

# 柱前衍生化-高效液相色谱法测定地沟油中的脂肪醛

沈卫阳, 王洁琼, 王 婉, 于清峰, 肖 莹\*

(中国药科大学理学院, 江苏 南京 211198)

**摘 要:** 研究利用油脂中的不饱和脂肪酸在提炼过程中发生脂质过氧化反应、产生低分子脂肪醛的特点, 采用柱前衍生化-高效液相色谱法, 以2,4-二硝基苯肼为醛的衍生化试剂、2-甲基吡啶硼烷为还原剂, 通过测定脂肪醛类物质来检测食用油中是否掺入了地沟油。结果表明: 与食用油相比, 精制地沟油中甲醛、乙醛的含量显著增加, 可据此判断样品是否为地沟油。该方法专属性强、灵敏度高、准确性好, 极大地优化了地沟油的检测与鉴定流程。

**关键词:** 地沟油; 脂肪醛; 2,4-二硝基苯肼; 高效液相色谱

Determination of Aliphatic Aldehydes in Waste Cooking Oil by Pre-Column Derivatization-HPLC Method

SHEN Weiyang, WANG Jieqiong, WANG Wan, YU Qingfeng, XIAO Ying\*

(School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**Abstract:** By taking advantage of lipid peroxidation of unsaturated fatty acids and consequent generation of a variety of highly reactive small molecular aliphatic aldehydes during the refining of waste cooking oil, a simple and highly sensitive method was established based on the precolumn derivatization of aliphatic aldehydes utilizing 2,4-dinitrobenzene hydrazine (DNPH) followed by high performance liquid chromatography (HPLC). Further, high sensitivity was obtained by adding 2-picoline borane (2-PB) as a reducing agent to convert *cis*- and *trans*-isomers into the same structure. Compared with edible oil, the contents of formaldehyde and acetaldehyde in refined waste oil increased significantly, providing an indicator to discriminate waste cooking oil. This method is specific, highly sensitive and accurate and greatly improves the procedure for detection and identification of waste cooking oil.

**Key words:** waste cooking oil; aliphatic aldehyde; 2,4-dinitrobenzene hydrazine; high performance liquid chromatography (HPLC)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201614028

中图分类号: TS229

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 14-0160-05

引文格式:

沈卫阳, 王洁琼, 王婉, 等. 柱前衍生化-高效液相色谱法测定地沟油中的脂肪醛[J]. 食品科学, 2016, 37(14): 160-164.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201614028. <http://www.spkx.net.cn>

SHEN Weiyang, WANG Jieqiong, WANG Wan, et al. Determination of aliphatic aldehydes in waste cooking oil by pre-column derivatization-HPLC method[J]. Food Science, 2016, 37(14): 160-164. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201614028. <http://www.spkx.net.cn>

近年来, 媒体多次报道地沟油经回收、加工重新流入食用油市场, 由于地沟油质量和卫生较差, 并且其中有害物质严重超标<sup>[1-2]</sup>, 可诱发多种疾病甚至致癌<sup>[3-4]</sup>。目前质检部门对食用油的检测主要是理化指标检查<sup>[5-6]</sup>, 如胆固醇含量<sup>[7]</sup>、电导率<sup>[8-9]</sup>、脂肪酸相对饱和度<sup>[10]</sup>、易挥发成分烷烃<sup>[11]</sup>、酸价、羰基值、钠氯离子含量<sup>[12-14]</sup>、

皂化值、过氧化值、碘值、重金属含量、三酰甘油聚合物、氧化三酰甘油<sup>[15-17]</sup>等指标。但这些常规方法流程多、耗时长, 特异性不强, 且精制的地沟油均符合规定, 给质检部门和相关机构带来很大的困扰。因此如何快速有效鉴别和检测食用油中是否混入地沟油, 正成为研究的热点。

收稿日期: 2015-10-26

基金项目: 中国药科大学中央高校基本科研业务费专项; 江苏省自然科学基金项目 (BK20140654)

作者简介: 沈卫阳 (1970—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为药物分析。E-mail: wyshen@hotmail.com

\*通信作者: 肖莹 (1977—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为药物分析。E-mail: xyxyhello@sina.com

