

Afslutningsrapport

Karakterisering af lipidoxidation i mejeriprodukter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1995-2

December 1995



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for projektet

Karakterisering af lipid oxidation i mejeriprodukter

*Torben C. Christensen & Gunhild Hølmer
Institut for Biokemi & Ernæring, Danmarks Tekniske Universitet,
Bygn. 224, 2800 Lyngby*

Marts 1997

Indholdsfortegnelse:

FORORD:	2
RESUMÉ	3
ABSTRACT	4
INTRODUKTION:	5
FORMÅL:	6
METODEUDVIKLING:	7
Afledte UV-spektre:	7
HPLC analyse af hydroperoxider:	8
GC/MS analyse af sekundære oxidationsprodukter:	8
LAGRINGSFORSØG:	11
Bestemmelse af primære oxidationsprodukter ved afledte UV-spektre:	11
Bestemmelse af primære oxidations produkter ved HPLC med chemiluminescence detektion:	11
Bestemmelse af sekundære oxidationsprodukter:	13
KONKLUSION OG PERSPEKTIVER:	15
REFERENCER:	16

FORORD:

Projektet blev udført ved Institut for Biokemi & Ernæring, Danmarks Tekniske Universitet og var et samarbejdsprojekt mellem Center for Levnedsmiddelforskning på DTU og Mejeribrugets ForskningsFond og var finansieret som en del af det fødevareteknologiske forskningsprogram (FØTEK). Projektbudgettet var på ca. 3.2 mio. kr. og blev efter planen fordelt over 3 år.

Projektet blev gennemført som et Ph.D. projekt af Torben C. Christensen med professor Gunhild Hølmer som projektansvarlig. Direktør Jørgen Lyngsø (MD Foods) var koordinator og formand for gruppen "Analyseteknik" hvori projektet indgik.

John Sørensen, MDU takkes for fremskaffelse af smørprøver.

Der henvises til Ph.D. rapporten for uddybende litteratur, metodebeskrivelser og referencer, samt til publicerede artikler angivet s. 16 i denne rapport.

Gunhild Hølmer
Professor

Torben Christensen
Civ. ing., Ph.D.

Institut for Biokemi & Ernæring
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Lyngby
Tlf.: 45252736
Fax: 45886307

RESUMÉ

Formålet med projektet var at udforske mulighederne for at anvise bedre metoder til karakterisering af lipidoxidation ved anvendelse af moderne analyseteknik som HPLC, GCIMS og derivatiseret spektroskopi. Dette med henblik på at studere oxidationsprocesser i forbindelse med produktion og lagring af mejeriprodukter.

Projektet blev opdelt i to dele, udvikling af analysetekniker og efterfølgende anvendelse af disse i forskellige lagringsforsøg.

En metode til måling af konjugerede diener ved **UV-spektroskopi** baseret på derivatiserede spektre blev forsøgt anvendt til, at bestemme den oxidative kvalitet af smør og smør-blandings-produkter. Resultater opnået ved anvendelse af UV-spektroskopi viste en rimelig korrelation med peroxidtallet.

En følsom detektionsmetode for henholdsvis triglycerid- og phospholipid-hydroperoxider er udviklet med anvendelse af **HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) med kvantificering ved chemiluminescence** detektion. Kvantificeringen ved chemiluminescence er baseret på reaktion mellem hydroperoxider, cytochrom c og luminol. Metoden der detekterer ned til ca. 3 pmol hydroperoxid; svarende til et peroxid tal på 0.01 meq/kg, blev anvendt til bestemmelse af dannelse af triglycerid- og phospholipid hydroperoxider under lagring af smør og smørblandingsprodukt.

Dannelsen af flygtige komponenter under lagring af smør og fetaost, hovedsageligt sekundære oxidationsprodukter, blev undersøgt ved anvendelse af **GC/MS (Gas – Chromatography / Mass Spectrometry)**. Adskillelse og kvantificering ved GC/MS viste en generel stigning i mængden og antallet af flygtige komponenter som funktion af lagringstiden. Hexanal blev udvalgt som markør for den oxidative nedbrydning.

De udviklede metoder har således vist sig anvendelige til karakteriseringen af lipidoxidation i de udvalgte mejeriprodukter og er alle karakteriseret ved langt højere følsomhed end de hidtil anvendte metoder som f.eks. peroxidtal og anisidintal.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to investigate the possibility of introducing new more reliable techniques as HPLC, GC/MS and UV -spectrometry for the characterization of lipid oxidation in dairy products.

The work was divided into development of analytical procedures followed by the application in different storage experiments.

A conjugated diene (CD) assay based on **derivative spectroscopy** was tested for its feasibility in determining the storage stability of butter and a dairy spread. Results obtained with the CD assays showed reasonably correlation with peroxide values for butter and a dairy spread.

Lipid hydroperoxides from triacylglycerols and phospholipids were analyzed by high performance liquid chromatography (**HPLC**) with chemiluminescence detection based on a post-column reaction with Cytchrome c and luminol. Lipid oxidation in both triacylglycerols and phospholipids was shown to increase in both butter and dairy spread during storage.

Effect of storage times, temperature and packaging materials on the formation of volatile compounds in catering packages of butter were investigated by **GC/MS**. Gas chromatographic profiles showed a general increase in the concentration of volatile components during storage. Among the volatile components analyzed and identified, hexanal was chosen as an indicator of lipid oxidation.

In conclusion the three methods based on UV-derivative-spectrometry, GC/MS, and HPLC proved to be efficient in the characterization of lipid oxidation in dairy products and with much higher sensitivity than previous methods as peroxide and anisidine values and furthermore allocated to specific lipid classes.

