

Determination of the conjugated linoleic acid content of milk

János Csapó¹, Zsuzsa Cs. Kiss¹, Gabriella Pohn¹, József Csanádi²

¹University of Kaposvár Faculty of Animal Science; ²University of Szeged Faculty of Food Engineering

In the recent decade's fats, primarily animal fats were held responsibility for the development of different illnesses connected to nourishment. This approach slowly seems to turn about as the importance of different fatty acids proves to be very important in human nourishment and in health conservation. Concerning milk fat which was to be handled as public enemy recently we approach it in a definitely positive way.

In the past decades during the experiments on animals light was thrown on the positive effects of several compounds of milk fat concerning conjugated linoleic acids (CLA) as well. Conjugated linoleic acids are those octadecadienic acids (C18:2) having conjugated double bond. After it turned out that the CLA is having a significant physiological effect it was researched which food serves as a rich CLA source. There are different types of conjugated linoleic acid and behind the changes of the CLA content several mechanisms can take part depending on which process affected significantly the CLA content of the given food. For instance a part of the CLA content of the raw milk derives from the biological hydrogenation reactions of the cow's rumen. Concerning processed food during certain technologies conjugated linoleic acids could arise. The possibility emerges to encroach these processes in a way that they shift to the production of CLA content, so in this respect we get a CLA rich product with favourable physiological effects. Accomplishing this task is very complicated during which we also have to pay attention to that the growing of CLA content should not draw down with other undesirable changes in the product. Our knowledge is incomplete and on the other hand the different CLA isomers have different physiological effects. According to our present knowledge the c9,t11-C18:2 isomer is having the biggest biological activity, which is very effective in preventing and impeding some tumours. For the exact determination of food's CLA content and following its changes we need up-to-date well reproductive, easily disposable analytical methods.

We have need of modern well reproducible and easily executable analytical methods for the perfect CLA content of foodstuffs and the monitoring of changes. In this paper we review the steps of the feasible determination of the CLA content. We assay the problems of the sample's preparation, and we tell about the determination of the position and geometry of the double-bonds. We present shortly the gas and liquid chromatographic separation methods.

A tej konjugált linolsav-tartalmának meghatározása

Csapó János¹, Csapóné Kiss Zsuzsa¹, Pohn Gabriella¹, Csanádi József²

¹Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, ²SZTE Szegedi Élelmiszeripari Főiskolai Kar

Az elmúlt néhány évtizedben a zsírokat, elsősorban az állati eredetű zsírokat tették felelőssé a táplálkozással összefüggő különböző betegségek kialakulásáért. Ez a szemlélet lassan megfordulni látszik, hiszen egyre inkább világossá válik a különböző zsírsavak fontossága az ember táplálkozásában, sőt egészségének megőrzésében. Az igen sokáig közellenségnek kikiáltott tejszírről, ma már egyértelműen pozitívan szólhatunk.

Az elmúlt évtized állatkísérletei során a tejszírban található több vegyület előnyös hatására derült fény; az ún. konjugált linolsavakat (rövidítve CLA) is beleértve. Konjugált linolsavnak azon oktadekadiénsavakat (C18:2) nevezünk, melyek konjugált kettős kötés rendszerrel rendelkeznek. Miután kiderült, hogy a CLA jelentős élettani hatással bír, vizsgálni kezdték, hogy mely élelmiszerek szolgálhatnak gazdag CLA-forrásként. Többféle konjugált linolsav van és a CLA tartalom változásai mögött eltérő mechanizmusok „bújhatnak meg”, attól függően, hogy az adott élelmiszer CLA szintjét mely folyamatok befolyásolják jelentősen. Például a nyerstej CLA tartalmának egy része feltehetően a tehének bendőjében zajló biológiai hidrogénezési reakciókból származik. Feldolgozott élelmiszereknél, egyes technológiai lépések során is keletkezhetnek konjugált linolsavak. Felmerül annak lehetősége, hogy ezen folyamatokba úgy avatkozzunk be, hogy a CLA termelődés irányába tolódjanak el, s ezáltal CLA-ban gazdag, kedvező élettani hatású terméket kapjunk. Ennek megvalósítása bonyolult feladat, melynek során arra is vigyázni kell, hogy a CLA tartalom növekedése ne járjon együtt egyéb, nem kívánatos változásokkal a termékben. Ismereteink korántsem teljeseek, ráadásul az eltérő CLA izomerek eltérő élettani hatással bírnak. Jelenlegi ismereteink szerint a *c9,t11-C18:2* izomer bír a legnagyobb biológiai aktivitással, egyes daganatok megelőzésében és gátlásában igen hatékony.

