



УДК 543.544:544.77

Обращенно-фазовая ВЭЖХ в определении подлинности масла какао в составе шоколада

Индина И.В., Туртыгин А.В., Дейнека В.И., Дейнека Л.А.

НИУ «Белгородский государственный университет», Белгород

Поступила в редакцию 2.06.2012 г.

Аннотация

В работе метод обращенно-фазовой ВЭЖХ использован для определения подлинности масла какао в составе шоколада и глазури шоколадных конфет. Показано, что в ряде случаев для установления подлинности масла какао достаточно качественного сопоставления хроматографического профиля - типа и относительного количества трех основных триацилглицеролов – олеата-дипальмитата (ОП2), олеата-пальмитата-стеарата (ОПС) и олеата-дистеарата (ОС2). Для количественной оценки подлинности масла предложена векторная модель – оценка углов между векторами, построенными в трехмерном пространстве – долях ОП2, ОПС и ОС2.

Ключевые слова: шоколад, масло какао, определение подлинности, ВЭЖХ, векторная модель.

Reversed-phase HPLC has been applied for authenticity determination of cocoa butter in chocolate and glaze of chocolates. It has been shown that in some cases qualitative consideration of relative areas of peaks of the three main triacylglycerols (oleate-dipalmitate, OP2; oleate-palmitate-steareate, OPS; oleate-distearate, OS2) is just enough to solve the problem. For quantitate calculation the vector model is proposed, - namely the angle between two vectors in the three-dimensional space based upon mole portions of OP2, OPS and OS2 for the oil under investigation and for original cocoa butter.

Keywords: chocolate, cocoa butter, authenticity determination, HPLC, vector model

Введение

Масло какао относится к насыщенным маслам: на радикалы стеариновой кислоты в зависимости от региона выращивания в нем приходится до 33÷38 %; доля пальмитиновой кислоты более стабильна – 24.1÷25.7, также велик вклад мононенасыщенной (олеиновой - до 32.9÷34.6 %); а содержание диненасыщенной кислоты (линолевой) не выше 3.5 %. Соответственно, основные компоненты масла какао олеат-пальмитат-стеарат (ПОС - 36÷38 % в сумме триацилглицеролов), олеат-дистеарат (СОС, 24÷28 %) и олеат-дипальмитат (ПОП, 14÷16 %) [1].

Изначально инки и ацтеки [2] использовали обжаренные и измельченные какао-бобы для приготовления напитка “хохосоатл”, “сасahuatl”, или “chocolatl”. Привычные нам плитки шоколада были созданы в Швейцарии в 18-ом веке. Кстати, во Франции Жан-Антуан Брут Менье основал фармацевтическую фабрику, которая изготавливала шоколад в небольших количествах для улучшения вкуса порошков и

покрытия пилуоль [3]. Высокая популярность шоколада во всем мире при относительно ограниченном объеме производства обусловила дороговизну масла какао. Поэтому по директиве 2000/36ЕС в Евросоюзе разрешено использование помимо масла какао до 5% добавок растительного масла при изготовлении продуктов на основе какао [4], но при этом жирнокислотный состав добавляемых масел должен быть подобным маслу какао. Такие масла называют эквивалентами масла какао (ЭМК). Оценка соотношения количества триацилглицеролов (ТАГ) типов ПОС/ПЛП (пальмитоил-олеоил-стеароил к линолеоил-дипальмитоил глицеролов) и ПОП/ПЛС (олеоил-дипальмитоил к линолеоил-пальмитоил-стеароил глицеролов) может быть использована для дифференциации масла какао и добавок к нему ЭМК до 5%-ного содержания [5]. Впрочем, единого метода определения фальсификации масла какао нет, поскольку добавляемые масла могут иметь не только разнообразный жирнокислотный состав, но и различные концентрации остальных липофильных соединений [1].

Целью настоящей работы было определение подлинности масла какао в составе шоколада различных производителей и в глазури шоколадных конфет на рынке Белгорода с использованием впервые предложенной в настоящей работе векторной модели.

Эксперимент

Экстрагированные из шоколада масла анализировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity с рефрактометрическим детектором R-401. Хроматографическая колонка 250×4.6 мм Kromasil 100-5C18; подвижная фаза 100% ацетон (1 мл/мин). Для записи и обработки хроматограмм использовали ПП «Мультихром 1.5».

В качестве стандартного образца использовали «Масло какао» Theobroma cacao ООО «Натуральная косметика» (Аромашка). Материал для исследования (шоколад различных марок и шоколадные конфеты) был приобретен в магазинах города Белгород.