INTRODUKTION:

Lipidoxidation er en vigtig faktor i al fødevarerproduktion både på en positiv måde gennem et bidrag til udvikling af smag og lugt, men også kendt som een af de mest almindelige årsager til ødelæggelse og dermed kassation af levnedsmidler. I denne sammenhæng er det derfor vigtigt at kunne styre oxidationsprocessen i produktionen, så økonomiske tab minimeres. I mejeriindustrien er begge aspekter af oxidation særdeles vigtige, men det må konstateres, at de metoder, der i dag er til rådighed til evaluering af oxidative ændringer, er ude af trit med den tekniske udvikling og ganske utilstrækkelige til at kontrollere produktionsprocesser, ligesom en øget forståelse af de oxidative processers fremadskriden kræver en nyudvikling af specifikke detektionsmetoder. Da der i dag også fokuseres på den ernæringsmæssige betydning af oxidationsprodukterne, som måske kan have en skadelig effekt, er det endnu mere påkrævet at råde over metoder til bestemmelse af fødevarers oxidationsgrad og karakterisering af de dannede produkter.

Ved lipidoxidation dannes først hydroperoxider af de umættede fedtsyrer, såkaldte primære oxidationsprodukter, som ikke menes at have større betydning for fedt og oliers smag og lugt. Hydroperoxider nedbrydes imidlertid til en række forskellige produkter med færre kulstofatomer, bl.a. aldehyder, alkoholer og syrer, der oftest er flygtige forbindelser og derfor registreres som lugt og smag i de fedtholdige levnedsmidler. Disse benævnes sekundære oxidationsprodukter.

Skønt mejeriprodukter ikke indeholder så store mængder af polyumættede fedtsyrer som planteolier, så forekommer der i produkterne utilsigtede smags og lugtændringer, som tilskrives oxidation. En vigtig faktor i den oxidative ændring kunne være indflydelsen af fedtkuglernes membranphospholipider, som har et større indhold af polyumættede fedtsyrer end triglyceriderne. I fødevarer industrien, inklusive mejerisektoren, karakteriseres oxidative ændringer i dag ved at bestemme peroxidtal og anisidintal, begge empiriske metoder, som er vanskelige at reproducere imellem enkelte laboratorier. Peroxidallet giver et total billede af tilstedeværelsen af hydroperoxidgrupper i fedtet, hvorimod det ikke fortæller noget om, i hvilke lipidklasser de oxidative grupper findes. Hertil kommer, at peroxidallet ikke blot påvirkes gennem nydannelsen af peroxy-grupper, men også gennem spaltning af de dannede peroxider til sekundære oxidationsprodukter, primært aldehyder. Dette påvirker peroxidallet i nedadgående retning. Samme peroxidtal kan derfor findes i produkter med vidt forskellige oxidationsgrad. Til at følge den totale dannelse af de sekundære oxidationsprodukter anvendes en reaktion mellem p-anisidin og aldehydgrupper, igen en meget empirisk metode, som ikke fortæller om fordelingen og mængden af de enkelte aldehyder. Vigtigheden af en bedre karakterisering er indlysende, da såvel lugt som smag af disse forbindelser rangerer fra de mest vellugtende/-smagende til produkter, der gør levnedsmidlet kassabelt. Der er derfor et stort behov for udviklingen af mere følsomme, specifikke metoder både til hurtig "overall" karakterisering, men især til studier af de oxidationsprodukter, der dannes i forskellige sammenhænge, så en styring af de industrielle processer samt lagringen af produkterne kan foretages mere hensigtsmæssigt.

FORMÅL:

Formålet med projektet var at udforske mulighederne for at anvise bedre metoder til karakterisering af lipidoxidation med anvendelse af moderne analyseteknik som HPLC, GLC, (GC/MS) og derivatiseret spektroskopi, med henblik på at studere oxidationsprocesser i forbindelse med produktion og lagring af mejeriprodukter.

Aktiviteter:

- A: Indarbejdning af metoder og modelforsøg for analysemetoderne HPLC og UV-spektroskopi.
- B: HPLC analyser og karakterisering af peroxider i lipidklasser. Anvendelse af UV-spektroskopisk metode til sideløbende karakterisering af total-peroxid i udvalgte mejeriprodukter.
- C: Metodeudvikling vedrørende opsamling af flygtige sekundære oxidationsprodukter (på tenax søjler) og analyse ved gaschromatografi med massespektrometrisk detektion.
- D: Metodeudvikling vedrørende opsamling af sekundære oxidationsprodukter i mejeriprodukter ved HPLC af Di-nitro-phenyl-hydrazin-derivater.
- E: Undersøgelse af produktionsparametres indflydelse på oxidationsforløbet i udvalgte produkter samt lagringsforsøg med disse.
- F: Rapportering. (Ph.D.-rapport).

Projektet kan hovedopdeles i to dele, udvikling af analyse metoder og efterfølgende anvendelse af disse i forskellige lagringsforsøg med mejeriprodukter.