Az élelmiszerek pontos CLA tartalmának magállapítására, a változások nyomon-követésére korszerű, jól reprodukálható, könnyen elvégezhető analitikai módszerekre van szükség, Cikkünkben áttekintjük a CLA lehetséges meghatározásának egyes lépéseit. Elemezzük a minta előkészítésének problémáit, szólunk a kettős kötések helyzetének és geometriájának meghatározásáról. Röviden bemutatjuk a gáz- és folyadék-kromatográfiás elválasztási módszereket

Bevezetés

Konjugált linolsavnak (CLA) azon oktadekadiénsavakat (C18:2) nevezünk, melyek konjugált kettős kötés rendszerrel rendelkeznek. Az utóbbi időben előnyös élettani hatásuk miatt kerültek az érdeklődés középpontjába. A CLA legnagyobb mennyiségben a kérődzők szöveti zsírában és tejszírában fordul elő. A CLA izomerek közül a tejsírban, legnagyobb mennyiségben a *9-cisz,11-transz-C18:2* izomer fordul elő, de újabb kutatások szerint ezen kívül kisebb mennyiségben a *6,8-C18:2* izomertől a *12,14-C18:2* izomerig szinte minden helyzeti izomer megtalálható, és ezen belül a kettős kötések rendelkezhetnek mind cisz, mind transz konfigurációval (Kramer, Zhou 2001). Az egymástól csak kis mértékben különböző, nagyszámú helyzeti és geometriai izomer minőségi és mennyiségi meghatározása még a korszerű nagyműszeres analitikai eszközökkel is kihívást jelent.

Minta-előkészítés: lipid-extrakció és metilezés

A konjugált linolsavak analizésére általában biológiai eredetű mintákból kerül sor, a legtöbb esetben tejtermékekből, vagy állati szövetekből. Az extrakciót lehetőleg a mintavételt követően azonnal el kell végezni. Amennyiben ez nem lehetséges, a mintákat azonnal le kell fagyasztani a hidrolízis és a peroxidképződés megakadályozása céljából, és -70°C -on kell tárolni a minta-előkészítés megkezdéséig (Kramer, Zhou 2001).

A minta-előkészítés során az első feladat a lipidek kioldása a szövetekből, majd a nem lipid jellegű szennyeződések eltávolítása az extraktumból. A módszer kiválasztása attól függ, hogy mely lipid-osztályok CLA-összetételének vizsgálata a cél. Az összes lipid kioldására a tej, és a sajt vizsgálata esetében leggyakrabban a Folsch és mtsai (1957), illetve a Bligh és Dyer (1959) által kifejlesztett módszert (extrakció kloroform/metanol/víz eleggyel) illetve ezen módszerek változatait alkalmazzák. Csokoládé esetében a Soxhlet-extrakciót is alkalmazták a lipidek kivonására (Hurst és mtsai 2001). Czauderna és mtsai tej, hús, és béltartalom vizsgálata esetében lúgos hidrolízist követően a szabad zsírsavakat diklórmétánnal extrahálták. A CLA-tartalom meghatározásánál a savas előroncsolással járó extrakciós módszereket nem célszerű alkalmazni, mivel ezek a CLA izomer-összetételének megváltozását okozhatják (Shantha, Decker, Ustunol 1992).