Для экстракции навеску измельченного шоколада (или глазури) переносили в пластиковую центрифужную пробирку, добавляли требуемый объем ацетона и смесь выдерживали в ультразвуковой бане в течение 10 - 20 мин с периодическим разминанием шоколада стеклянной палочкой под слоем ацетона. Экстракт отделяли от твердого осадка центрифугированием в течение 15 минут (4000 об./мин), фильтровали через насадочный фильтр в мерную колбу. Раствор доводили до метки ацетоном перед хроматографическим определением, заполняя им вials автосамплера.

Обсуждение результатов

Типичная хроматограмма масла какао (ООО «Натуральная косметика»), по хроматографическому профилю подобная приведенным в опубликованных статьях [6 – 8], представлена на рис. 1.

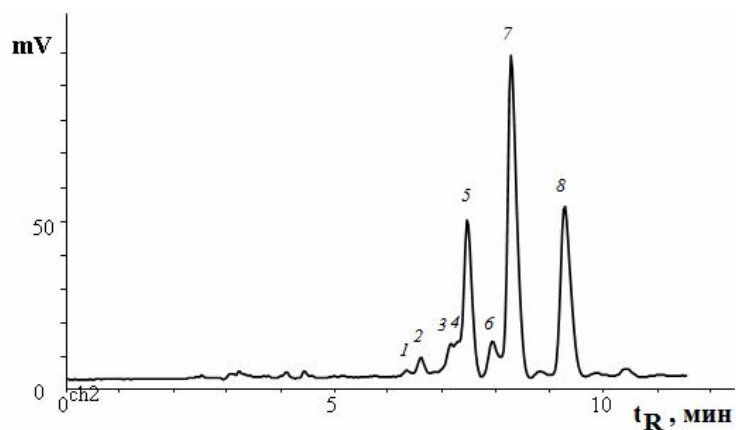


Рис. 1. Разделение триацилглицеролов масла какао
 ТАГ: 1 – ЛОП; 2 – ЛП₂; 3 – ООП; 4 – ЛПС; 5 – ОП₂; 6 – О₂С; 7 – ОПС; 8 – ОС₂.
 Колонка 250×4.6 Kromasil 100-5С18; подвижная фаза – ацетон (1 мл/мин);
 термостат колонок 30°С; детектор рефрактометрический

В использованном в работе составе подвижной фазы (100% ацетон) один из трех основных ТАГ (олеат-дипальмитат, ОП₂) плохо отделен от пары других ТАГ с близкими временами удерживания (с диолеат-пальмитатом, О₂П, и с линолеат-пальмитат-стеаратом, ЛПС). Однако разделение проблемных пиков лишь незначительно улучшается при использовании существенно более медленных элюентов (требующих на порядок большее время на единичное хроматографирование, [7]), поэтому предложенные в работе хроматографические условия можно считать быстрыми и удобными: достаточно навеску шоколада растереть под ацетоном и отфильтровать перед вводом в хроматографическую систему.

Выполненный в работе анализ большого числа шоколадов различных марок и внешней заливки некоторых шоколадных конфет показал, что в ряде случаев для оценки происхождения использованного для их изготовления масла достаточно качественного анализа хроматограмм, рис.2.

Например, шоколад «Экстра», как и многие другие, содержит масло, не отличимое от масла какао (рис.2, Б). Масла шоколадов марок «Амог» (с фундуком) и «Ореховый» осложнены появлением дополнительных пиков, но их хроматографический профиль соответствует маслам, экстрагируемых из частиц орехов, введение которых в шоколад декларировано на упаковке (рис.2, В и Г). В подлинности масла какао из шоколада марки «Кремлевские заботы», можно усомниться – относительная доля ТАГ ОП₂ заметно больше, чем в остальных образцах, что очевидно и без количественных расчетов (рис.2, Д).

Масла, отчетливо отличающиеся по хроматографическому профилю от масла какао, обнаружены во многих глазурах исследованных в настоящей работе «шоколадных» конфет:

- по иному соотношению площадей характерных и для масла какао основных пиков, что указывает на использование (или добавки) искусственно приготовленных смесей (рис.3, А и Б);
- по характерным для продуктов гидрирования (традиционных маргаринов) широким неразделенным группам пиков суммы изомерных ТАГ с одинаковыми эквивалентными углеродными числами [9] (рис.3,Г).

