

高效液相色谱法测胆固醇含量鉴别地沟油

郭涛, 杜蕾蕾, 万辉, 何东平*

(武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 利用高效液相色谱法测定地沟油中胆固醇含量, 继而定性分析食用油中是否掺地沟油。实验结果表明, 当待检菜籽油样品中胆固醇的含量大于 0.05mg/g 时, 可以很明显地观察到胆固醇色谱峰, 且菜籽油中胆固醇含量随地沟油的增加呈线性增加, 而合格的食用植物油未检测出胆固醇。可利用此特征作为判断植物油中是否掺混了地沟油的依据。

关键词: 菜籽油; 地沟油; 胆固醇; 色谱

Identification of Hogwash Oil-adulterated Rapeseed Oil through HPLC Detection of Cholesterol Content

GUO Tao, DU Lei-lei, WAN Hui, HE Dong-ping*

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Cholesterol content was determined with HPLC method for identification of hogwash oil-adulterated rapeseed oil. A good linear correlation between the adulteration amount of hogwash oil and the cholesterol content, and cholesterol was not detected in qualified rapeseed oil. Thus cholesterol content could be used as an indicator for identification of oil adulterated with hogwash oil with the lowest detection limit of 0.05 mg/g.

Key words: rape seed oil; hogwash oil; cholesterol; chromatography

中图分类号: TS227

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)22-0286-04

餐厨废油脂中的地沟油是多种动、植物油脂的混合物, 其中含有大量的动物油脂^[1]。动物脂肪中普遍含有胆固醇^[2](猪油、猪板油和牛油中胆固醇含量分别为 0.75、1.01 和 1.45mg/g), 而在植物油中一般不含或含有极少量的胆固醇^[3], 但存在结构上与胆固醇十分相似的物质如谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇等多种植物甾醇^[4]。

油样经皂化后, 胆固醇和甾醇作为不皂化物^[5]被提取出来, 再采用极性毛细管色谱柱, 在设定的液相色谱条件下, 可将胆固醇和植物甾醇完全分离^[6]。本实验通过制作胆固醇含量标准曲线, 利用高效液相色谱法测定地沟油中胆固醇含量, 继而定性分析合格食用油中是否掺了废油脂, 本研究旨在为检测部门辨别植物油中是否掺有地沟油提供一种准确而且迅速的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

地沟油 宁波凌诚再生资源科技开发有限公司; 菜

籽油、花生油、大豆油、花生调和油和煎炸老油 市售。

胆固醇标样(纯度 ≥ 99%) 德国 Sigma 公司; 正己烷(分析纯)、乙醇(分析纯)、0.5mol/L KOH、氮气、磷酸(分析纯)、乙腈(分析纯)。

1.2 仪器与设备

傅里叶变换红外分光光谱仪、高效液相色谱仪 (Varian prostar 210 泵; 335 二矩阵检测器; model410 进样器) 美国 Waters 公司; 10μl 平头微量进样器 上海安鸽工贸有限公司; 5μl 微量进样器 上海安亭微量进样器厂; 电子分析天平(感量 0.0001g); TGL-16A 高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂; 空气压缩机和真空泵 美国 Louisiana 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

菜籽油中分别掺入质量分数为 1%、10%、20%、40%、60%、80% 的地沟油样品, 分别记为 1~6 号。对照组食用油有菜籽油、花生油、大豆油、花生调和油。

收稿日期: 2008-12-11

基金项目: 武汉工业学院研究生创新基金项目(07cx004)

作者简介: 郭涛(1983 -), 男, 硕士研究生, 研究方向为油脂加工与提取。E-mail: guotao1-1@163.com

* 通讯作者: 何东平(1957 -), 男, 教授, 博士, 研究方向为油脂工程。E-mail: hedp123456@163.com

1.3.2 油脂皂化

将样品1~6号微微加热并摇动,使每个样品混合均匀。称取1.0000g待测油脂样品,置于25ml容量瓶中,依次加入2ml 0.5mol/L KOH溶液、5ml乙醇溶液,在水浴锅中缓慢皂化,期间不时振摇容量瓶使皂化完全。