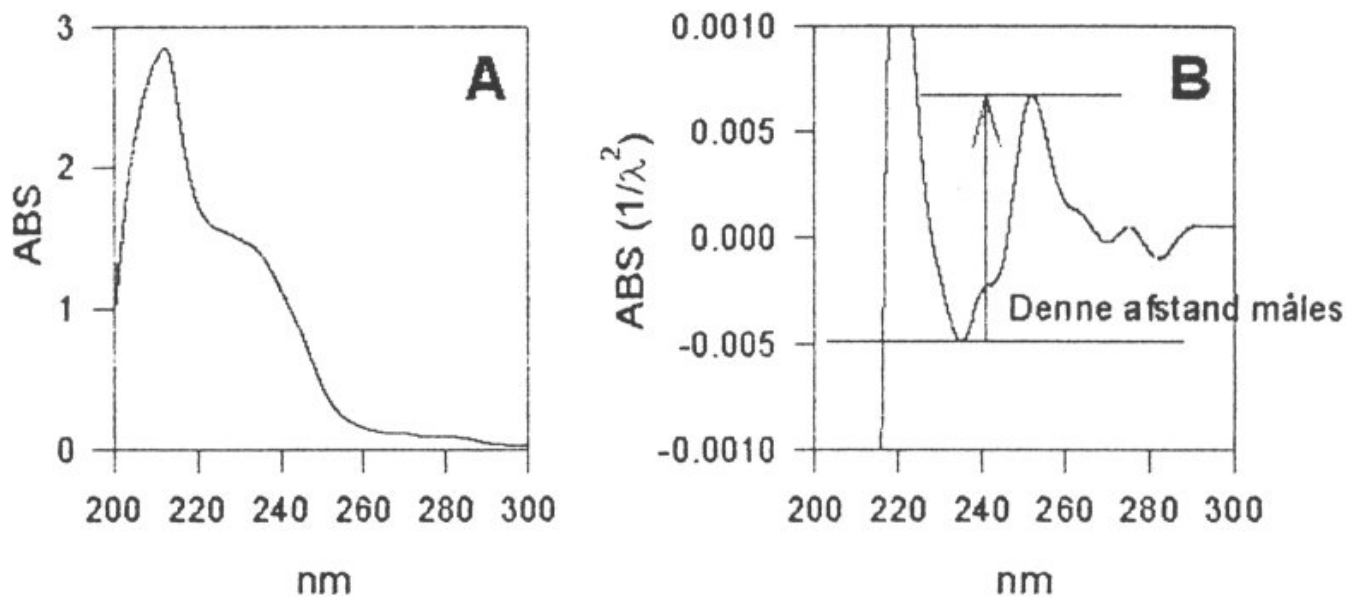
METODEUDVIKLING:

Udviklingen af tre anvendelige metoder til bestemmelse af lipidoxidation vil her kort blive beskrevet, for mere udførlige procedurer refereres til (1).

Afledte UV-spektre:

Ved den primære oxidation dannes hydroperoxider som har et karakteristisk indhold af konjugerede dobbeltbindinger. Konjugerede diener udviser et absorbance maximum omkring 233 nm. Imidlertid giver målinger ved dette maximum problemer på grund af en ikke ubetydelig baggrundsabsorption og diens absorbansen ses kun som en utydelig skulder på absorbansspektret (Fig. 1.A), som er svært at kvantificere. Corongiu et al. (5) har derfor foreslået anvendelsen af derivatiserede spektre til måling af konjugerede diener. (Fig. 1.B).

I et forsøg på at udvikle en hurtig-metode til oxidationsbestemmelse i smør og smørblandingsprodukter er en metode, baseret på konjugerede diener og "afledte UV-spektre", blevet undersøgt og korreleret til hydroperoxidindholdet. Fortolkningen af absorbansspektrene er også forsøgt automatiseret ved anvendelse af Neurale netværk (1).



Figur 1: Absorbanskurver for mælkefedt (400 µg/ml) mellem 200 og 300 nm.

A: Sammenhængen mellem absorbans (ABS) og bølglængden (λ).

B: Den 2. afledede af spektret = sammenhængen mellem ($dABS^2/d\lambda^2$) og bølglængden.

Metoden blev først testet på udvalgte lipidklasser (4). Oxideret trilinolein, linolsyre og phosphatidylcholin blev fremstillet ved photooxidation (6). Lineær regression mellem peroxidtallet for disse standarder og resultaterne fra UV-spektrene viste alle korrelationskoefficienter > 0.94 . Følsomheden for testen blev bestemt til under 1 meq/kg.

HPLC analyse af hydroperoxider:

Da forskellige sekundære oxidationsprodukter kan tænkes at stamme fra forskellige lipidklasser er det af stor interesse at udvikle metoder, der meget specifikt kan måle udviklingen af hydroperoxider. Miyazawa *et al.*, (7) har foreslået en metode baseret på anvendelse af cytochrom c og luminol i et "post-column" system. Efter adskillelse af de forskellige hydroperoxider spaltes de ved kontakt med cytochrom c. Luminol oxideres, og der udsendes chemiluminescence, som kan måles, og på denne måde kan mængden af hydroperoxider kvantificeres i de forskellige lipidklasser.

Der blev udviklet to HPLC-metoder til identificering og kvantificering af primære oxidationsprodukter (hydroperoxider). En metode til separering af neutrallipider (hovedkomponenten er her triglycerid hydroperoxider) og en metode til separering af phospholipider (phospholipid-hydroperoxider) (1).

I forbindelse med udviklingen af HPLC metoderne var det nødvendigt først at udarbejde metoder til fremstilling af hydroperoxid standarder for forskellige lipidklasser, da disse ikke er kommercielt tilgængelige. Triglycerid (TGOOH)-, kolesterol ester (CEOOH)- og phosphatidylcholin (PCOOH)-hydroperoxider blev fremstillet ved photooxidation (6). Phosphatidylethanolamin (PEOOH)-hydroperoxid blev fremstillet ved hjælp af lipoxygenase (8).

For at optimere sensitiviteten af HPLC metoden blev flg. parametre evalueret: pH af postcolumn reagenset (optimum =10), flowhastighed (optimum =1 ml/min) og reaktionstid (optimum =15 sec.). Som mobil fase valgtes t-butanol:methanol (1:1) for neutrallipid systemet (9). For phospholipid systemet blev der udviklet et gradient system baseret på methanol:vand.