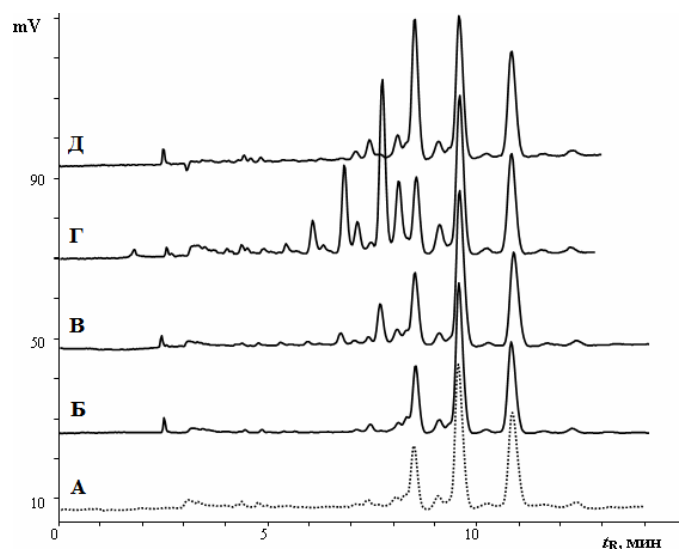


Рис. 2. Хроматограммы ацетоновых экстрактов некоторых шоколадов
 А – масло какао; шоколады: Б – «Экстра»; В - «Amour» (с фундуком);
 Г – «Ореховый»; Д – «Кремлевские забавы»

Наконец, в некоторых шоколадах была обнаружена замена масла какао на иное масло, напоминающее по профилю кокосовое (или на продукт, приготовленный на его основе). Впрочем, во всех таких случаях речь не может идти о фальсификации, поскольку производители декларировали произведенную замену.

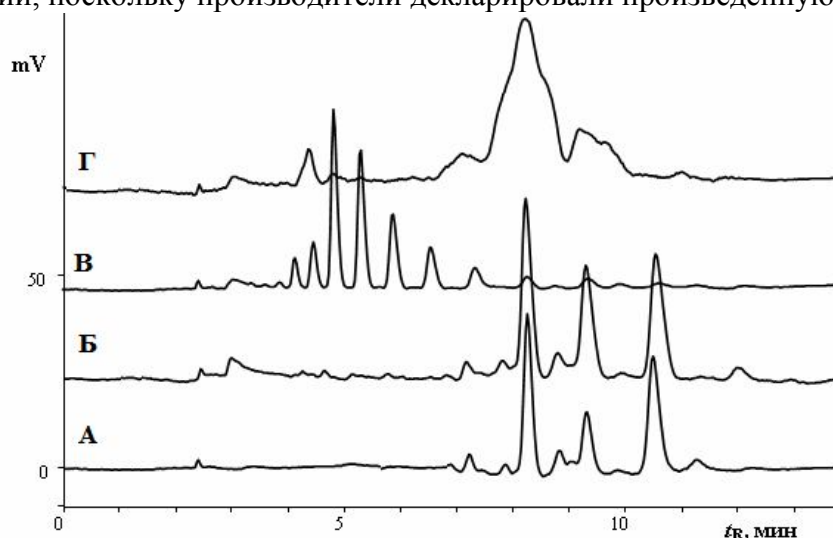


Рис. 3. Хроматограммы ацетоновых экстрактов шоколадов
 Экстракты глазури конфет: А – «Миндаль»; Б – «Ассорти»; Г – «Княжеские»;
 В – шоколад «Славянские традиции» и суфле "Шарм" ЗАО "Кондитер Курск"

В спорных ситуациях применение расчетных методов обязательно. Можно предложить схему, в которой в трехмерном пространстве (измерения в котором соответствуют долям ТАГ: x – ОП₂, y – ОПС и z – ОС₂) строится реперный вектор (по заведомо достоверному образцу); затем строится другой вектор, - с координатами, соответствующими доле площадей этих пиков в исследуемом образце масла, рис.4. Степень несовпадения двух векторов может быть оценена по углу между ними, определяемому по формуле:

