo, triglicéridos trisaturados, o triglicéridos mono o poliinsaturados con el mismo número de ácidos grasos insaturados. Este hecho puso de manifiesto una de las limitaciones importantes de la sistemática de predicción en el caso de grasas complejas constituidas por un alto número de ácidos grasos.

Teniendo en cuenta los resultados de la predicción y el porcentaje de área obtenido para cada uno de los picos cromatográficos (Tabla I), pueden estimarse como triglicéridos principales de la grasa láctea de oveja C_{4:0}-C_{16:0}-C_{16:0}, C_{6:0}-C_{14:0}-C_{16:0}, C_{4:0}-C_{14:0}-C_{16:0}, C_{4:0}-C_{16:0}-C_{18:1} y C_{6:0}-C_{14:0}-C_{18:1}. Estos triglicéridos estaban constituidos por los tres ácidos grasos mayoritarios obtenidos en el análisis de la fracción triglicéridica total C_{16:0}, C_{18:1} y C_{14:0}, combinados con los ácidos grasos de cadena corta C_{4:0} y C_{6:0}.

Tabla I

Resultados de la aplicación de la sistemática de predicción para los triglicéridos (TG) de la grasa láctea de oveja analizados por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa no acuosa

Pico	% Área	NEC calculado	TG estimados	% Al azar	Pico	% Área	NEC calculado	TG estimados	% Al azar
1	0.004	22.344	C4:0-C6:0-C18:3 C6:0-C8:0-C8:0	0.01 0.01	15	0.044	27.931	ninguno	
2	0.009	22.586	C6:0-C8:0-C8:0	0.01	16	0.057	28.249	C4:0-C18:3-C18:3	< 0.01
3	0.003	22.673	C4:0-C8:0-C10:0 C6:0-C8:0-C8:0	0.07 0.01	17	0.140	28.475	C4:0-C10:0-C18:2 C6:0-C8:0-C18:2	0.04 0.02
4	0.001	23.331	ninguno		18	0.059	28.568	C4:0-C10:0-C18:2 C6:0-C8:0-C18:2	0.04 0.02
5	0.011	23.518	C4:0-C8:0-C18:3 C6:0-C6:0-C18:3	0.01 < 0.01	19	0.486	28.956	C8:0-C10:0-C10:0 C6:0-C10:0-C12:0 C4:0-C12:0-C12:0	0.10 0.09 0.02
6	0.015	23.931	C4:0-C10:0-C10:0 C6:0-C8:0-C10:0 C8:0-C8:0-C8:0	0.09 0.07 < 0.01	20	0.177	29.098	C8:0-C10:0-C10:0 C6:0-C10:0-C12:0 C4:0-C12:0-C12:0	0.10 0.09 0.02
7	0.019	24.107	C4:0-C10:0-C10:0 C6:0-C8:0-C10:0 C8:0-C8:0-C8:0	0.09 0.07 < 0.01	21	0.023	29.404	ninguno	
8	0.005	24.526	ninguno		22	0.005	29.680	C4:0-C18:2-C18:3 C6:0-C18:3-C18:3	0.01 < 0.01
9	0.011	25.619	ninguno		23	0.067	30.000	C6:0-C10:0-C18:2 C4:0-C14:0-C18:3 C4:0-C12:0-C18:2 C8:0-C8:0-C18:3	0.04 0.02 0.02 < 0.01
10	0.008	25.849	ninguno		24	0.165	30.313	C4:0-C12:0-C14:0 C8:0-C10:0-C12:0 C10:0-C10:0-C10:0 C6:0-C12:0-C12:0	0.10 0.10 0.09 0.02
11	0.091	26.219	C4:0-C8:0-C18:2 C6:0-C8:0-C18:3	0.02 0.02	25	0.707	30.564	C4:0-C12:0-C14:0 C8:0-C10:0-C12:0 C10:0-C10:0-C10:0 C6:0-C12:0-C12:0	0.10 0.10 0.09 0.02
12	0.059	26.798	C4:0-C10:0-C12:0 C6:0-C10:0-C10:0 C8:0-C8:0-C10:0	0.09 0.09 0.03	26	0.257	30.857	C4:0-C12:0-C14:0 C8:0-C10:0-C12:0 C10:0-C10:0-C10:0 C6:0-C12:0-C12:0	0.10 0.10 0.09 0.02
13	0.050	26.904	C4:0-C10:0-C12:0 C6:0-C10:0-C10:0 C8:0-C8:0-C10:0	0.09 0.09 0.03	27	1.162	31.033	C4:0-C12:0-C14:0 C8:0-C10:0-C12:0 C10:0-C10:0-C10:0 C6:0-C12:0-C12:0	0.10 0.10 0.09 0.02
14	0.058	27.210	ninguno		28	0.023	31.368	C4:0-C15:0-C18:3	< 0.01

Numeración de picos como en la Figura 1.
NEC = Número equivalente de carbonos.