1.3.3 胆固醇提取

皂化完成后,取出容量瓶冷却至室温后,加入5ml正己烷溶液,轻轻振摇容量瓶,让其静置分层1h,将上层液倒出,再用正己烷提取两次,每次5ml,合并3次萃取液,用注射器吸取萃取液3ml置于小玻璃瓶中,用氮气将瓶中正己烷吹干后,加入400 μ l乙醇溶解瓶中残留物,即提取的胆固醇。每次取10 μ l乙醇胆固醇溶液进样,进行高效液相测定。

1.3.4 加标回收实验

为了验证高效液相方法对胆固醇的测定效果,对油脂样品进行加标回收实验,取200 μ l 0.10mg/ml胆固醇标准液,将之加入到取样量为3ml正己烷萃取液的小玻璃瓶中,后面按照1.3.3节步骤进行。

1.4 分析方法

1.4.1 皂化度测定

油脂在皂化过程中,脂肪酸甘油酯的碳氧双键转化为脂肪酸盐的碳氧双键,两种结构中的碳氧双键在红外光谱中的吸收位置不同,因此可以测定不同反应阶段的红外光谱,比较吸收峰的相对强弱来确定皂化程度。

1.4.2 高效液相色谱条件

分析柱为Polaris C₁₈-a(100mm $\times$ 2mm, 5 μ m),流动相A:水(内含0.1% H₃PO₄);流动相B:乙腈;柱温30 $^{\circ}$ C,检测波长为205nm,流速:1.0ml/min。起始:20% A, 80% B; 2.0~20.0min: 0% A, 100% B; 20.0min后: 20% A, 80% B。

1.4.3 胆固醇工作曲线的绘制

准确称取胆固醇标准品50.0mg,溶于少量乙醇中,并用乙醇定容至50ml容量瓶中,得胆固醇储备液1.0mg/ml。取此溶液0.00、0.10、0.20、0.40、1.00、1.50ml于10ml容量瓶中,用乙醇定容,制成胆固醇标准使用液为0.00、0.01、0.02、0.04、0.10、0.15mg/ml,经滤膜过滤后,分别取10.0 μ l进行色谱测定,以峰面积为纵坐标,胆固醇浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 皂化条件确定

2.1.1 皂化温度的确定

皂化度随反应温度的升高而增大,温度越高,皂化反应的速度加快,皂化反应较完全。但是温度超过

60 $^{\circ}$ C,乙醇汽化过快,不利于实验进行,因此皂化温度确定在60 $^{\circ}$ C。

2.1.2 皂化时间的确定

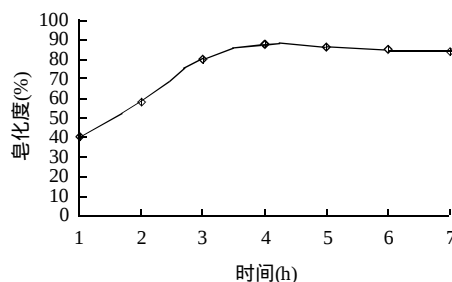


图1 反应时间对皂化度的影响

Fig.1 Effect of time on saponification degree of rapeseed oil

取不同反应时间的皂化物测定红外光谱,得到皂化度随反应时间变化的关系曲线(图1),反应时间越长,皂化度越大,当反应进行到4h后,皂化反应基本完成。

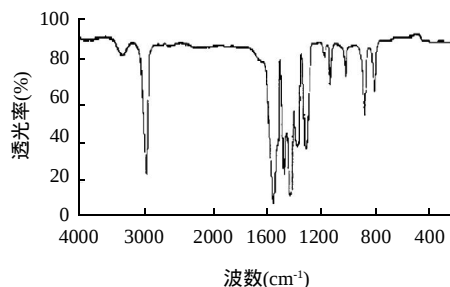


图2 皂化完成时红外光谱图

Fig.2 Infrared spectrogram of completely saponified oil

如图2所示,脂肪酸甘油酯中碳氧双键在1440cm⁻¹处出现吸收峰,脂肪酸盐中碳氧双键在1540cm⁻¹处出现吸收峰,由此可以判定皂化情况。油脂样品皂化越彻底,胆固醇和甾醇作为不皂化物被浸提的就越完全。