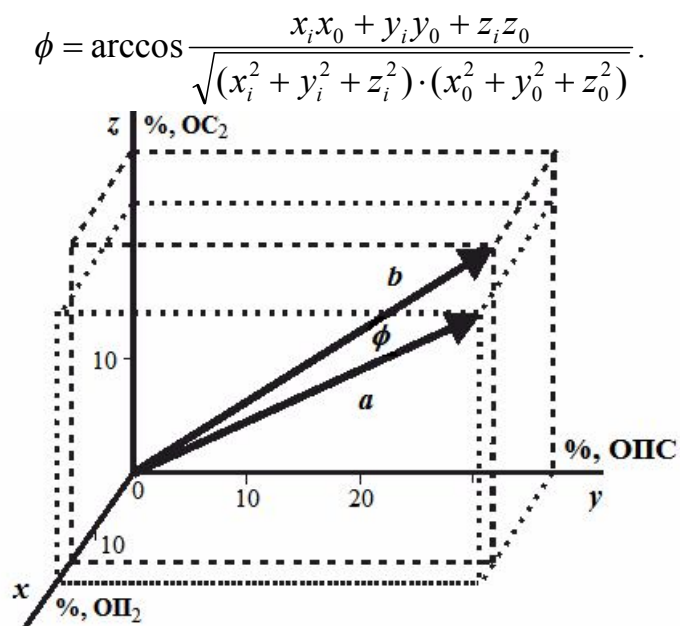


Рис. 4. Векторная модель для оценки достоверности использования масла какао

Для проведения такого анализа нами были оценены метрологические характеристики предлагаемого подхода. Прежде всего, было установлено, что детектор позволял добиться линейности в зависимости площадей пиков от концентрации масла какао в диапазоне концентраций, по крайней мере, от 3 до 12 мг/мл. Затем на примере одной марки шоколада было установлено, что в любой точке практически четырехкратного диапазона массы навески шоколада, использованной для экстракции при постоянном объеме ацетона, удастся определить направление вектора с погрешностью менее 1° , но погрешность определения направления искомого вектора в пространстве существенно возрастала при уменьшении концентрации масла в экстрактах ниже 2.5 мг/мл. С учетом того, что доля масла какао в шоколаде в среднем составляет $15 \div 20\%$, может быть рассчитана удобная навеска шоколада – $40 \div 50$ мг на 10 мл ацетона.

Как следует из литературных данных, некоторые различия в составе масла какао могут быть связанными с местом его производства (произрастания) [1]. Если из представленных в табл.1 данных в качестве реперного образца взять масло какао из плодов растения, выращенного в Кот-д'Ивуаре, то по предложенному выше уравнению можно рассчитать диапазон углов в векторной модели, соответствующий различиям в составе натуральных масел какао. При среднем отклонении векторов от реперного вектора порядка 3 градусов максимальный угол оказался даже больше 5 градусов для заведомо достоверных растительных масел. Следовательно, в качестве ориентировочного критерия достоверности масла какао в шоколаде можно использовать не превышение угла между векторами в 6 градусов. Рост угла до 10 градусов, по-видимому, следует воспринимать как подозрение на добавление к маслу какао сторонних масел, хотя точной оценки сделать невозможно, поскольку хроматографический профиль добавки заведомо не известен.

Таблица 1. Характеристики масла какао из плодов растений различных мест произрастания

| Производители: | Самоа | Кот-д'Ивуар | Эквадор | Малайзия | Гана | Нигерия | Байя (Бразилия) |
|---|------------------------|-------------|---------|----------|------|---------|-----------------|
| Вид ТАГ | Доля по площадям пиков | | | | | | |
| ОП ₂ | 16.4 | 15.9 | 15.3 | 13.8 | 15.2 | 14.8 | 14.0 |
| ОПС | 38.3 | 36.6 | 36.3 | 36.6 | 37.3 | 37.4 | 34.6 |
| ОС ₂ | 26.8 | 23.8 | 26.9 | 28.4 | 26.8 | 26.4 | 23.7 |
| Характеристические углы по отношению к вектору масла какао производства Кот-д'Ивуар | | | | | | | |
| ϕ , град | 1.96 | 0 | 3.56 | 5.68 | 3.04 | 2.94 | 2.02 |

Результаты исследования масел в составе различных марок шоколадов и глазури некоторых марок конфет приведены в табл.2.

Из представленных в табл.2 данных следует, что примерно для 15 ÷ 19 образцов шоколада нет оснований считать, что масло какао было заменено или что в него введено стороннее масло, но в шоколадах марок «Шоколад с кусочками какао» и «Кремлевские забавы», скорее всего, использован искусственный заменитель.

Если для исследованных марок шоколадов в целом получены результаты, свидетельствующие о том, что при их изготовлении используется либо натуральное масло какао, либо масла или смеси, близкие к нему по хроматографическому профилю, то при производстве глазури шоколадных конфет, по крайней мере, среди исследованных нами образцов, заменитель масла какао используется чаще, табл.3.