Detektionsgrænsen for neutrallipiderne var i det lave picomol område (ca. 3 pmol) og 0.5 pmol for phospholipiderne. Korrelationen mellem mængden af injiceret standard og chemiluminescence responset var lineært i de analyserede områder: 1-30 pmol for PCOOH, 1-135 pmol for PEOOH og 4-1906 pmol for TGOOH ($r > 0.98$).

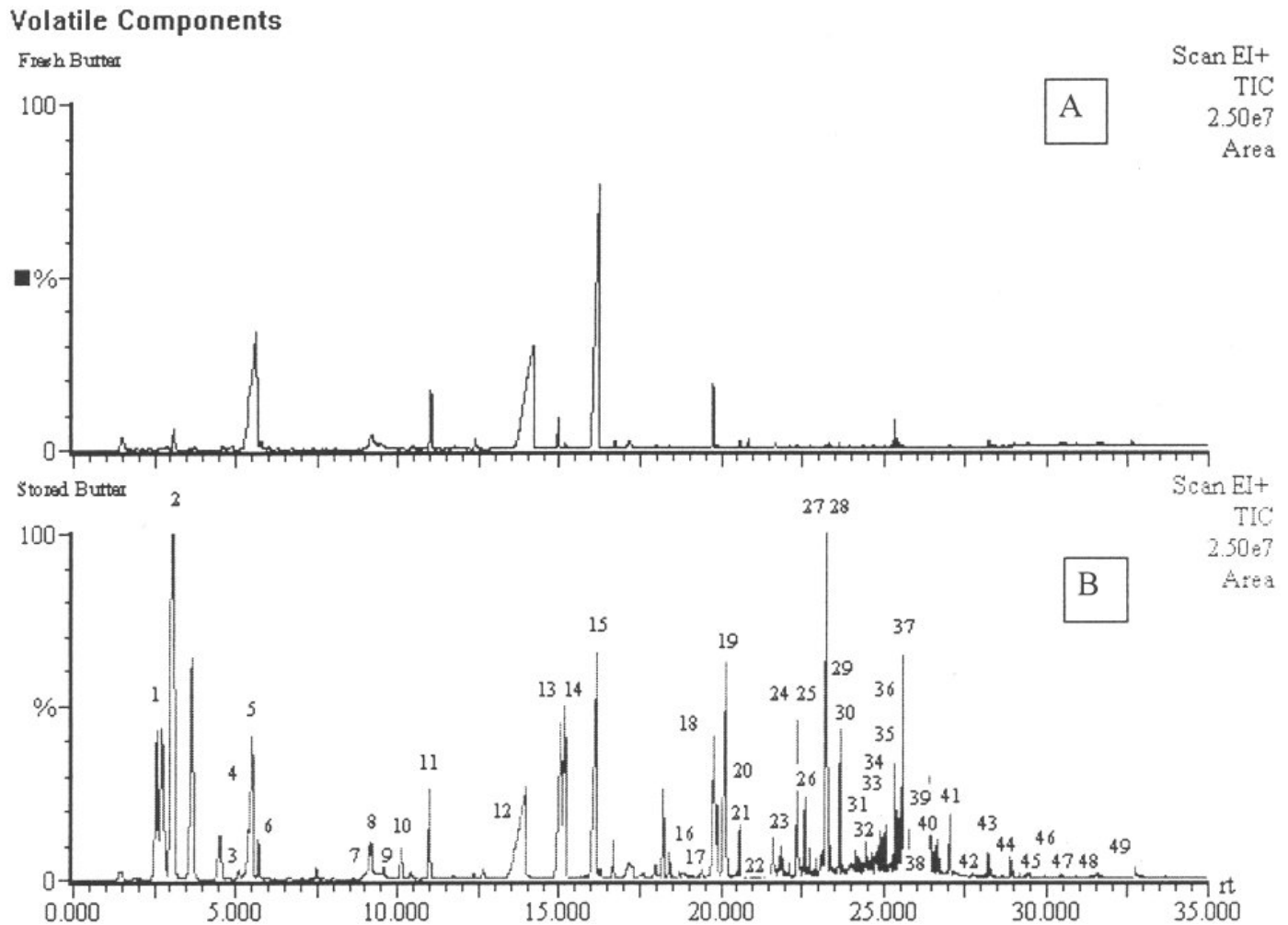
GC/MS analyse af sekundære oxidationsprodukter:

Til karakterisering og kvantificering af flygtige aromakomponenter blev der udviklet en metode baseret på dynamisk headspace med opsamling på Tenaxrør og efterfølgende analyse ved GC/MS. En anden anvendt metode fra litteraturen er HPLC analyse af dinitrophenylhydrazoner (15), denne metode blev dog fravalgt på baggrund af dens lange analysetid (18 timer til forskel for 2 timer for bestemmelse ved dynamisk headspace med efterfølgende GC/MS analyse).

De flygtige sekundære oxidationsprodukter blev isoleret ved at gennemblæse prøven med N₂ i 30 min med en hastighed af 150 ml/min og derefter opsamle de flygtige komponenter på et adsorberende materiale (TENAX) (modificeret efter (10)). Efter denne isolering blev komponenterne adskilt og kvantificeret ved GC/MS.

Fordelen ved at anvende en metode baseret på massespektrometri er, at teknikken også giver mulighed for at identificere ukendte toppe og kvantificere toppe med overlappende retentionstid.

(Fig. 2) viser typiske chromatogrammer for en frisk og lagret smør prøve.



Figur 2. Gas kromatografi/masse-spektroskopi total ion kromatogrammer af flygtige komponenter fra smør opbevaret ved 20 °C.

A: Frisk, B: Lagret 14 uger. Topnumrene refererer til numre (compound number) i fig. 3.

Til kvantificering og identifikation af de forskellige komponenter i de komplekse chromatogrammer blev der udviklet en metode baseret på anvendelse af udvalgte ioner (Fig. 3), som foreslået af Hsieh *et al.* (11).