2.2 样品检测结果

胆固醇标样、菜籽油、掺入1%、10%、40%地沟油的菜籽油样品,检测结果如图3~7所示。

图4与图3菜籽油色谱图对比,当菜籽油中仅仅掺入1%的地沟油时,它的色谱图1~8min出来的峰型基线严重漂移,随着地沟油掺入量增加,漂移程度越大,信号越强烈。而在高效液相实验条件下,检测的其他样品分离情况良好,并未发生基线严重漂移现象。说明峰型基线漂移并不是流动相、实验条件及设备本身的原因,在检测波长为205nm条件下油中大部分物质都有信号响应,地沟油所含物质更为复杂,多种共存物质难以分离导致基线漂移。

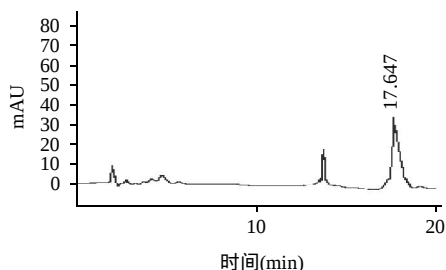


图3 胆固醇标样色谱图

Fig.3 Chrometogram of choesterol

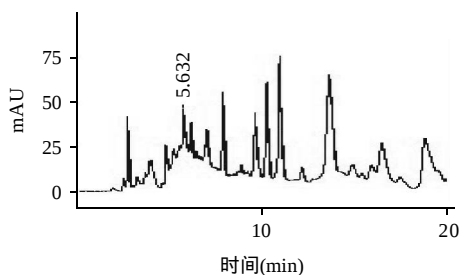


图4 菜籽油色谱图

Fig.4 Chromatogram of rape seed oil

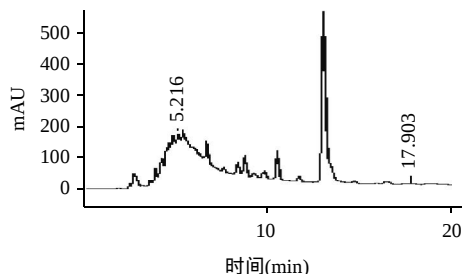


图5 掺入1%地沟油的菜籽油色谱图

Fig.5 Chromatogram of rape seed oil with 1% hogwash oil

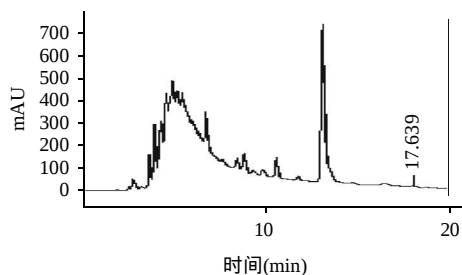


图6 掺入10%地沟油的菜籽油色谱图

Fig.6 Chromatogram of rape seed oil with 10% hogwash oil

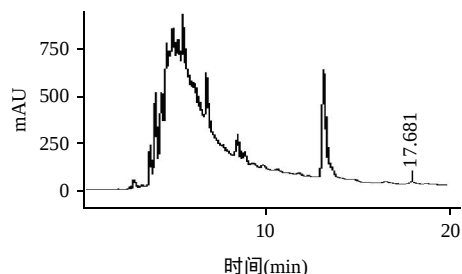


图7 掺入40%地沟油的菜籽油色谱图

Fig.7 Chromatogram of rape seed oil with 40% hogwash oil

由图3可知,胆固醇标样的保留时间为17.647min。如图6所示,当食用菜籽油中掺入10%的地沟油(胆固醇浓度为0.0467mg/g)时,从其色谱图中可明显看到胆固醇的色谱峰,即可认为当未知植物油样中胆固醇含量超过0.05mg/g时,其中一定掺了地沟油。如图7所示当食用菜籽油中掺入40%的地沟油(胆固醇浓度为0.0531mg/g)时,从色谱图中可以明显看到胆固醇的色谱峰。因此,当菜籽油中掺入超过10%的地沟油时,即可通过此检测出来,低于10%时则无法确定。