A lipidtartalom kioldása után a magasabb szénatomszámú zsírsavak esetében, mint például a CLA-k, a gázkromatográfiás meghatározásokhoz illékony zsírsav-származékok képzésére van szükség. A zsírsavakból általában zsírsav-metil-észtereket képeznek (FAME), mivel ezek illékonyasága nagyobb, mint a hosszabb szénláncú alkoholokkal képzett észtereké.

A metil-észterek előállítására alkalmazott módszerek esetében három feltételnek kell teljesülnie:

- 1, A CLA-k helyzeti és geometriai izomerizációja minimális legyen.
- 2, A melléktermék képződés minimális legyen.
- 3, A metilezés teljesen végbemenjen. Ez különösen azokban az esetekben jelenthet problémát, mikor a zsírsavak nem szabadon, hanem észterkötésben vannak jelen a mintában.

A szabad karboxilcsoporttal rendelkező CLA-k metilezése a sav-katalizált észterezési reakciókon alapuló módszerek közül a bór-trifluorid-metanol (BF_3/MeOH), illetve a sósav-metanol (HCl/MeOH) reagenset alkalmazó módszerekkel már szobahőmérsékleten, 10 perc alatt is megvalósítható.

Az észterkötésben lévő CLA-k esetében csak bázikus katalízisen alapuló átészterezési reakcióval, nátrium-metilát (NaOMe) reagenssel lehet maradéktalanul elvégezni az metilezést szobahőmérsékleten. A sav-katalizált átészterezési reakciók mind a BF_3/MeOH , mind a HCl/MeOH reagens esetében szobahőmérsékleten nem valósíthatóak meg maradéktalanul, csak 60°C felett, 20 perces kezelés esetében. Ilyen körülmények között azonban a sav-katalízis elvén

működő módszerek megváltoztathatják a mintában a CLA-k helyzeti és geometriai izomer-összetételét, valamint számottevő melléktermék képződéssel járnak. A bázikus katalízisen alapuló nátrium-metilátos módszer 20°C-100°C között 20 perc reakcióidő alkalmazása során sem változtatja meg a CLA izomerek arányát, és nem jár számottevő allil-metoxid képződéssel sem (Park és mtsai 2001).

Amennyiben szabad karboxilcsoportot tartalmazó CLA-t szeretnénk metilezni, alkalmazhatók a sav-katalízisen alapuló reakciók, de csak alacsony hőmérsékleten (20°C). Amennyiben zsírsav-észtereket kívánunk átészterezni metil-észterekké, bázikus katalízisen alapuló metilezési módszert kell alkalmazni, mivel a sav-katalitikus módszerek esetében az átészterezéshez szükséges magas hőmérsékleten és hosszabb időtartam alatt nemkívánatos átalakulások következhetnek be.

Gázkromatográfiai szétválasztás

Jelenleg még a nagy felbontással rendelkező modern kapilláris oszlopok segítségével sem oldható meg tökéletesen a különböző CLA-izomerek szétválasztása. A legjobb szétválasztást eddig a 100 m hosszú 100% cianopropil-szilikon állófázisú WCOT oszlopokkal érték el. Ezeknél a kolonnáknál, a hőmérséklet-programtól függetlenül, a CLA-metil-észterek (CLA-FAME) retenciós ideje a linolénsav-metil-észter (C18:3n-3-FAME) és az n-6-eikozadiénsav-metil-észter (C20:2n-6-FAME) retenciós ideje közé esik. Ebben a retenciós idő-intervallumban ezeken az oszlopokon a heneikozilsav-metil-észter (C21:0-FAME) kivételével gyakorlatilag nem eluál más FAME (Kramer és mtsai 1998, Roach és mtsai 2000, Precht, Molkentin 2000). A C21:0-FAME CLA-FAME-hez viszonyított relatív retenciós ideje az alkalmazott hőmérséklet-program függvényében kis mértékben ingadozhat, így zavaró hatása más-más CLA-FAME esetében jelentkezhet. Bár a tejszír esetében azonosítottak öt eikozadiénsav (C20:2) izomert, amelyek FAME származéka szintén a CLA-FAME-kal együtt eluál az oszlopról, ezek mégsem okoznak jelentős interferenciát, mivel koncentrációjuk a tejszírban 1-2 nagyságrenddel kisebb, mint a CLA-izomereké (Precht, Molkentin 2000). Ezen GC oszlopok esetében a metilezés során keletkező metoxi melléktermékek a CLA-zóna után eluálnak, így interferenciát ott nem okoznak (Kramer és mtsai 1997).