Compound	RI*	Selective ions (m/z)	Compound number
Pentane	406	39+55+72	1
Hexane	527	57	2
Butanal	663	72	3
2-Butanone	677	57	4
2.3-Butandione	692	86	5
Heptane	636	71+100	6
1-Penten-3-one	770	84	7
Pentanal	774	44	8
1-Butanol	782	55+56	9
2.3-Pentanedione	794	57+100	10
Octane	745	84+114	11
2-t-Pental	855	83+84	12
Hexanal	879	44+82+67	13
1-Pentanol	883	70	14
2-t-Hexenal	957	69+83+97	16
3-Heptanone	970	72+114	17
2-Heptanone	982	58+114	18
Heptanal	985	86+96	19
4-c-Heptenal	987	83+94	20
Decan	958	142	21
2.4-t,t-Hexadienal	1040	81+95	22
D-Limonen	1058	93+136	23
1-Octen-3-one	1073	70	24
2-t-Heptenal	1070	83+94	25
Benzaldehyd	1080	77+106	26
2-Octanone	1085	128	27
1-Octene-3-ol	1086	57+99	28
Octanal	1089	95+100	29
Undecane	1062	112+156	30
2,4-t,t-Heptadienal	1139	51+53+81	31
delta-Valeralactone	1165	85+100	32
2-t-Octenal	1172	79+93	33
1-Octanol	1179	56	34
2-Nonanone	1186	58+142	35
Nonanal	1191	67+82+96	36
Dodecane	1157	71+170	37
gamma-Hexalactone	1272	85	38
2-t-Nonenal	1278	70+107	39
Decanal	1290	128	40
Tridecane	1254	184+185	41
2-t-Decenal	1384	70+83+98	42
2-Undecanone	1393	58+59	43
gamma-Octalactone	1438	85	44
2,4-Decadienal	1463	81+152	45
delta-Octalactone	1549	99+ 114	46
gamma-Nonalactone	1593	85	47
delta-Nonalactone	1597	99+114	48
delta-Decalactone	1634	99+114	49

Figur 3: Liste over identificerede flygtige komponenter.

RI = Modified Kovats indices (12) on column DB1701 calculated as:

$$RI = 100 \cdot (t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n) + n \cdot 100,$$

t_x = retention time of compound x,

t_n = retention time of the alkane (C_nH_{2n+2}) eluting immediately before x,

t_{n+1} = retention time of the alkane eluting immediately after x.

LAGRINGSFORSØG:

Bestemmelse af primære oxidationsprodukter ved afledte UV-spektre:

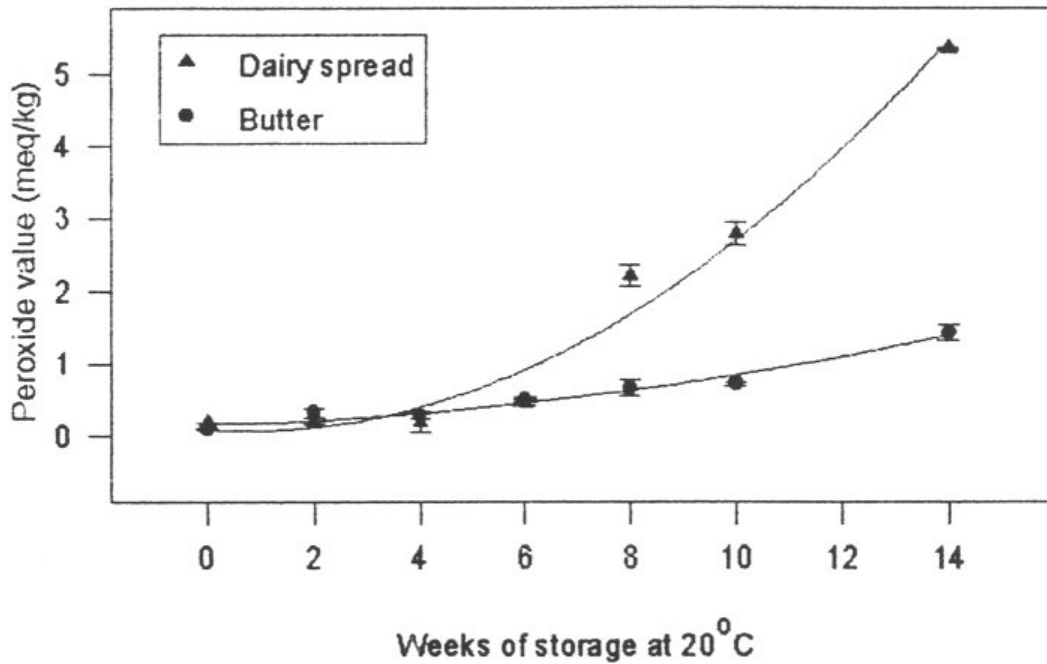
En metode til måling af konjugerede diener ved UV-spektroskopi baseret på derivatiserede spektre blev forsøgt anvendt til at bestemme den oxidative kvalitet af smør og smørblandingsprodukter. Resultater opnået ved anvendelse af UV-spektroskopi viste en rimelig korrelation med peroxidtallet, med korrelationskoefficienter på 0.78 for smør og 0.88 for smør-blandingsproduktet. Et neuralt netværk blev trænet i at klassificere absorbans-scan fra 224 nm til 246 nm. Efter træning af det neurale netværk var systemet i stand til automatisk at klassificere prøverne med en gennemsnitlig fejlmargen på 11 %. Da metoden kræver mindre prøvemængde og er hurtigere og mere simpel end peroxidalsbestemmelsen, vil den være anvendelig som en hurtigmetode til fedtholdige levnedsmidler.