Tabla I
(Continuación)

Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar	Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar
29	0.026	31.599	C4:0-C15:0-C18:3	< 0.01	40	1.546	33.942	C4:0-C18:1-C18:2 C6:0-C18:2-C18:2 C8:0-C18:2-C18:3 C10:0-C18:3-C18:3	0.08 0.01 0.01 < 0.01
30	0.051	31.792	ninguno		41	1.873	34.053	C4:0-C14:0-C18:1 C6:0-C12:0-C18:1 C4:0-C16:0-C18:2 C10:0-C10:0-C18:2 C10:0-C12:0-C18:3 C8:0-C14:0-C18:3	0.36 0.17 0.11 0.06 0.03 0.02
31	0.138	31.953	ninguno		42	1.980	34.276	C4:0-C14:0-C18:1 C6:0-C12:0-C18:1 C4:0-C16:0-C18:2 C10:0-C10:0-C18:2 C10:0-C12:0-C18:3 C8:0-C14:0-C18:3	0.36 0.17 0.11 0.06 0.03 0.02
32	0.401	32.161	C4:0-C18:1-C18:3 C4:0-C18:2-C18:2 C6:0-C18:2-C18:3 C8:0-C18:3-C18:3	0.04 0.01 0.01 < 0.01	43	2.251	34.454	C4:0-C14:0-C18:1 C6:0-C12:0-C18:1 C4:0-C16:0-C18:2 C10:0-C10:0-C18:2 C10:0-C12:0-C18:3 C8:0-C14:0-C18:3	0.36 0.17 0.11 0.06 0.03 0.02
33	0.858	32.342	C4:0-C18:1-C18:3 C4:0-C18:2-C18:2 C6:0-C18:2-C18:3 C8:0-C18:3-C18:3	0.04 0.01 0.01 < 0.01	44	5.745	34.649	C4:0-C14:0-C16:0 C6:0-C14:0-C14:0 C8:0-C12:0-C14:0 C10:0-C12:0-C12:0 C4:0-C15:0-C15:0	0.48 0.11 0.11 0.07 < 0.01
34	1.048	32.507	C4:0-C12:0-C18:1 C4:0-C16:0-C18:3 C8:0-C10:0-C18:2 C6:0-C14:0-C18:3 C8:0-C12:0-C18:3	0.17 0.05 0.05 0.02 0.01	45	0.181	34.984	C4:0-C15:0-C18:1 C6:0-C15:0-C18:2 C8:0-C15:0-C18:3	0.04 0.01 < 0.01
35	0.379	32.719	C4:0-C12:0-C18:1 C4:0-C16:0-C18:3 C8:0-C10:0-C18:2 C6:0-C14:0-C18:3 C8:0-C12:0-C18:3	0.17 0.05 0.05 0.02 0.01	46	0.191	35.199	C4:0-C15:0-C16:0 C6:0-C14:0-C15:0	0.06 0.03
36	2.154	32.908	C10:0-C10:0-C12:0 C4:0-C14:0-C14:0 C6:0-C12:0-C14:0 C8:0-C12:0-C12:0	0.13 0.11 0.10 0.02	47	0.153	35.341	C18:3-C18:3-C18:3	< 0.01
37	0.056	33.244	C4:0-C15:0-C18:2 C6:0-C15:0-C18:3	0.01 < 0.01	48	1.097	35.554	C18:3-C18:3-C18:3	< 0.01
38	0.095	33.460	C4:0-C14:0-C15:0 C4:0-C15:0-C18:2 C6:0-C15:0-C18:3	0.03 0.01 < 0.01	49	1.960	35.731	C4:0-C18:1-C18:1 C6:0-C18:1-C18:2 C10:0-C18:2-C18:3 C8:0-C18:2-C18:2 C12:0-C18:3-C18:3	0.30 0.08 0.01 0.01 < 0.01
39	0.210	33.610	C4:0-C18:1-C18:2 C4:0-C14:0-C15:0 C6:0-C18:2-C18:2 C8:0-C18:2-C18:3 C10:0-C18:3-C18:3	0.08 0.03 0.01 0.01 < 0.01	50	2.354	35.850	C4:0-C16:0-C18:1 C6:0-C14:0-C18:1 C8:0-C12:0-C18:1 C6:0-C16:0-C18:2 C10:0-C14:0-C18:3 C8:0-C14:0-C18:2 C4:0-C18:0-C18:2 C12:0-C12:0-C18:3	0.79 0.36 0.17 0.11 0.07 0.05 0.04 0.01