地沟油提炼自经加工过的普通食用油脂,其主要成分为高级脂肪酸甘油酯,在地沟油的加工、提炼过程中受氧气、高温等因素的作用,其中的不饱和脂肪酸甘油酯会发生水解及脂质过氧化反应<sup>[18-19]</sup>,进一步裂解形成食用油中本身不含的脂肪醛类物质<sup>[20-21]</sup>。基于该原理,董树清等<sup>[22-23]</sup>使用2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrobenzene hydrazine, DNPH)作为醛的衍生化试剂,应用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法对精炼地沟油进行了检测。然而DNPH与脂肪醛反应时会生成C=N双键的顺、反异构体,这会使分析结果不准确,降低检测灵敏度。Uchiyama等<sup>[24-25]</sup>研究表明,2-甲基吡啶硼烷(2-picoline borane, 2-PB)可选择性还原C=N双键,使C=N双键顺、反异构体转化为相同结构。本实验采用DNPH衍生化、2-PB还原后用HPLC法测定地沟油中脂肪醛的方法,对食用油及地沟油中可能含有的饱和脂肪醛进行检测并定量,结果表明该方法简单易行、准确可靠、灵敏度高,可为地沟油的检测提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

不同批次食用油(福临门葵花籽油)购于南京市超市,且已开启包装;粗制地沟油为某食堂餐厨垃圾中的上层油脂漂浮物经过过滤和加热除水后的残留物,精制地沟油是取粗制地沟油参考董树清等<sup>[22-23]</sup>的方法自制。

乙醛(≥99.5%)、丙醛(≥99.5%)、丁醛(≥99.5%)、戊醛(98%)、己醛(≥99.0%)、庚醛(≥98%)、辛醛(99%)、壬醛(96%)、癸醛(97%) 上海阿拉丁公司;衍生化试剂DNPH(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;2-PB络合物(95%) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;乙腈(色谱纯) 默克股份两合公司;水为超纯水;纯氮(≥99.99%) 南京上元工业气体厂。

### 1.2 仪器与设备

HPLC仪(包括1379脱气机、1312二元泵、1314紫外检测器) 美国Agilent公司;TS-100恒温混匀仪 杭州瑞诚仪器有限公司;XK-1200型离心机 江苏新康医疗器械有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 混合醛标准品衍生化反应

##### 1.3.1.1 混合醛标准溶液的制备

分别取一定量的乙醛、丙醛、丁醛、戊醛、己醛、庚醛、辛醛、壬醛、癸醛标准品溶于乙腈配成20 mmol/L混合醛储备液。将储备液稀释10倍,得到2 mmol/L的混合醛标准溶液,置冰箱中待用。

#### 1.3.1.2 混合醛标准溶液的衍生化反应及产物的还原

取2 mmol/L混合醛标准溶液50 μL与2 mmol/L DNPH-乙腈溶液350 μL按物质的量比1:7混合,加入0.2 mol/L磷酸溶液30 μL,加乙腈至1 000 μL,将混合液在600 r/min、60 °C条件下反应3 h。反应结束后将反应液冷却至室温,加入0.5 mol/L 2-PB-乙腈溶液300 μL、85%的磷酸溶液10 μL,继续反应1 h,用氮吹法将溶剂吹干,残留物用65%的乙腈1 mL溶解,0.45 μm微孔滤膜过滤,取20 μL续滤液进样分析。

#### 1.3.2 供试油样的收集与制备

##### 1.3.2.1 地沟油的采集与精炼

参考董树清等<sup>[22]</sup>的方法,将收集的废油先用棉花过滤,滤液加热除水,得粗制地沟油。在2.5 mL粗制地沟油中加入1 mL 1.0 mol/L氢氧化钠溶液,油样迅速变混浊,出现白褐色絮状物,再加入0.5 mL 10%氯化钠溶液静置过夜,油样分层。分层后的油样加入一定量活性炭,在115 °C油浴中静置30 min后过滤得到金黄色透明的精制地沟油,其外观与食用油基本一致。