Bestemmelse af primære oxidationsprodukter ved HPLC med chemiluminescence detektion:

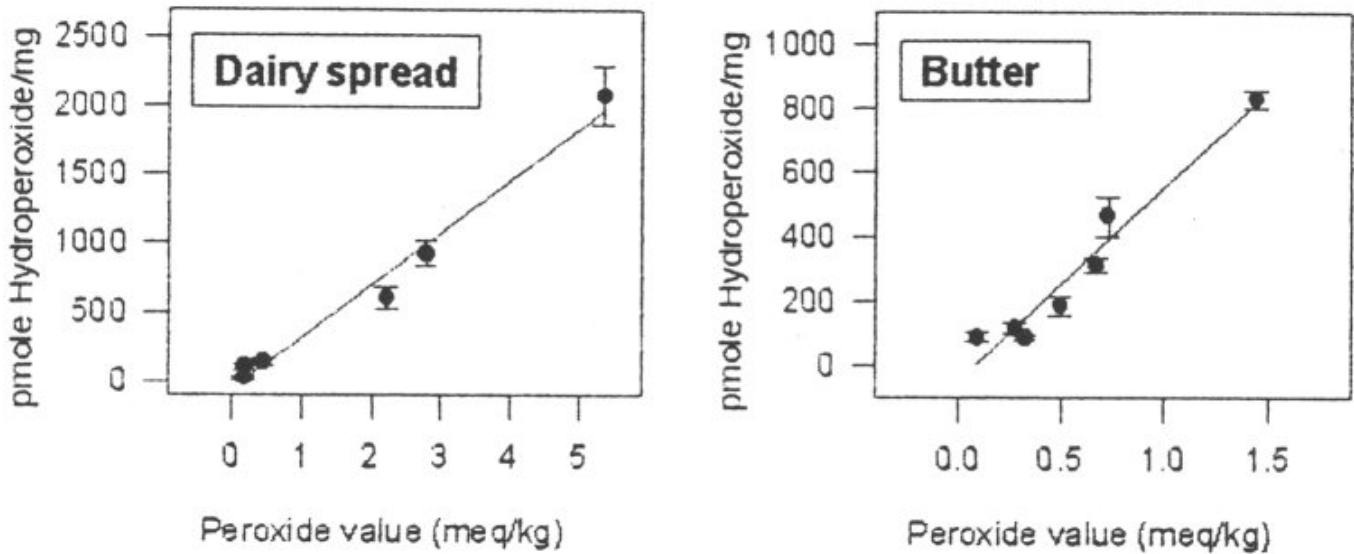
Efter udvikling af en metode baseret på HPLC til bestemmelse af lipidoxidation i forskellige lipidklasser blev den tidsafhængige oxidering af smør og et smør-blandingsprodukt analyseret (2). Smør og smørblandingsprodukter blev opbevaret ved 20°C i 14 uger. Triglycerid- og phospholipid-hydroperoxider blev målt ved anvendelse af HPLC med chemiluminescence detektion, baseret på reaktion mellem hydroperoxider, cytochrom c og luminol. Indholdet af triglycerid- og phospholipid-hydroperoxiderne steg gennem lagringsperioden. Den lineære korrelation mellem stigningen i peroxidtallet (se fig. 4) og mængden af triglyceridhydroperoxider gav korrelationskoefficienter på henholdsvis 0.97 for smør i PV-området 0.1-0.4 meq/kg og 0.99 for smør-blandingsproduktet i PV-området 0.2-5.4 meq/kg (fig. 5). Mængden af phospholipid hydroperoxider målt i den isolerede phospholipidfraktion (1) var stabil gennem de første 5 uger af lagringsperioden (ca. 1 pmol). Phosphatidylcholin hydroperoxid indholdet var en smule højere end mængden af phosphatidylethanolamin hydroperoxid. Efter 5 uger steg indholdet til 2.8 pmol phosphatidylcholin hydroperoxid og 2.5 pmol phosphatidylethanolamin hydroperoxid i smør og henholdsvis 5 pmol og 1.5 pmol i smør-blandingsproduktet.

Da denne metode er meget følsom og velegnet til analyse af meget store analyseserier, har den et potentiale som en automatisérbar metode til tidlig bestemmelse af primære oxidationsprodukter.