Tabla I
(Continuación)

Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar	Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar
51	3.199	36.109	C4:0-C16:0-C18:1	0.79	60	2.264	38.440	C6:0-C16:0-C16:0	0.53
			C6:0-C14:0-C18:1	0.36				C8:0-C14:0-C16:0	0.50
			C8:0-C12:0-C18:1	0.17				C4:0-C16:0-C18:0	0.42
			C6:0-C16:0-C18:2	0.11				C10:0-C14:0-C14:0	0.32
			C10:0-C14:0-C18:3	0.07				C12:0-C12:0-C14:0	0.07
			C8:0-C14:0-C18:2	0.05				C8:0-C15:0-C15:0	< 0.01
			C4:0-C18:0-C18:2	0.04					
C12:0-C12:0-C18:3	0.01								
52	5.589	36.300	C4:0-C16:0-C18:1	0.79	61	0.734	38.643	C6:0-C16:0-C16:0	0.53
			C6:0-C14:0-C18:1	0.36				C8:0-C14:0-C16:0	0.50
			C8:0-C12:0-C18:1	0.17				C4:0-C16:0-C18:0	0.42
			C6:0-C16:0-C18:2	0.11				C10:0-C14:0-C14:0	0.32
			C10:0-C14:0-C18:3	0.07				C12:0-C12:0-C14:0	0.07
			C8:0-C14:0-C18:2	0.05				C8:0-C15:0-C15:0	< 0.01
			C4:0-C18:0-C18:2	0.04					
C12:0-C12:0-C18:3	0.01								
53	7.827	36.580	C4:0-C16:0-C16:0	0.52	62	2.714	38.970	C6:0-C16:0-C16:0	0.53
			C6:0-C14:0-C16:0	0.48				C8:0-C14:0-C16:0	0.50
			C10:0-C12:0-C14:0	0.29				C4:0-C16:0-C18:0	0.42
			C8:0-C14:0-C14:0	0.11				C10:0-C14:0-C14:0	0.32
			C12:0-C12:0-C12:0	0.01				C12:0-C12:0-C14:0	0.07
				C8:0-C15:0-C15:0	< 0.01				
54	0.156	36.950	C6:0-C15:0-C18:1	0.04	63	0.079	39.156	C10:0-C14:0-C15:0	0.07
			C8:0-C15:0-C18:2	0.01				C8:0-C15:0-C16:0	0.06
								C8:0-C15:0-C18:1	0.04
								C12:0-C12:0-C15:0	0.01
								C15:0-C18:3-C18:3	< 0.01
55	0.226	37.301	C6:0-C15:0-C16:0	0.06	64	0.173	39.691	C8:0-C18:1-C18:1	0.31
			C10:0-C12:0-C15:0	0.03				C10:0-C18:1-C18:2	0.23
			C8:0-C14:0-C15:0	0.03				C16:0-C18:3-C18:3	0.01
								C12:0-C18:2-C18:2	0.01
								C18:1-C18:3-C18:3	0.01
56	0.570	37.670	C6:0-C18:1-C18:1	0.30	65	1.872	39.946	C10:0-C14:0-C18:1	1.04
			C8:0-C18:1-C18:2	0.08				C8:0-C16:0-C18:1	0.83
			C10:0-C18:2-C18:2	0.02				C6:0-C18:0-C18:1	0.32
			C12:0-C18:2-C18:3	0.01				C10:0-C16:0-C18:2	0.31
			C14:0-C18:3-C18:3	< 0.01				C12:0-C12:0-C18:1	0.12
			C18:2-C18:3-C18:3	< 0.01				C12:0-C14:0-C18:2	0.07
57	1.279	37.791	C6:0-C16:0-C18:1	0.80	66	1.114	40.104	C10:0-C14:0-C16:0	1.38
			C10:0-C12:0-C18:1	0.48				C8:0-C16:0-C16:0	0.55
			C8:0-C14:0-C18:1	0.38				C6:0-C16:0-C18:0	0.42
			C4:0-C18:0-C18:1	0.32				C12:0-C14:0-C14:0	0.16
			C10:0-C14:0-C18:2	0.14				C4:0-C18:0-C18:0	0.08
			C8:0-C16:0-C18:2	0.11				C10:0-C15:0-C15:0	< 0.01
			C12:0-C14:0-C18:3	0.03					
58	2.667	37.956	C6:0-C16:0-C18:1	0.80	67	4.265	40.274	C10:0-C14:0-C16:0	1.38
			C10:0-C12:0-C18:1	0.48				C8:0-C16:0-C16:0	0.55
			C8:0-C14:0-C18:1	0.38				C6:0-C16:0-C18:0	0.42
			C4:0-C18:0-C18:1	0.32				C12:0-C14:0-C14:0	0.16
			C10:0-C14:0-C18:2	0.14				C4:0-C18:0-C18:0	0.08
			C8:0-C16:0-C18:2	0.11				C10:0-C15:0-C15:0	< 0.01
			C12:0-C14:0-C18:3	0.03					
59	3.103	38.093	C6:0-C16:0-C18:1	0.80	68	0.861	40.427	C10:0-C14:0-C16:0	1.38
			C10:0-C12:0-C18:1	0.48				C8:0-C16:0-C16:0	0.55
			C8:0-C14:0-C18:1	0.38				C6:0-C16:0-C18:0	0.42
			C4:0-C18:0-C18:1	0.32				C12:0-C14:0-C14:0	0.16
			C10:0-C14:0-C18:2	0.14				C4:0-C18:0-C18:0	0.08
			C8:0-C16:0-C18:2	0.11				C10:0-C15:0-C15:0	< 0.01
			C12:0-C14:0-C18:3	0.03					

