

В. И. Дейнека, Л. А. Дейнека, В. Н. Сорокопудов

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ. МЕТОД КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ И УСТАНОВЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИКАЦИИ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА

Белгородский государственный университет, Белгород, Россия

Показано, что обращенно-фазовая ВЭЖХ позволяет обнаруживать триглицериды масла мякоти плодов облепихи, содержащих радикалы пальмитолеиновой кислоты, на фоне триглицеридов традиционных масел-экстрагентов. Это позволяет выполнять быстрое установление подлинности масла и определять фальсификацию. Показано, что лишь заменой рефрактометрического детектора на спектрофотометрический процедура может быть продублирована по контролю каротиноидного состава масел.

Ключевые слова: облепиховое масло, ВЭЖХ, фальсификат, подлинность

Облепиховое масло является одним из важнейших продуктов переработки плодов облепихи *Hippophaë rhamnoides* L. Плоды этого растения необычны тем, что масло в них содержится не только в семенах, но и в мякоти плодов. Более того, семена, по-видимому, не имеют в настоящее время большого технологического значения. Основная масса масла накапливается в мякоти — до 80 % и более от всего масла (около 30 % по массе на воздушно-сухую мякоть) [1, 2]; именно из мякоти и извлекают этот целебный продукт [1, 3, 4]. В масле мякоти в чистом виде, имеющем оранжево-коричневую окраску, сконцентрированы важнейшие биологически активные вещества, придающие ему лечебные свойства — каротиноиды, витамины групп E, K и др. [1]. И если труднодоступность масла в нашей стране 2 десятилетия назад привела к созданию его заменяющего препарата — АЕКОЛ [5], то в настоящее время во многих аптеках можно обнаружить сразу несколько марок “Облепихового масла” различных производителей. В этой связи проблема стандартизации продукции и обнаружения фальсификации масла становится достаточно актуальной [6].

Цель данной работы — разработка быстрого и надежного метода определения подлинности облепихового масла (а также установления его фальсификации) с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Для обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Altex 110A, крана дозатора Rheodyne 7100 с петлей объемом 20 мкл, детекторы RI 401 Waters и Spectromonitor LC/9563 ($\lambda = 445$ нм). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1,5 (Ampersand Ltd. 2005). Условия хроматографирования: колонки 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм, Кромасил-100-C18, 5 мкм, Сепарон SGX C18, 5 мкм; подвижная фаза ацетонитрил – ацетон (10:90 об.) или (20:80 об.), 1 мл/мин.

Для хроматографирования использовали растворы масел концентрацией 5 – 20 мг в 1 мл подвижной фазы (или ацетона).

Плоды облепихи сортов “Перчик”, “Масличная”, “Юбилейная”, “Бочонок”, “Любительская” и “Брат

красного” были собраны в конце августа 2006 г в ботаническом саду БелГУ. Образцы “Облепиховых масел” были приобретены в аптеках Белгорода. В работе использовали подсолнечное масло “Олейна”, “Масло макадамии”, производитель ООО “Натуральная косметика”, “Масло авокадо”, производитель ООО ТПК “Ароматы жизни”.

Для экстракции масла 5 – 10 г свежих плодов (без семян) заливали последовательно порциями ацетона по 5 – 10 мл; плоды разминали под растворителем стеклянной палочкой; каждую порцию экстракта отделяли от остатка фильтрованием. Процесс повторяли до обесцвечивания твердого остатка. Все порции фильтрата объединяли, добавляли *n*-гексан и 10 % раствор хлорида натрия в воде. Гексановый слой дополнительно промывали тремя порциями 5-кратного объема 10 % раствора хлорида натрия. Влагу из экстракта удаляли выдерживанием над прокаленным сульфатом натрия. Масло мякоти плодов облепихи получали отгонкой *n*-гексана из очищенного экстракта под вакуумом.

Масло семян облепихи экстрагировали ацетоном из измельченных в фарфоровой ступке семян.