PV in butter and dairy spread



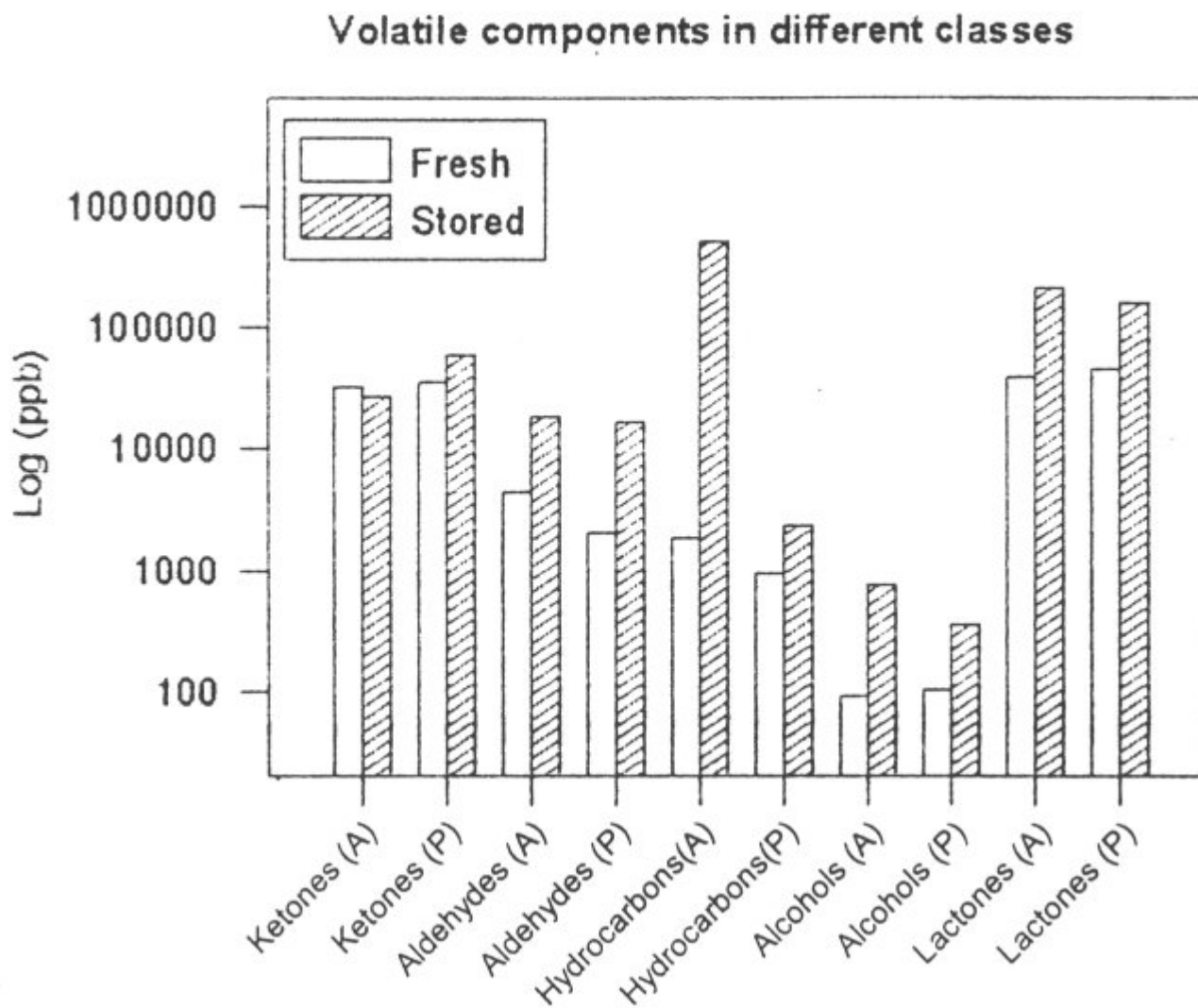
Figur 4: Peroxid tallet i smør og smør-blandingsproduktet (meq/kg) opbevaret 14 uger ved 20 °C. (2. ordens regressionskurver, $r=0.99$ for blandingsproduktet og 0.98 for smør. (Gennemsnit \pm standardafvigelsen, $n=3$).



Figur 5: Korrelation mellem pmol hydroperoxid (TGOOH) og peroxidtallet for smør og smør-blandingsproduktet. (Gennemsnit \pm standardafvigelsen, $n=3$).

Bestemmelse af sekundære oxidationsprodukter:

Flygtige aromakomponenter i smør, smør-blandingsprodukt og Feta ost blev analyseret ved anvendelse af den udviklede GC/MS metode baseret på dynamisk headspace. Metoden blev brugt til at følge lipid oxidationen i mejeriprodukter ved at måle dannelsen af forskellige sekundære oxidations produkter (3). Smørprøver i forskellig emballage blev opbevaret i mørke i 14 uger ved tre forskellige temperaturer. Adskillelse og kvantificering ved GC/MS viste en generel stigning i mængden og antallet af flygtige komponenter som funktion af lagringstiden (fig. 6). Aldehyder, ketoner og alkaner, som udgør hovedparten af de flygtige komponenter, steg generelt gennem lagringsperioden. Hexanal (med "grøn" off-flavor), pentan, pentanal, 2-heptanon, 2-octanal og 2,4-decadienal (med olie off-flavor) er alle typiske sekundære oxidationsprodukter fra trilinolein, og 2-hexanal og 2,4-heptadienal er typiske produkter fra trilinolenin (13). 1-Octene-3-on dannes gennem autooxidation af arachidonsyre og giver "metallisk" off-flavor (14).