Tabla I
(Continuación)

Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar	Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar
69	0.842	40.743	C10:0-C14:0-C16:0 C8:0-C16:0-C16:0 C6:0-C16:0-C18:0 C12:0-C14:0-C14:0 C4:0-C18:0-C18:0 C10:0-C15:0-C15:0	1.38 0.55 0.42 0.16 0.08 < 0.01	81	0.355	43.745	C12:0-C16:0-C18:1 C10:0-C18:0-C18:1 C14:0-C14:0-C18:1 C14:0-C16:0-C18:2 C15:0-C15:0-C18:2	1.15 0.92 0.57 0.33 < 0.01
70	0.135	41.062	C10:0-C15:0-C16:0 C10:0-C15:0-C18:1 C12:0-C14:0-C15:0 C12:0-C15:0-C18:2	0.16 0.12 0.04 0.01	82	2.781	44.048	C12:0-C16:0-C18:1 C10:0-C18:0-C18:1 C14:0-C14:0-C18:1 C14:0-C16:0-C18:2 C15:0-C15:0-C18:2	1.15 0.92 0.57 0.33 < 0.01
71	0.430	41.216	C18:2-C18:2-C18:2	< 0.01	83	0.349	44.270	C10:0-C16:0-C18:0 C12:0-C16:0-C16:0 C14:0-C14:0-C16:0 C8:0-C18:0-C18:0 C14:0-C15:0-C15:0	1.22 0.76 0.75 0.09 < 0.01
72	0.086	41.384	C18:2-C18:2-C18:2	< 0.01	84	2.770	44.401	C10:0-C16:0-C18:0 C12:0-C16:0-C16:0 C14:0-C14:0-C16:0 C8:0-C18:0-C18:0 C14:0-C15:0-C15:0	1.22 0.76 0.75 0.09 < 0.01
73	0.402	41.770	C10:0-C18:1-C18:1 C12:0-C18:1-C18:2 C14:0-C18:2-C18:2 C18:0-C18:3-C18:3	0.86 0.12 0.02 < 0.01	85	0.092	44.605	ninguno	
74	3.597	42.039	C10:0-C16:0-C18:1 C12:0-C14:0-C18:1 C8:0-C18:0-C18:1 C12:0-C16:0-C18:2 C14:0-C14:0-C18:2	2.28 0.53 0.33 0.15 0.08	86	0.017	44.866	C14:0-C15:0-C18:1	0.13
75	5.124	42.381	C10:0-C16:0-C16:0 C12:0-C14:0-C16:0 C8:0-C16:0-C18:0 C14:0-C14:0-C14:0 C6:0-C18:0-C18:0 C12:0-C15:0-C15:0	1.51 0.69 0.44 0.12 0.09 < 0.01	87	0.111	45.005	C14:0-C15:0-C16:0 C15:0-C15:0-C15:0	0.18 < 0.01
76	0.236	42.569	C10:0-C16:0-C16:0 C12:0-C14:0-C16:0 C8:0-C16:0-C18:0 C14:0-C14:0-C14:0 C6:0-C18:0-C18:0 C12:0-C15:0-C15:0	1.51 0.69 0.44 0.12 0.09 < 0.01	88	0.223	45.449	ninguno	
77	0.139	42.830	C12:0-C15:0-C18:1 C14:0-C15:0-C18:2 C15:0-C18:2-C18:2	0.06 0.02 < 0.01	89	1.037	45.681	C14:0-C18:1-C18:1 C18:0-C18:2-C18:2	0.95 0.01