Для обозначения состава триглицеридов масел использовали буквенные обозначения радикалов жирных кислот: С — стеариновая (C18:0), П — пальмитиновая (C16:0), О — олеиновая (9-*цис*-октадеценовая, C18:1^{Δ9}), Л — линолевая (9,12-*цис*-октадекадиеновая, C18:2^{Δ9,12}). Запись ЛОП обозначает триглицерид, в котором имеются радикалы линолевой, олеиновой и пальмитиновой кислот (без указания их положения в молекуле). Инкрементом, например Δ(Л → О), называется разность логарифмов факторов удерживания 2 триглицеридов, состав которых различается только одним радикалом кислоты: $\Delta(Л \rightarrow О) = \lg k(Л_2О) - \lg k(Л_3) = \lg k(ЛОП) - \lg k(Л_2П)$ и т. д.

Результаты и их обсуждение

Одной из подлежащих контролю характеристик масел в настоящее время является их жирнокислотный состав [6]. При переходе от анализа жирнокислотного состава методом ГЖХ метиловых эфиров, полученных химической модификацией исследуемого образца, к контролю триглицеридного комплекса масел методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (без каких-либо воз-

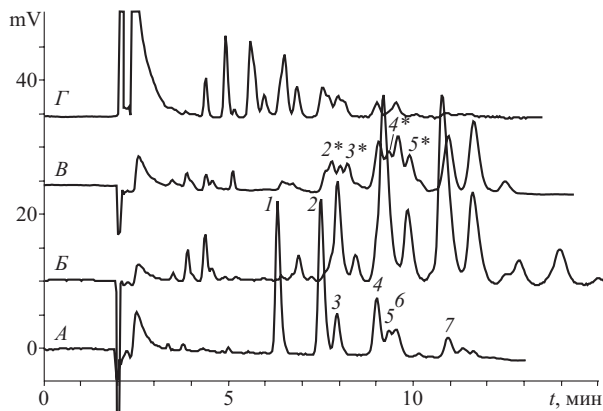


Рис. 1. Хроматограммы растительных масел, использованных в качестве масел сравнения: *A* — подсолнечное масло, *B* — масло макадамии; *B* — масло авокадо; *Г* — масло семян облепихи. Триглицериды: 1 — Л₃, 2 — Л₂О, 3 — Л₂П, 4 — ЛО₂, 5 — Л₂С, 6 — ЛОП, 7 — О₃, 2* — ЛПоО, 3* — ЛПоП, 4* — ПоО₂, 5* — ПоОП; подвижная фаза ацетонитрил – ацетон (10:90 об.), 1 мл/мин.

действий на образец кроме растворения) следует установить, возможно ли определение, триглицеридов, масел облепихи на фоне триглицеридов традиционных для России растительных масел, которые могут быть использованы при экстракции облепихового масла.

В России наиболее часто используется подсолнечное масло. В его состав входят триглицериды, образованные в основном радикалами линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот, причем, как показали проведенные ранее исследования, различия в хроматографическом профиле подсолнечных масел различных производителей, предлагаемых на рынках России, минимальны [7]. По хроматографическому профилю от подсолнечного масла мало отличаются многие масла, среди которых — кукурузное и тыквенное масла, масло виноградной косточки; появление в составе триглицеридов небольшого количества радикалов α -линоленовой (C18:3^{A9,12,15}) кислоты не слишком усложняет хроматограмму соевого масла [8, 9].

Характерной особенностью масла мякоти плодов облепихи является присутствие в триглицеридах значительных количеств радикалов пальмитолеиновой (9-*цис*-гексадеценовой, C16:1^{A9}, По) и вакценовой (11-*цис*-октадекаеновой, C18:1^{A11}) кислот. На долю пальмитолеиновой кислоты в масле мякоти приходится по разным источникам от 13 до 51 % от суммы кислот [4, 6, 10 – 13] с наиболее вероятным содержанием в диапазоне 25 ÷ 30 %. Следует отметить, что при этом в каждой из цитируемых работ разброс заметно меньше. Конечно, такие отличия могут быть связаны с различием в сортах, условиях произрастания и степени созревания использованных ягод. Однако нам не удалось обнаружить работ, содержащих метрологически обоснованные выводы об адекватности результатов анализов, выполняемых с включением стадии химической модификации триглицеридов в метиловые эфиры. Доказательство достоверности результатов таких определений методом сопоставления “введено – найдено” в случае реальных растительных масел вряд ли возможно. Поэтому-то и ценен метод анализа немодифицированных масел с использованием ЯМР [14, 15].