##### 1.3.2.2 供试样品的制备

取食用油、粗制地沟油、精制地沟油各200 μL,分别加入正己烷200 μL、2 mmol/L DNPH-乙腈溶液570 μL、0.2 mol/L磷酸溶液30 μL,混匀,在600 r/min、60 °C条件下反应3 h。反应结束后向反应液中分别加入0.5 mol/L 2-PB的乙腈溶液300 μL、85%磷酸溶液10 μL,继续反应1 h。还原后的溶液用少量乙腈萃取3次,合并萃取液,将萃取液用氮气吹干,残留物用65%的乙腈500 μL溶解,0.45 μm微孔滤膜过滤,各取20 μL续滤液进样分析。

#### 1.3.3 HPLC条件

色谱柱为Thermo BDS HYPERSIL C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测波长355 nm,流速1 mL/min,进样量20 μL,流动相:甲醇与水梯度洗脱(0~7 min,甲醇65%~72%;7~48 min,甲醇72%~95%)。

#### 1.3.4 供试样品分析

取供试样品20 μL分别注入HPLC仪中,以保留时间定性,按试样峰面积与标准样品比较定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 定量方法分析

DNPH与脂肪醛反应生成腙时,由于产物结构中含有C=N双键而形成顺反异构体,从而影响脂肪醛类化合物的准确定量。Uchiyama等<sup>[24-25]</sup>的研究表明,2-PB可选择性还原C=N双键为C—N单键,使顺反异构体转化为相同结构,反应机理见图1。因此本实验将DNPH-脂肪醛

衍生物用2-PB进行还原，不但简化了色谱图，而且能够更准确地测定脂肪醛的含量。混合醛标准品经DNPH衍生化后进样的色谱图见图2A，由于C=N双键的存在导致产物中出现异构体，且随着碳链变长，异构体含量也逐渐增加。而衍生物经2-PB还原后色谱图见图2B，两个异构体被还原为单一产物，其保留时间与还原前相比略有提前，但完全成为单峰，因而简化了色谱图，便于脂肪醛的准确定量。

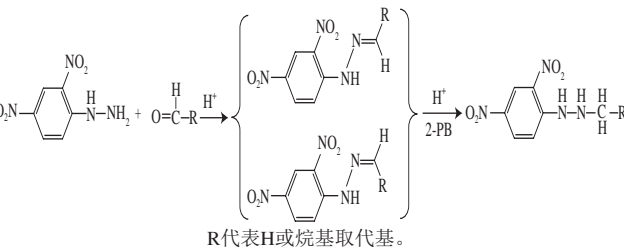
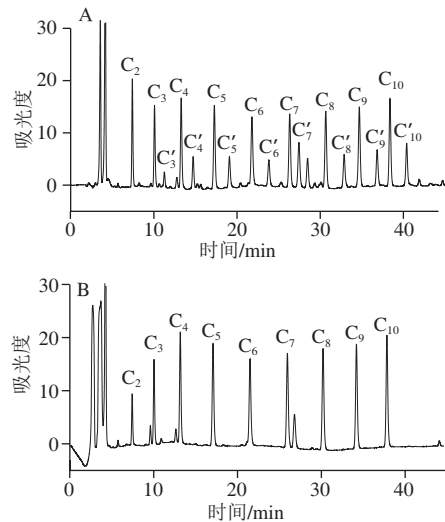


图1 DNPH与脂肪醛的反应及2-PB对DNPH-醛衍生物的还原过程  
Fig. 1 Aliphatic aldehydes derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and reduction of DNPH-aldehydes derivatives with 2-PB



C<sub>2</sub>. 乙酸; C<sub>3</sub>. 丙醛; C<sub>4</sub>. 丁醛; C<sub>5</sub>. 戊醛; C<sub>6</sub>. 己醛; C<sub>7</sub>. 庚醛; C<sub>8</sub>. 辛醛; C<sub>9</sub>. 壬醛; C<sub>10</sub>. 癸醛; C<sub>n</sub>、C<sub>n'</sub>分别代表同一脂肪醛的顺反异构体。

图2 混合醛标准溶液经DNPH衍生化(A)及衍生化后经2-PB还原(B)的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of: A) DNPH-aldehydes derivatives of a standard aldehydes mixture, and B) reductive products of DNPH-aldehydes derivatives using 2-picoline borane as reducing agent