78	0.142	43.049	C12:0-C15:0-C16:0 C12:0-C15:0-C18:1 C14:0-C14:0-C15:0 C14:0-C15:0-C18:2	0.08 0.06 0.04 0.02	90	0.358	45.842	C14:0-C16:0-C18:1 C12:0-C18:0-C18:1 C15:0-C15:0-C18:1	2.50 0.46 0.01
79	0.037	43.264	C18:1-C18:2-C18:2	0.03	91	2.592	46.036	C14:0-C16:0-C18:1 C12:0-C18:0-C18:1 C15:0-C15:0-C18:1	2.50 0.46 0.01
80	0.086	43.441	C12:0-C18:1-C18:1 C14:0-C18:1-C18:2 C16:0-C18:2-C18:2	0.43 0.25 0.04	92	0.369	46.209	C14:0-C16:0-C18:1 C14:0-C16:0-C16:0 C12:0-C18:0-C18:1 C10:0-C18:0-C18:0 C15:0-C15:0-C16:0 C15:0-C15:0-C18:1	2.50 1.65 0.46 0.25 0.01 0.01

Tabla I
(Continuación)

Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar	Pico	% Area	NEC calculado	TG estimados	% Al azar
93	1.557	46.410	C14:0-C16:0-C16:0 C10:0-C18:0-C18:0 C15:0-C15:0-C16:0	1.65 0.25 0.01	105	0.323	49.484	C18:0-C18:1-C18:1	0.83
94	0.119	46.620	C15:0-C16:0-C18:1 C15:0-C18:1-C18:1	0.29 0.11	106	0.104	49.648	C16:0-C18:0-C18:1 C18:0-C18:1-C18:1	2.20 0.83
95	0.134	46.983	C15:0-C16:0-C18:1 C15:0-C16:0-C16:0	0.29 0.19	107	1.350	49.872	C16:0-C18:0-C18:1	2.20
96	0.151	47.259	C18:1-C18:1-C18:1	0.52	108	0.108	50.067	C16:0-C18:0-C18:1	2.20
97	0.229	47.433	C16:0-C18:1-C18:1	2.07	109	0.435	50.283	C14:0-C18:0-C18:0	0.27
98	1.558	47.596	C16:0-C18:1-C18:1	2.07	110	0.022	50.845	C15:0-C18:0-C18:0	0.03
99	0.476	47.769	C16:0-C16:0-C18:1 C16:0-C18:1-C18:1 C14:0-C18:0-C18:1	2.73 2.07 1.01	111	0.008	51.273	C15:0-C18:0-C18:0	0.03
100	2.445	47.980	C16:0-C16:0-C18:1 C14:0-C18:0-C18:1	2.73 1.01	112	0.181	51.795	C18:0-C18:0-C18:1	0.45
101	0.272	48.152	C16:0-C16:0-C18:1 C14:0-C18:0-C18:1	2.73 1.01	113	0.151	52.289	C16:0-C18:0-C18:0	0.59
102	0.743	48.349	C16:0-C16:0-C16:0 C12:0-C18:0-C18:0	1.20 0.12	114	0.003	52.761	ninguno	
103	0.048	48.519	C16:0-C16:0-C16:0 C12:0-C18:0-C18:0	1.20 0.12	115	0.002	53.263	ninguno	
104	0.103	48.952	C15:0-C18:0-C18:1	0.12					