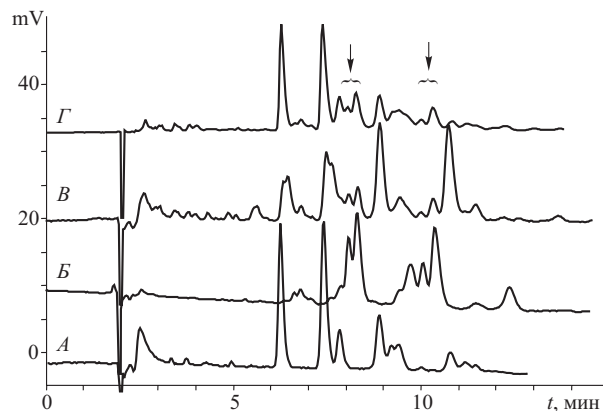


Рис. 2. Хроматограммы облепиховых масел: *A* — подсолнечное масло, *B* — масло мякоти плодов облепихи сорта “Масличная”; *B* — “Облепиховое масло из плодов и листьев”, Катунь Олеум, РФ; *Г* — “Облепиховое масло”, ЗАО “Алтайвитамины”, РФ. Подвижная фаза ацетонитрил – ацетон (10:90 об.), 1 мл/мин; стрелкой и скобкой отмечены диагностические пики на хроматограмме смеси облепихового масла с маслом-экстрагентом.

Пальмитолеиновая кислота в относительно больших количествах в растительных маслах встречается довольно редко. Кроме облепихи ее накопление характерно для, например, масел авокадо и макадамии [16, 17]. В соответствии с инкрементным подходом и рядом найденных ранее закономерностей изменения времен удерживания триглицеридов при замене одних радикалов ненасыщенных кислот другими [8, 9, 18], можно предположить следующее соотношение между инкрементами:

$$\Delta(\text{По} \rightarrow \text{О}) < \Delta(\text{Л} \rightarrow \text{О}).$$

Тогда триглицериды, образованные пальмитолеиновой кислотой, должны элюироваться позже триглицеридов, в которых пальмитолеиновая кислота заменена на линолевою. Как следует из представленных на рис. 1 хроматограмм масел, это предположение полностью подтверждается. Характерно, что в случае масла авокадо в диапазонах удерживания триглицеридов Л₂О – Л₂П и ЛО₂ – ЛОП появляются “дубликаты” (ЛПоО и ЛПоП) и (ПоО₂ и ПоОП). Отметим, что в масле семян облепихи существенно больше ненасыщенных кислот по сравнению с маслом мякоти плодов и его трудно было бы обнаружить на фоне, например, льняного масла.

Таким образом, не удивительно, что масло мякоти плодов облепихи по временам удерживания ряда триглицеридов заметно отличимо от линолево-олеиновых масел (рис. 2) и может быть обнаружено на таком фоне. При наличии масла облепихи в экстракте появляется пара пиков после триглицерида состава Л₂П и группа пиков в диапазоне от ЛОП до О₃ последнего триглицерида, который практически отсутствует в масле мякоти плодов облепихи.

Методика установления подлинности (или фальсификации) облепихового масла

1) Применяли хроматографическую систему с рефрактометрическим детектированием и колонкой размером 250 × 4 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом (например, Диасфер-110-С18, 5 мкм, “Био-