2.3 胆固醇工作曲线

2.3.1 胆固醇标准工作曲线

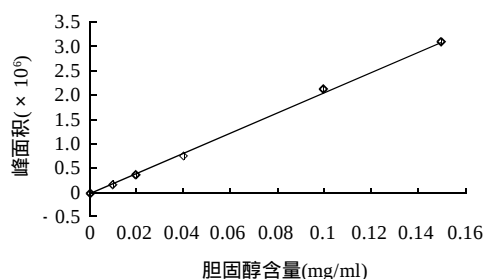


图8 胆固醇标准工作曲线

Fig.8 Cholesterol standard curve

由图8可知,标准曲线方程为 $Y=20829402.19X - 38296.03$, $R^2=0.9993$ 。在胆固醇标准液进样量为 $10\mu\text{l}$,含量在 $0\sim 0.15\text{mg/ml}$ 时,样品中胆固醇的含量与峰面积具有良好的线性关系。

2.3.2 地沟油掺入量与胆固醇含量的关系

地沟油样品1~6号经高效液相测定后,得出每种样品对应的峰面积,将其带入下式中,根据所得数据制作地沟油掺入量与胆固醇含量的关系曲线,见图9。

$$c_0 = \frac{(A + 38296.03) \times 400 \times 10^{-3} \times 5}{20829402.19m}$$

式中: A 为峰面积; m 为样品质量,g; c_0 为样品胆固醇含量,mg/g。

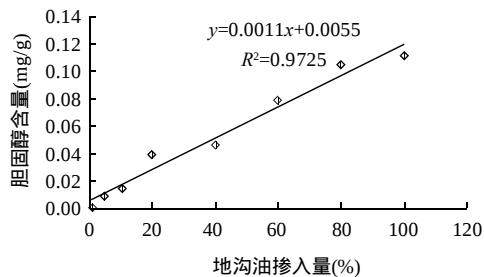


图9 地沟油掺入量与胆固醇浓度关系

Fig.9 Cholesterol concentration vs hogwash oil adulteration

如图9所示,随着地沟油掺入量的增加,菜籽油中胆固醇含量也随之呈线性增加。而对照组中菜籽油、花生油、大豆油、花生调和油和煎炸老油均未检出胆固醇。

2.3 回收率实验结果

表1 胆固醇回收率实验结果
Table 1 Cholesterol recoveries in various oils

样品	本底值 (mg/g)	加标量 (mg/g)	加标后测出量 (mg/g)	回收率 (%)	平均值 (%)
地沟油	0.1791	0.10	0.2716	97	95
菜籽油	0	0.10	0.0932	93	
花生油	0	0.10	0.0954	95	
大豆油	0	0.10	0.0967	97	
花生调和油	0	0.10	0.0941	94	

实验结果表明,平均加标回收率达95%,高效液相色谱法可较好的测定油样中胆固醇含量。

3 结 论

3.1 皂化过程中,皂化温度保持在60℃,皂化时间为4h时效果达到最优。

3.2 高效液相色谱图表明,当待检植物油样品中胆固醇的含量大于0.05mg/g时,可以很明显地观察到胆固醇色谱峰,而合格的食用植物油未检测出胆固醇,可利用此特征作为判断植物油中是否掺混了地沟油的依据。

3.3 如地沟油掺入量与胆固醇含量关系曲线所示,随着地沟油掺入量的增加,菜籽油中胆固醇含量也随之呈线性增加。

3.4 回收率平均值达95%,因此可以用作判定大部分植物油是否掺伪。

参考文献:

- [1] 潘剑宇,尹平河. 泔水油、煎炸老油与合格食用植物油的鉴别研究[J]. 食品科学, 2003, 24(8): 27-29.
- [2] 全常春,尹平河. 精炼餐饮业地沟油挥发性危害成分的GC/MS静态顶空分析[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 128-134.
- [3] 刘薇,尹平河. 电导率法快速鉴别泔水油[J]. 城市环境与城市生态, 2004, 17(3): 4-6.
- [4] 刘薇,尹平河,赵玲. 荧光法测定十二烷基苯磺酸钠鉴别泔水油的研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(5): 24-26.
- [5] Codex-Stan 210 Codex standard for named vegetable oils(amended 2003, 2005) [S].
- [6] 朱永义,周展明. 伪劣食品检验与鉴别[M]. 北京: 农业出版社, 1992.