Estos resultados estaban en concordancia con la composición triglicéridica de la grasa láctea descrita por otros autores. Barron *et al.*, (1990) obtuvieron como triglicéridos mayoritarios de las grasas lácteas de vaca, oveja y cabra, C_{14:0}-C_{18:1}-C_{18:1}, C_{4:0}-C_{14:0}-C_{18:1} y C_{4:0}-C_{18:0}-C_{16:0}. Gresti *et al.*, (1993) identificaron como triglicéridos mayoritarios C_{4:0}-C_{16:0}-C_{18:1}, C_{4:0}-C_{16:0}-C_{16:0} y C_{4:0}-C_{14:0}-C_{16:0}. Spanos *et al.*, (1995), además de las tres moléculas anteriores, identificaron C_{16:0}-C_{16:0}-C_{18:1} como otro de los triglicéridos principales en la grasa láctea de vaca, y más recientemente Ruiz-Sala *et al.*, (1996) obtuvieron como triglicéridos mayoritarios en la leche de oveja, vaca y cabra C_{6:0}-C_{14:0}-C_{16:0}, C_{10:0}-C_{10:0}-C_{16:0}, C_{4:0}-C_{16:0}-C_{16:0} y C_{4:0}-C_{14:0}-C_{18:0}. La variabilidad a la que está sujeta la composición de la grasa láctea (especie animal, alimentación, época de lactación, etc...) explicaría las pequeñas diferencias encontradas entre los resultados obtenidos en este trabajo y los descritos por otros autores (Palmquist *et al.*, 1993; Beaulieu y Palmquist, 1995; Bencini y Pulina, 1997; Pellegrini *et al.*, 1997).

4. CONCLUSIONES

Como conclusión, los resultados obtenidos permiten señalar la utilidad de la sistemática de predicción para la determinación de la composición triglicéridica de la grasa láctea.

AGRADECIMIENTOS

A. I. Nájera agradece al Ministerio de Educación y Ciencia la beca predoctoral concedida (AP90 72573285). Este trabajo fue financiado por el Departamento de Educación del Gobierno Vasco (GV 101, 123-AO38/92) y por el Ministerio de Educación y Ciencia (ALI93-0895-CO2).

BIBLIOGRAFÍA

- Barron, L.J.R.; Celaa, M.V. y Santa-María, G. (1988).—«Determination of the triglyceride composition of grapes by HPLC».—*Chromatographia* **25**, 609-612.
- Barron, L.J.R.; Hierro, M.T.G. y Santa-María, G. (1990).—«HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat».—*J. Dairy Res.* **57**, 517-526.
- Barron, L.J.R. y Santa-María, G. (1989).—«HPLC analysis of complex mixtures of triglycerides using gradient elutions and an ultraviolet detector».—*Chromatographia* **28**, 183-188.
- Beaulieu, A.D. y Palmquist, D.L. (1995).—«Differential effects on high fat diets on fatty acid composition in milk on Jersey and Holstein cows».—*J. Dairy Sci.* **78**, 1336-1344.
- Bencini, R. y Pulina, G. (1997).—«The quality of sheep milk: a review».—*Aust. J. Exp. Agr.* **37**, 485-504.
- Bugaut, M. y Bezaud, J. (1979).—«Comparison of the glyceride structure of copra and palm kernel oil. 3. Types of triglycerides».—*Oleagineux* **34**, 77-87.