Таблица 2. Результаты исследования масел некоторых марок шоколада

| № | Название образца | Доля ТАГ*, % | | | α , град. | Доля какао масла, % |
|---------|---|-----------------|------|-----------------|------------------|---------------------|
| | | ОП ₂ | ОПС | ОС ₂ | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | Масло какао | 21.4 | 43.3 | 25.6 | 0 | 100 |
| Шоколад | | | | | | |
| 1 | Edel herbe Sahne. Bellarom Lindl Stiftung &Co. KG | 19.7 | 43.7 | 26.6 | 2.12 | 17.0 |
| 2 | Российский. Темный шоколад с миндалем ОАО «Кондитерское объединение «РОССИИ» | 22.2 | 43.3 | 28.7 | 2.72 | 15.1 |
| 3 | Горький шоколад «Amour» 72% АТ ВО «КОНТИ» | 22.4 | 46.8 | 30.8 | 2.85 | 18.1 |
| 4 | Черный «Дольчи» шоколад ЗАТ Виробниче об'єднання «КОНТИ» | 20.8 | 44.9 | 29.5 | 3.04 | 15.5 |
| 5 | Бабаевский горький шоколад с фундуком ОАО Кондитерский концерн Бабаевский | 21.7 | 43.6 | 29.6 | 3.33 | 18.5 |
| 6 | Бабаевский горький с целым миндалем ОАО Кондитерский концерн Бабаевский | 20.1 | 44.8 | 29.5 | 3.54 | 17.2 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----|--|------|------|------|------|------|
| 7 | «Банкет» шоколад горький, 72% ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка» | 21.1 | 42.1 | 29.3 | 3.96 | 19.6 |
| 8 | «Осенний вальс» ОАО «РОТ ФРОНТ» | 21.2 | 46.6 | 32.2 | 4.46 | 24.9 |
| 9 | Шоколад пористый «Спартак» СП ОАО «Спартак» | 19.0 | 43.8 | 29.7 | 4.59 | 20.5 |
| 10 | Шоколад десертный с лесным орехом и изюмом ООО Кондитерская фабрика «Победа» | 26.6 | 44.0 | 29.4 | 4.62 | 10.0 |
| 11 | Roshen Elegance с миндалем, Киевская кондитерская фабрика ROSHEN, Украина | 17.4 | 41.3 | 27.9 | 4.92 | 13.5 |
| 12 | Темный шоколад Alpen Gold ООО «Крафт Фудс Рус» | 21.2 | 43.3 | 31.4 | 5.12 | 11.5 |
| 13 | Горький шоколад 80% какао ОАО «Красный Октябрь» | 20.4 | 43.5 | 31.4 | 5.29 | 22.8 |
| 14 | Шоколад «Амур» черный с цельным фундуком ЗАТ Виробниче об'єднання «КОНТИ» | 17.5 | 44.8 | 29.4 | 5.48 | 13.7 |
| 15 | Zart herb. Chocœur. WIHA GMBH | 17.4 | 46.1 | 30.1 | 5.95 | 14.6 |
| 16 | Ореховый (ОАО Кондитерский концерн Бабаевский) | 21.1 | 45.2 | 33.7 | 6.17 | 10.4 |
| 17 | Молочный шоколад Nestle ОАО «Кондитерское объединение «Россия» | 18.3 | 42.3 | 30.7 | 6.24 | 11.9 |
| 18 | «Для Вас» Шоколад ОАО «Красный Октябрь» | 17.5 | 41.5 | 30.0 | 6.38 | 14.5 |
| 19 | Воздушный шоколад темный пористый ООО «Крафт Фудс Рус» | 16.9 | 44.1 | 30.0 | 6.39 | 11.6 |
| 20 | Экстра. Темный шоколад. ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка» | 24.1 | 38.1 | 29.5 | 7.38 | 14.0 |
| 21 | Настоящий шоколад ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка» | 21.2 | 39.3 | 32.0 | 7.94 | 15.3 |
| 22 | Cadbury Whole Nut (ООО «ДиролКэдбери») | 15.9 | 46.2 | 32.1 | 8.26 | 13.4 |
| 23 | Шоколад с кусочками какао ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка» | 29.2 | 35.0 | 29.8 | 12.8 | 17.9 |
| 24 | «Кремлевские забавы» Царь-колокол 1735 ООО Кондитерская фабрика «Победа» | 29.7 | 33.2 | 26.2 | 13.8 | 13.2 |