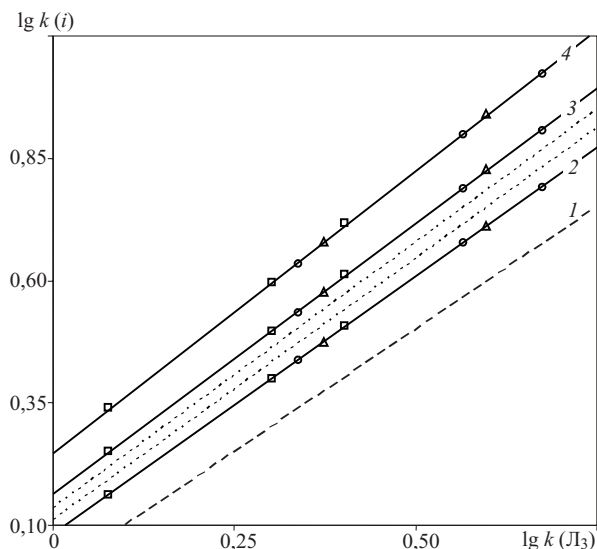


Рис. 3. График относительного удерживания трилицеридов: 1 — $\lg k(\text{Л}_3)$, 2 — $\lg k(\text{Л}_2\text{O})$, 3 — $\lg k(\text{ЛО}_2)$, 4 — $\lg k(\text{O}_3)$ относительно — $\lg k(\text{Л}_3)$; данные, полученные для стационарных фаз марок: \circ — Диасфер-110-С18, \square — Сепарон SGX, \triangle — Кромасил-100-С18; пунктирные линии — границы зоны элюирования характеристических для облепихового масла триглицеридов.

ХимМак”, Москва) в подвижной фазе ацетонитрил – ацетон (10:90 об.), 1 мл/мин. Хроматографическая система должна удовлетворять следующим требованиям: эффективность по Л_3 не менее 8000 т.т., время удерживания Л_3 — не менее 6 мин.

Для стационарных фаз, обладающих существенно меньшей гидрофобностью по сравнению с гидрофобностью фазы Диасфер-110-С18, желателно увеличить содержание ацетонитрила в подвижной фазе до выполнения указанных выше требований.

2) Готовят раствор “стандартного” масла: 100 ± 10 мг пищевого подсолнечного масла (“Олейна”, “Слобода”, “Милора” или практически любого другого производителя, поскольку, по нашим исследованиям, подсолнечные масла, обогащенные олеиновой кислотой, на рынке России пока не доступны) растворяют в 5 мл подвижной фазы.

3) Записывают хроматограмму, которая должна быть аналогичной представленной на рис. 1, а. По временам удерживания (t_R) пиков Л_3 , $\text{Л}_2\text{O}$, ЛО_2 и O_3 определяют t_0 “термодинамическое мертвое время удерживания” по соотношениям:

$$\frac{t_R(\text{Л}_3) - t_0}{t_R(\text{Л}_2\text{O}) - t_0} = \frac{t_R(\text{Л}_2\text{O}) - t_0}{t_R(\text{ЛО}_2) - t_0} = \frac{t_R(\text{ЛО}_2) - t_0}{t_R(\text{O}_3) - t_0}$$

Под “аналогичностью” хроматограмм следует понимать сходство в количестве основных пиков на хроматограммах и в подобии соотношений интенсивностей соответствующих пиков. В качестве “стандартного” масла могут быть использованы другие масла, мало отличающиеся по хроматографическому профилю от подсолнечного — кукурузное, тыквенное и др.

4) Готовят раствор исследуемого облепихового масла: 100 ± 10 мг облепихового масла растворяют в 5 мл подвижной фазы и записывают хроматограмму. Рассматривают группу проблемных (не разделяемых в

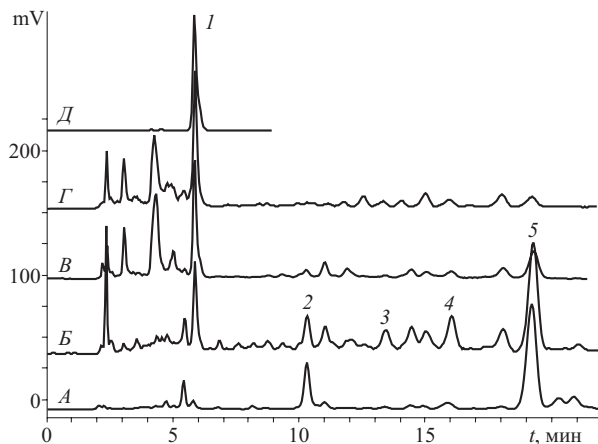


Рис. 4. Хроматограммы каротиноидных комплексов: А — экстракт плодов физалиса; В — масло облепихи сорт “Юбилейная”; В — масло облепихи сорт “Перчик”; Г — “Облепиховое масло”, ЗАО “Алтайвитамины”; Д — фальсификат. 1 — β -каротин, 2 — β -криптоксантина пальмитат, 3, 4 и 5 — димиристат, миристат-пальмитат и дипальмитат зеаксантина. Подвижная фаза ацетонитрил – ацетон (20:80 об.), 1 мл/мин

условиях методики) триглицеридов со временами удерживания между $t_R(\text{Л}_2\text{O})$ и $t_R(\text{ЛО}_2)$, т.е. попадающими в диапазон (между 2 пунктирными линиями на рис. 3):

$$1,068 \log k(\text{Л}_3) + 0,110 < \log k(i) < 1,090 \log k(\text{Л}_3) + 0,136$$

Наличие таких пиков свидетельствует о присутствии масла мякоти облепихи в исследуемом образце. В фальсифицированных образцах этих пиков нет.