A cianopropil-szilikon alapú állófázisú oszlopok esetében először a *cisz,transz*-, és a *transz,cisz*-, majd a *cisz,cisz*-, ezt követően a *transz,transz*-CLA izomerek eluálnak (Kramer, Zhou 2001, Sehat és mtsai 1998). A *cisz,transz*-CLA izomerek közül a retenciós idő az „n” érték növekedésével nő. Ugyanazon helyzeti izomer esetében a *cisz,transz*-CLA izomer előbb jelenik meg a kromatogramon, mint a *transz,cisz*-CLA izomer. *Cisz,cisz*-CLA izomerek esetében az „n” érték növekedésével az elúciós idő nő. A *transz,transz*-CLA izomerek esetében az „n” érték növekedésével az elúciós idő csökken (Kramer, Cruz-Hernandez, Zhou 2001).

A szétválasztás minősége a biológiai minták esetében általában rosszabb, mint a sztenderdekben. Ennek az oka az, hogy előbbiekben egyes CLA-izomerek mennyisége adja a CLA-tartalom túlnyomó részét. Például az emberi zsírszövetben, és a szarvasmarhák zsírjában a legnagyobb mennyiségben (75-85%-a a CLA-tartalomnak) előforduló 9c,11t-CLA izomer nem választható gázkromatográfiával szét a teljes CLA-tartalomnak mintegy 7%-át kitevő 7t, 9c-CLA izomertől. A 7t, 9c-CLA izomer ugyanis a 9c,11t-CLA izomer kromatográfiai csúcsának felszálló ágában helyezkedik el (Yurawecz és mtsai 1998).

A tejminták teljes zsírsavtartalmának kevesebb, mint 1%-át teszi ki a CLA-tartalom. Egyéb minták esetében a CLA koncentráció még ennél is kisebb lehet. A CLA-k és a többi nagyobb koncentrációban jelen lévő zsírsav együttes analízise általában nem valósítható meg. Többnyire két külön analízisre van szükség. Az első analízis során töményebb oldatból analizáljuk a CLA-izomereket, majd 10-30-szor hígabb oldatból a nagyobb mennyiségben jelen lévő zsírsavakat (Kramer, Cruz-Hernandez, Zhou 2001).

A kettős kötések helyzetének és geometriájának meghatározása

A CLA-izomerek metil-észter származékai EI (elektron-ütköztetési) tömegspektrumuk alapján nem különböztethetők meg egymástól (Roach és mtsai 1999). Azonban a CLA izomerek *4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-dion* (MTAD) képzett származékai [Dobson 1998, Martin és mtsai 2000], valamint a *2-alkenil-4,4-dimetiloxazolin* származékok (Roach és mtsai 1999) magas diagnosztikai értékű EI-tömegspektrumot adnak, melynek segítségével meg lehet állapítani, hogy hol helyezkednek el a kettős kötések a molekulában.

A két származékképzési módszer közül a DMOX-módszer előnye, hogy a CLA konjugált kettős kötéseinek konfigurációja változatlan marad a termékben, így a detektálást megelőző gázkromatográfiás szétválasztásban a CLA-k konjugált kettős kötéseinek helyzeti és geometriai izomériája is szerepet játszik. A másik módszerben csak a kettős kötések helye (azaz a MTAD addíció helye) befolyásolja a gázkromatográfiás szétválasztást, a geometriai izomériára vonatkozó információ elveszik a származékképzés során. A DMOX-módszer felhasználható egyéb zsírsavak azonosítására is, mivel az átalakulás a zsírsavak karboxilcsoportjánál, vagy a FAME-k metil-észter funkciós csoportjánál következik be. A MTAD-módszer ellenben csak a konjugált dién-struktúrát tartalmazó zsírsavak szerkezeti vizsgálatára alkalmas.