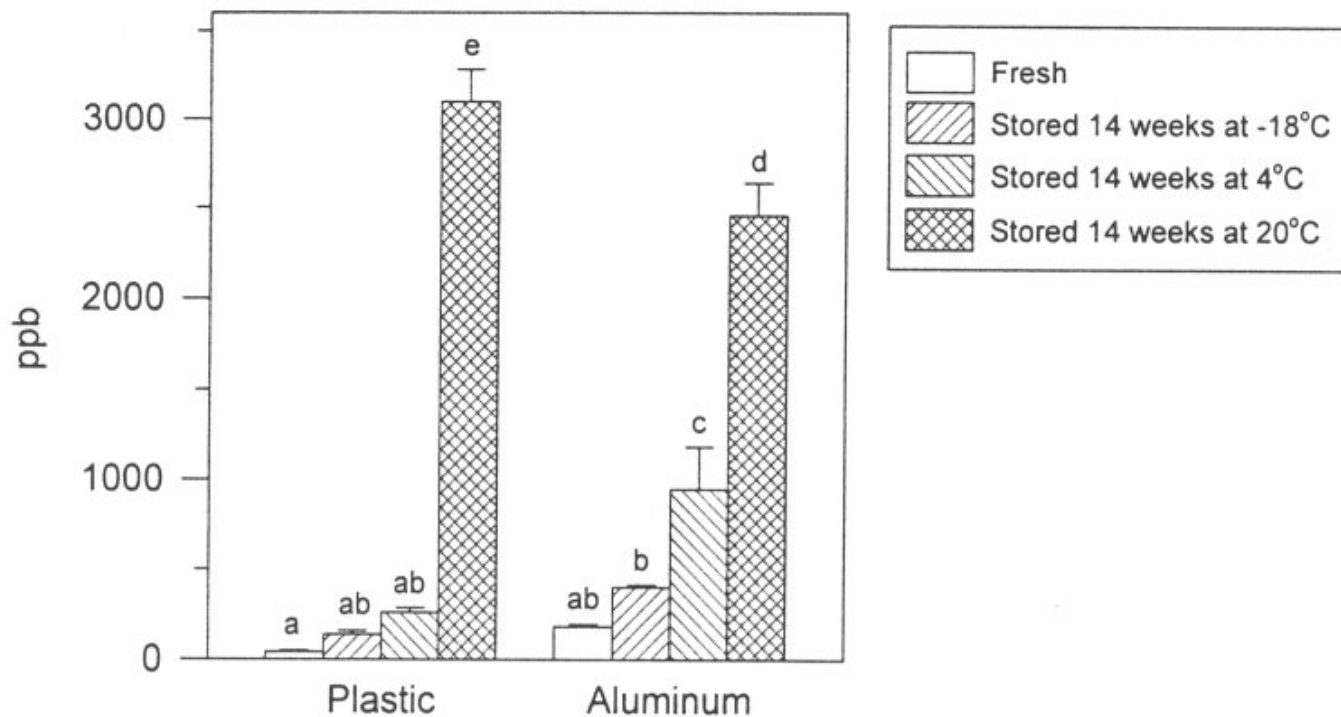


Figur 6 : Flygtige komponenter i forskellige stofgrupper.

(A : pakket i aluminiumsfolie, P : pakket i plastik, Stored = opbevaret 14 uger ved 20 °C).

Hexanal, som dannes ved autooxidation af linolsyre, blev udvalgt som markør for den oxidative nedbrydning (se fig. 7) Der var ingen forskel ($p < 0.05$) i peroxidtal og hexanal koncentration i de friske smørprøver. Peroxidallet og hexanal koncentrationen var signifikant højere ($p < 0.05$) i smør opbevaret i plastik end i smør pakket i aluminiumsfolie efter 14 ugers lagring ved 20°C. Lagring ved 20°C medførte en højere hexanal koncentration for begge emballage typer sammenlignet med prøver opbevaret ved henholdsvis 4°C og -18°C. Hexanal koncentrationen var højere i smør pakket i aluminium end i smør pakket i plastik efter 14 ugers lagring ved 4°C. Dette, sammenholdt med ovenstående resultater, kan måske forklares ved, at smør pakket i plastik har en længere autooxidativ induktions periode, men et større oxidativt potentiale.

Hexanal in butter after storage



Figur 7 : Hexanal i frisk smør og smør opbevaret 14 uger ved 3 forskellige temperaturer. (Gennemsnit \pm standardafvigelse, $n=3$), søjler uden samme bogstavsmarkering er signifikant forskellige ($p < 0.05$).

KONKLUSION OG PERSPEKTIVER:

Der er udviklet avancerede analysemetoder til karakterisering af lipid oxidation i mejeriprodukter, og der er gennem arbejdet frembragt basal viden om udviklingen af sekundære og primære oxidationsprodukter i en række mejeriprodukter. De udviklede metoder vil gøre det muligt at forbedre beslutningsgrundlaget med hensyn til kvalitetsstyring. En fremtidig korrelering af kemiske komponenter, bestemt ved ovenstående metoder, med sensoriske data vil være af stor interesse.

REFERENCER:

- (1) Christensen, T. (1995). Characterization af lipid oxidation in dairy products, Ph.D. thesis. Dept. of Biochemistry & Nutrition, Technical University of Denmark
- (2) Christensen, T, Hølmer, G., (1996). Lipid oxidation determination in butter and dairy spreads by HPLC, *J. Food Sci.*, **61** (3) 486-489.
- (3) Christensen, T, Hølmer, G., (1996). GC/MS analysis of volatile aroma components in butter during storage in different catering packaging, *Milchwissenschaft* **51** (3).
- (4) Christensen, T, Haahr, A-M., Hølmer G. (1993). Method for characterization of lipid oxidation in dairy products by derivative spectroscopy. In Proceedings of the 17th Nordic Lipid Symposium, Finland.
- (5) Corongiu F., (1983). *Chem. Biol. Interact* **44**: 289-297.
- (6) Miyazawa T, Yasuda K., Fujimoto K., (1987) *Anal. Lett* **20**:915-925.
- (7) Miyazawa, T., Suzuki, T. Fujimoto, K., and Yasuda, K. 1992. *J. Lipid Res.* **33**: 1051-1059
- (8) Therond, P., Couturier, M., Demelier, J.F., and Lemonier, F. 1993. *Lipids* **28**: 245-246.
- (9) Yamamoto, Y. and Arnes, B.N. (1987) *J. Free Rad. Biol. Med.*, **3**:359-361.
- (10) Olafdottir, G., Steinke, J.A., Lindsay, C. (1985) *J. Food Sci.* **50**:1431-1436
- (11) Hsieh, T.C.Y., Williams, S.S., Warinda, V.J. (1989) *Am. Oil Chem. Soc.* **66**:114-117.
- (12) Kovats, E. (1958) *Helv. Chim. Acta* **41**:1915.
- (13) Frankel, EN., Selke, E., Neff, W.E (1992) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **27**:442-446.
- (14) Stark, W., Forss, D.J. (1962) *J. Dairy Res.* **29**:173-180.
- (15) Esterbauer, H., Zollner(1982), Free radicals, lipid oxidation and cancer, pp 101-128, Editors: D.C.H. McBrien and T.F. Slater. Academic Press.