Известно, что при смене стационарных фаз (даже одной и той же марки, но относящихся к различным партиям) возможны существенные изменения в порядке элюирования компонентов смеси. Однако в соответствии с методом относительного анализа удерживания [19] для слабополярных сорбатов (к которым относятся триглицериды) уравнения относительного удерживания в широком диапазоне состава подвижных фаз не чувствительны к смене стационарных С18-фаз (включая смену марки фазы). Для подтверждения этого положения на рис. 3 представлены параметры удерживания триглицеридов, полученные на 3 различных стационарных фазах (Диасфер-110-С18; Кромасил-100 С18 и Сепарон SGX С18). Координаты каждой точки определяются логарифмом фактора удерживания соответствующего триглицерида и логарифмом фактора удерживания Л_3 , выбранного в качестве вещества сравнения в одних и тех же условиях. При построении графика использовали подвижные фазы, содержащие 0, 10, 20 и 34 об. % ацетонитрила в ацетоне.

Для быстрого выполнения контроля облепихового масла используются условия, при которых не происходит полного разделения пиков триглицеридов. При желании степень разделения может быть увеличена использованием элюентов с большей объемной долей ацетонитрила (более 25 об. %) или тандема из 2 колонок, подсоединенных последовательно; однако при этом теряется экспрессивность метода.

Предложенный метод был применен к анализу ряда “Облепиховых масел”, приобретенных в розничной

торговле и масел мякоти плодов некоторых сортов облепихи из коллекции ботанического сада БелГУ. Хроматограммы масел мякоти плодов облепихи всех 6 исследованных сортов практически не различались между собой, в то время как окраска плодов изменялась от желтой до оранжево-красной. Различие же в хроматограммах продажных “облепиховых масел” было значительным. В образцах продукции ЗАО “Алтайвитамины” (на фоне масла типа подсолнечного) и “Катунь Олеум” (на фоне масла олеиново-линолевого) на долю масла мякоти плодов облепихи приходилось 30–50 %; около 20 % — в продукции (ООО НПФ “Алтайский букет”), а в 3 образцах “Облепиховых (по надписи на этикетках) масел” найдено лишь хорошего качества масло типа подсолнечного.

Второй параметр, который считается важнейшим и подлежащим контролю, — каротиноидный состав масла. При очевидной простоте и доступности спектрофотометрического метода анализа суммы каротиноидов его информативность в общем случае зачастую сомнительна, особенно с учетом важности биологической активности неомыляемого остатка масла (см. работу [20] и ссылки в ней). Предложенный выше метод может быть использован также и для контроля каротиноидного состава масла в аналогичных условиях для тех же образцов растворов масел, только с заменой рефрактометрического детектора на спектрофотометрический.

Накопление каротиноидов в плодах облепихи зависит от сорта, при этом окраска плодов входит в число характеристических параметров сорта. Различие в каротиноидных комплексах весьма велико даже для исследованных в данной работе сортов, которые были выращены в одинаковых условиях (рис. 4). В плодах с желтой окраской основные компоненты комплекса — диэферы зеаксантина, при появлении красных тонов — основным оказывается компонент со временем удерживания из диапазона элюирования моноэфиров ксантофиллов. Отметим, что для всех исследованных сортов облепихи на β -каротин приходилось не более 20 % от суммарной площади пиков на хроматограмме. Вероятно, стоит задуматься о том, имеет ли смысл выражение содержания каротиноидов в облепиховом масле в пересчете на β -каротин, если зеаксантин (основной компонент) вообще не обладает провитаминной активностью. В образцах “Облепиховых масел”, которые оказались наилучшими по содержанию масла мякоти, видно присутствие диэфиров зеаксантина, хотя доля, приходящаяся на β -каротин, заметно больше, чем для плодов, выращенных в Белгороде. Наконец, для образцов, определенных как фальсификаты по

триглицеридному составу, были получены хроматограммы с единственным пиком β -каротина.