* - доля триацилглицеролов по площадям пиков на хроматограмме

Таблица 3. Результаты исследования масел некоторых марок глазури некоторых марок конфет

| № | Название образца | | | | α , град. |
|---|------------------|-----------------|------|-----------------|---------------------|
| | | ОП ₂ | ОПС | ОС ₂ | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | "Ассорти" | 21.6 | 41.0 | 28.4 | 3.76 |
| 2 | "French Kiss" | 19.4 | 44.5 | 30.0 | 3.76 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

| | | | | | |
|---|---------------------------------------|------|------|------|------|
| 3 | "Ассорти" (темный слой) | 20.5 | 42.7 | 28.9 | 3.76 |
| 4 | "Коркунов" (молочный с лесным орехом) | 21.9 | 45.3 | 32.8 | 5.19 |
| 5 | "Alpen Gold Composition" | 31.8 | 41.2 | 27.0 | 10.1 |
| 6 | "Княжеские" | 12.4 | 67.3 | 20.3 | 18.6 |
| 7 | "Золотая лилия" | 7.5 | 70.6 | 21.9 | 21.5 |
| 8 | "Ассорти" (молочн.слой) | 33.7 | 25.1 | 28.2 | 23.8 |
| 9 | "Миндаль" | 36.1 | 16.8 | 36.0 | 34.4 |

Заключение

Таким образом, в настоящей работе предложен простой и удобный метод определения качества масла, используемого при производстве шоколада, основанный на сопоставлении содержания триацилглицеролов исследуемого образца и заведомо подлинного масла какао. В методе сопоставляются не абсолютные концентрации триацилглицеролов, которые могут зависеть, например, от доли масла в образце шоколада, а углы между векторами, построенными в трехмерном пространстве, измерения которых – доли ТАГ: x – ОП₂, y – ОПС и z – ОС₂, определенные по площадям пиков на хроматограммах.

Список литературы

- 1 Lipp M., Anklam E. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate—Part B. Analytical approaches for identification and determination // Food Chemistry. – 1998. – V.62. – P. 99–108.
- 2 Çağınd Ö., Ötleş S. The health benefits of chocolate enrichment with dried fruits // Acta Sci. Pol.. Technol. Aliment. – 2009. - V.8. – P. 63-69.
- 3 Полякова Д. Какао в фармации. История и современность. // Аптека. – 2010. - № 765. - С. 566.
- 4 Modern techniques for food authentication / Ed. Da-Wen Sun. Elsevier Inc. 2008. – P. 393.
- 5 Hernandez B., Castellote A.I. Triglyceride analysis of cocoa beans from different geographical origins // Food Chemistry – 1991. – V.41. – P. 269–276.
- 6 Dionisi F., Golay P.-A., Hug B., Baumgartner M., Callier P., Destailats F. Triacylglycerol analysis for the quantification of cocoa butter equivalents (CBE) in chocolate: Feasibility study and validation // J. Agric. Food Chem. – 2004. – V.52. – P. 1835-1841.
- 7 Lisa M., Holčapek M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. A. – 2008. – V.1198–1199. – P. 115–130.
- 8 Guyon F., Absalon Ch., Eloy A., Salagoity M.H., Esclapez M., Medina B. Comparative study of matrix-assisted laser desorption ionization and gas chromatography for quantitative determination of cocoa butter and cocoa butter equivalent triacylglycerol composition // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2003. – V.17. – С. 2317–2322.
9. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Анисимович И.П., Туртыгин А.В. Применение обращено-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием для

обнаружения фальсификации сливочного масла. // Методы оценки соответствия. – 2007. - №6. – С. 10-

Индина Ирина Вячеславовна - магистрант, кафедра общей химии, Белгородский государственный университет, Белгород

Туртыгин Александр Владимирович - аспирант кафедры общей химии, Белгородский государственный университет, Белгород

Дейнека Виктор Иванович - д.х.н., профессор кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород

Дейнека Людмила Александровна - к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород

Indina Irina V. - magistrant, Belgorod State University, Belgorod, e-mail:

irinasaenko_25@mail.ru

Turtygin Alexander V. - post-graduate, General Chemistry chair, Belgorod State University, Belgorod

Deineka Victor I. - Dr.Sci. (Chemistry), professor, Belgorod State University, Belgorod

Deineka Ludmila A. - Ph.D. (Chemistry) Belgorod State University, Belgorod, e-mail: deineka@bsu.edu.ru