A származékképzési EI-MS módszerek alkalmasak a GC-vel szétválasztott CLA-kben a kettős kötések helyzetének megállapítására. Nem alkalmasak viszont a geometriai izoméria felderítésére. Az MS vizsgálatok előfeltétele azonban az, hogy a CLA-származékok egymástól és a többi zsírsav-származéktól elváljanak a GC-s analízis során. A DMOX származékok esetében a legtöbb diagnosztikus ion, amelyet arra használunk, hogy a CLA-k kettős kötéseinek helyét megállapítsuk, egyéb zsírsavak tömegspektrumában is szerepel (Roach 2001).

A CLA-ben lévő kettős kötések geometriai izomériájáról GC-FTIR vizsgálatok alapján kaphatunk tájékoztatást. Ennek során a GC-ből távozó komponenseket egy folyamatosan mozgó infravörös szubsztrátra kondenzáltatják alacsony hőmérsékleten, a vivőgázt pedig vákuum szívja el. Ezt követően a fagyott állapotú komponenst fókuszált IR sugárzás éri, majd a transzmittált IR sugárzás detektálása következik. A rotációs spektrumok tanulmányozása alapján tudunk következtetni a kettős kötések geometriájára. A konjugált kettős kötések tartalmazó zsírsavak gyenge, de egyedülálló abszorpciós sávokat adnak, amelyek lehetővé teszik a geometriai izomerek megkülönböztetését is (Mossoba 2001).

Folyadékkromatográfiás analízis

Fordított fázisú folyadékkromatográfiával, C18 (oktadecil) állófázison a CLA-k szétválasztása nem oldható meg maradéktalanul. Azonban a gázkromatográfiás elválasztást javítani lehet, ha a félpreparatív fordított fázisú oszlopon előzetesen elválasztott CLA tartalmú frakciót juttatjuk a gázkromatográfba (Werner, Luedecke, Shultz 1992).

Fordított fázisú folyadékkromatográfiás vizsgálatok során a CLA-izomerek a linolsavval együtt eluálódnak egy egynemű C18-dién frakcióban. A legtöbb ODS oszlop használható erre a célra. Eluensnek leggyakrabban acetonitril:víz elegyet használnak, vagy tiszta acetonitrilt. Utóbbi esetben a kinyert frakcióból az acetonitril könnyen eltávolítható. A detektálás megoldható mind UV, mind refraktometriás detektorral. Előbbi esetben a konjugált kettős kötések tartalmazó molekulák esetében 230nm körüli hullámhosszon célszerű mérni az abszorpciót.

A folyadékkromatográfiás módszerek közül a CLA-k szétválasztása jelenleg az ezüstion-folyadékkromatográfiás eljárások használata a leggyakoribb. Ennek során a CLA-t egy, vagy több sorba kötött, vékony ezüstreteggel bevont oszlopon választják szét. A CLA-ből leggyakrabban metil észtereket képeznek, mint a gázkromatográfiás vizsgálatoknál, és az izomereket acetonitril/hexán eluenssel izokratikusan választják szét. A felbontás jelentősen javítható a sorba kötött oszlopok számának emelésével. Az ezüstion-kromatográfiában a CLA-k a kettős kötések eltérő

konfigurációja és a konjugált dién funkciós csoport eltérő helyzete alapján válnak szét egymástól. A CLA-k három csoportba osztva jelennek meg a kromatogramon, először a *transz/transz*-, majd a *cisz/transz*-, *transz/cisz*-, és végül a *cisz/cisz*-izomerek. Egy adott csoporton belül minél messzebb vannak a kettős kötések a karboxil-csoporttól, annál kisebb a komponensek retenciós térfogata. Adott helyzeti izomer esetében a *cisz/transz* és a *transz/cisz* pár nem minden esetben választható el ezüstion-kromatográfiával, a *transz/transz* és a *cisz/cisz* pár viszont igen (Yurawecz, Morehouse 2001). A detektálás UV, vagy diódasoros detektorral (DAD) történik. Más származékképzési módszerek és eluens-összetétel alkalmazásával a felbontás további javulása érhető el (Nikolova-Damyanova, Momchilova, Christie 2000).