Таким образом, метод обращенно-фазовой ВЭЖХ может быть использован для быстрого установления подлинности (или обнаружения фальсификации) облепиховых масел по триглицеридному составу с рефрактометрическим детектированием и (или) по каротиноидному составу (для тех же образцов растворов масел, что были использованы при рефрактометрическом детектировании триглицеридов) после замены детектора на спектрофотометрический.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. О. Шнайндман, *Производство витаминов*, Пищевая промышленность, Москва (1973).
2. T. V. Chernenko, N. T. Ul'chenko, A. I. Glushenkova, *Chem. Nat. Comp.*, **40**, 529–531 (2004).
3. T. Beveridge, T. S. C. Li, B. D. Oomah, A. Smith, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 3480–3488 (1999).
4. S. Cenkowski, R. Yakimishen, R. Przybylski, W. E. Muir, *Can. Biosyst. Eng.*, **48**, 3,9–3,16. (2006).
5. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2005), с. 646.
6. А. А. Зинченко, В. Н. Бузов, *Фармаком*, № 4, 1–7 (2003).
7. В. И. Дейнека, Л. А. Дейнека, Н. Г. Габрук и др., *Ж. аналит. химии*, **58**(12), 1294–1299 (2003).
8. В. И. Дейнека, Г. М. Фофанов, В. А. Хлебников, Л. Н. Баятинская, *Хранение и переработка сельхозсырья*, № 11, 20–23 (2002).
9. В. И. Дейнека, *Химия природ. соедин.*, № 6, 433–436 (2003).
10. A. Kaminskas, V. Briedis, R. Budrioniene, et al., *Biologia*, № 2, 39–41 (2006).
11. I. I. Lobacheva, W. Letchamo, L. Huszar, et al., in: *Trends in new crops and new uses*, J. Janick and A. Whipkey (eds.), ASHS Press, Alexandria, VA (2002).
12. B. Yang, H. P. Kallio, *J. Agric. Food. Chem.*, **49**, 1939–1947 (2001).
13. H. Kallo, B. Yang, P. Peippo, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3004–3009 (2002).
14. Л. В. Зверев, С. М. Прудников, Б. Я. Витюк и др., *Ж. аналит. химии*, **56**(11), 1173–1175 (2001).
15. S. Rezzi, D. E. Axelson, K. He'berger, et al., *Anal. Chim. Acta*, **552**, 13–24 (2005).
16. E. M. Gaydou, Y. Lozano, J. Ratovohery, *Phytochem.*, **26**(6), 1595–1597 (1987).
17. L. S. Maguire, S. M. O'Sullivan, K. Galvin, et al., *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **55**(3), 171–178 (2004).
18. В. И. Дейнека, В. М. Староверов, Г. М. Фофанов, Л. Н., Баятинская, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(7), 44–47 (2002).
19. В. И. Дейнека, *Ж. физ. химии*, **80**(3), 507–510 (2006).
20. В. Лечамо, И. И. Лобачева, *Химия растит. сырья*, № 1, 22–24 (1997).

Поступила 13.11.2006

REVERSED-PHASE HPLC ANALYSIS OF VEGETABLE OILS: MONITORING AUTHENTICITY AND REVEALING ADULTERATION OF SEA BUCKTHORN OIL

V. I. Deineka, L. A. Deineka, and V. N. Sorokopudov

Belgorod State University, Belgorod, Russia

It is shown that a reverse-phase HPLC technique can be used to detect sea-buckthorn oil triglycerides (containing palmitoleic acid radicals) on the background of conventional oils used for extraction. This method allows the authenticity of the sea-buckthorn oil to be checked and the cases of adulteration to be revealed. It is shown that, by only replacing the refractive-index detector with a spectrophotometric one, it is possible to repeat the product identification with respect to the carotenoid composition of the oil.

Keywords: sea buckthorn oil, reversed-phase HPLC, monitoring authenticity, revealing adulteration