- Dotson, K.D., Jerrell, J.P., Picciano, M.F. y Perkins E.G. (1992).—«High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids».—*Lipids* **27**, 933-939.
- El Hamdy, A. H. y Perkins, E. G. (1981).—«High performance reversed phase chromatography of natural triglyceride mixtures: critical pair separation».—*J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 867-872.
- Goiffon, J.P., Reminiac, C. y Olle, M. (1981).—«Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras. I. Recherche des meilleures conditions opératoires Cas de l'huile de soja».—*Rev. Fr. Corps Gras* **28**, 167-170.
- Gresti, J., Bugaut, M., Maniongui, C. y Bezard, J. (1993).—«Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat».—*J. Dairy Sci.* **76**, 1850-1869.
- Herslöf, B., Podlaha, G. y Töregard, B. (1979).—«HPLC of triglycerides».—*J. Am. Oil Chem Soc.* **56**, 864-866.
- Hierro, M.T.G.; Tomás, M.C.; Fernández-Martín, F. y Santa-María, G. (1992).—«Analysis of the triglyceride composition of avocado oil by high-performance liquid chromatography using a light-scattering detector».—*J. Chromatogr.* **607**, 329-338.
- Marini, D. y Balestrieri, F. (1989).—«Analisi di miscele di trigliceridi mediante HPLC con rivelatore UV».—*Riv. Sost. Grasse* **66**, 11-16.
- Nájera, A.I.; Barcina, Y.; de Renobales, M. y Barron, L.J.R. (1998).—«Determination of the triacylglycerol composition of Idiazabal cheese».—*Chromatographia* **47**, 579-586.
- Norma Federación Internacional de Lechería 32 (1965) (1994).—«Extracción de la grasa del queso».—En «Métodos Oficiales de Análisis de los Alimentos», p. 148-149. Ed. AMV y Mundi Prensa Libros. S. A. Madrid.
- Nutter, L.J. y Privett, O.S. (1967).—«Structures of triglycerides of bovine milk serum. Short chain triglycerides».—*J. Dairy Sci.* **50**, 1194-1199.
- Palmquist, D.L.; Denise Beaulieu, A. y Barbano, D.M. (1993).—«Feed and animal factors influencing milk fat composition».—*J. Dairy Sci.* **76**, 1756-1771.
- Pellegrini, O.; Remeuf, F.; Rivemale, M. y Barillet, F. (1997).—«Renneting properties of milk from individual ewes: influence of genetic and non-genetic variables, and relationship with physicochemical characteristics».—*J. Dairy Res.* **64**, 355-366.
- Perrin, J.L. y Naudet, M. (1983).—«Identification et dosage des triglycérides des corps gras naturels par CHLP».—*Rev. Fr. Corps Gras* **30**, 279-285.
- Ruiz-Sala, P.; Hierro, M.T.G.; Martínez-Castro, I. y Santa-María, G. (1996).—«Triglyceride composition of ewe, cow and goat milk fat».—*J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 283-293.
- Spanos, G.A.; Schwartz, S.J.; van Breemen, R.B. y Huang, C. (1995).—«High-performance liquid chromatography with light-scattering detection and desorption chemical-ionization tandem mass spectrometry of milk fat triacylglycerols».—*Lipids* **30**, 85-90.
- Takahashi, K.; Hirano, T.; Egi, M.; Hatano, M. y Zama, K. (1986).—«Supplementary consideration of the triglyceride matrix model on reverse phase high performance liquid chromatography».—*J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 1543-1546.
- Takahashi, K.; Hirano, T.; Egi, M. y Zama, K. (1985).—«A mathematical model for the prediction of triglyceride molecular species by high performance liquid chromatography».—*J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 1489-1492.
- Takahashi, K.; Hirano, T. y Zama, K. (1984).—«A new concept for determining triglyceride composition of fats and oils by liquid chromatography».—*J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 1226-1229.
- Utrilla, R.M.; Juárez, M. y Martínez, J. (1976).—«El factor tiempo en la conversión de grasas en ésteres metílicos».—*Grasas Aceites* **21**, 323-327.
- Wada, S.; Koizumi, C. y Nonaka, J. (1977).—«Analysis of triglycerides of soybean oil by high performance liquid chromatography in combination with gas liquid chromatography».—*Yukagaku* **26**, 95-99.
- Walstra, P. y Jenness R. (1987).—«Glóbulos grasos de la leche».—En «Química y Física Lactológica», pp. 226-248. Ed. Acirbia. Zaragoza.

Recibido: Agosto 1998
 Aceptado: Noviembre 1998