Irodalom

1. J. K. G. Kramer, J. Zhou: Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 594-632.
2. J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497-509.
3. E. G. Bligh, W. J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917.
4. W.J. Hurst, S. M. Tarka, G. Dobson, C. M. Reid: Determination of conjugated linoleic acid (CLA) concentrations in milk chocolate. *J. Agric. Food. Chem.* 49 (2001) 1264-1265.
5. M. Czauderna, J. Kowalczyk, A. Potkanski, M. Szumacher-Strabel, G. Chojecki: Quantification of conjugated linoleic acid and other essential fatty acids in ovine meat, milk, fat, and intestinal digesta. *J. of Animal and Feed Sci.* 10 (2001) Suppl.2, 385-392.
6. N. C. Shantha, E. A. Decker, Z. Ustunol: Conjugated linoleic acid concentration in processed cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (1992) 425-428.
7. S. A. Werner, L. O. Luedecke, T. D. Shultz: Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three cheddar-type cheeses: Effects of cheese cultures, processing and aging. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1817-1821.
8. Y. Park, K. J. Albright, Z. Y. Cai, M. W. Pariza: Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1158-1164.
9. J. K. G. Kramer, N. Sehat, M. E. R. Dugan, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. A. G. Roach, K. Eulitz, J. L. Aalhus, A. L. Schaefer Y. Ku: Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver-ion high performance liquid chromatography. *Lipids* 33 (1998) 549-558.
10. J. A. G. Roach, M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer, M. M. Mossoba, K. Eulitz, Y. Ku: Gas chromatography-high resolution selected-ion mass spectrometric identification of trace 21:0 and 20:2 fatty acids eluting with conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 35 (2000) 797-802.
11. D. Precht, J. Molkenin: Frequency and distributions of conjugated linoleic acid and trans fatty acid content in European bovine milk fat. *Milchwissenschaft* 55 (2000) 687-691.
12. J. K. G. Kramer, V. Fellner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz: Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids* 32 (1997) 1219-1228.
13. N. Sehat, J. K. G. Kramer, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. A. G. Roach, K. Eulich, K. M. Morehouse, Y. Ku: Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas

- chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 33 (1998) 963-971.
14. J. K. G. Kramer, C. Cruz-Hernandez, Y. Zhou: Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 594-632.
 15. Yurawecz, J. A. G. Roach, N. Sehat, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, J. Fritsche, H. Steinhart, Y. Ku: A new conjugated linoleic acid isomer, 7trans-, 9cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33 (1998) 803-809.
 16. J. A. G. Roach, M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, K. Eulitz: Gas chromatography-mass spectrometry of lipids. *Spectral Properties of Lipids*. Szerkesztő: R. J. Hamilton, J. Cast, Sheffield Academic press, Sheffield (Anglia) 1999 pp.191-234.
 17. G. Dobson: Identification of conjugated fatty acids by gas-chromatography-mass spectrometry of 4-metil-1,2,4-triazoline-3,5-dione adducts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 137-142.
 18. J. C. Martin, S. Gregorie, M. H. Siess, M. Gently, J. M. Chardigny, O. Berdeaux, P. Juaneda, J. – L. Sebedio: Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* 35 (2000) 91-98.
 19. J. A. G. Roach: Analysis of CLA derivatives by GC/MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 594-632.
 20. M. M. Mossoba: Application of gas chromatography-infrared spectroscopy to the confirmation of the double bond configuration of conjugated linoleic acid isomers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 594-632.
 21. M. P. Yurawecz, K. M. Morehouse: Silver-ion HPLC of conjugated linoleic acid isomers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 594-632.
 22. B. Nikolova-Damyanova, S. Momchilova, W. W. Christie: Silver ion high-performance liquid chromatographic separation of conjugated linoleic acid isomers and other fatty acids, after conversion to p-methoxyphenacyl derivatives. *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000) 348-352.