2.2 方法学考察结果

实验过程中发现C<sub>7</sub>~C<sub>10</sub>脂肪醛在食用油和地沟油中含量极低，无益于鉴别地沟油，因此选择C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>脂肪醛作为考察指标，并进行了方法学验证。

2.2.1 线性关系

取2 mmol/L C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>混合醛标准溶液分别配制2.4、5.0、10、20、50、100 μmol/L，与DNPH按1:7物质的量

比混合，按1.3.1.2节下条件进行衍生化反应和还原反应，反应结束后用氮气将溶剂吹干，残留物用65%的乙腈1 mL溶解，0.45 μm微孔滤膜过滤，取20 μL续滤液进样分析，实验结果见表1，表明各脂肪醛浓度与衍生物峰面积的线性关系良好，该方法克服了直接使用2,4-二硝基苯肼作为对照时由于反应产率不同而造成的误差。

表1 线性关系、进样精密度及加样回收率实验结果

Table 1 Linear relationships, precision (RSDs) of injection and spiked recoveries of acetaldehyde, propanal, butanal, pentanal and hexanal

醛类	线性方程	r	进样精密度/%	检测限/ng	加样回收率/%
乙醛	y=3.397 7x-7.584 4	0.999 8	3.4	0.176	90.7
丙醛	y=11.473x-45.022	0.999 4	2.7	0.037	98.3
丁醛	y=17.129x-62.451	0.999 4	2.7	0.046	92.0
戊醛	y=17.491x-58.757	0.999 4	2.6	0.055	84.2
己醛	y=15.787x-45.59	0.999 7	2.4	0.064	81.1

2.2.2 检测限

取线性关系中2.4 μmol/L混合醛标准溶液衍生化反应后的溶液，按信噪比3:1测定各脂肪醛的检测限，结果见表1。其中乙醛的检测限显著高于其他醛，可能是由于乙醛沸点较低，配制溶液过程中易挥发，导致其浓度下降所致。

2.2.3 进样精密度

取20 μmol/L标准混合醛衍生反应液还原后，按上述色谱条件连续进样6针，结果见表1，表明进样精密度良好。

2.2.4 重复性

取200 μL食用油样品，共平行5份，按1.3.2.2节方法制备样品，分别进样分析。由于食用油中主要含乙醛<sup>[22-23]</sup>，本实验以乙醛含量为指标，测得食用油中乙醛含量为53.0 μmol/L，相对标准偏差为3.0%。

2.2.5 加样回收率

取200 μL食用油样品，精密加入2 mmol/L混合醛标准溶液40 μL，按样品衍生化方法处理，测定，计算加样回收率，结果见表1，各脂肪醛的加样回收率在81.1%~98.3%之间。

2.3 供试样品测定结果

还原后的样品溶液呈浑浊状态，为便于测定，先将样品离心分层，再用乙腈萃取3次后，用氮吹法挥干乙腈，残留物用65%乙腈500 μL溶解，0.45 μm微孔滤膜过滤，取续滤液进样，食用油、粗制地沟油和精制地沟油平行操作，色谱图见图3，结果见表2。

油脂中的脂肪醛主要来自多不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应，因此食用油在制备、贮存过程中也会进行缓慢的脂质过氧化反应，产生少量的脂肪醛。而地沟油经过高温加热、碱洗、脱色等处理，可能产生更多的脂肪醛。本实验采用DNPH衍生化、2-PB还原结合HPLC法对食用油、自制的粗制地沟油和精制地沟油中的脂肪醛含量进行了测定。结果显示，食用油仅含有少量C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>脂肪醛，粗制地沟油中乙醛含量明显增加，而C<sub>3</sub>~C<sub>6</sub>脂肪醛含量变化不显著。精制地沟油经过碱化、活性炭吸附

等步骤,使得乙醛含量有所降低,但所含的短链脂肪醛的种类反而增多,而且与食用油相比,精制地沟油中乙醛含量显著高于食用油(表2)。此外,粗制地沟油和精制地沟油色谱图中保留时间5.7 min的色谱峰(图3B、C)显著高于食用油,根据保留时间判断可能为甲醛。选用37%甲醛溶液进行衍生化实验,确认该色谱峰为甲醛衍生物,但因无准确浓度的甲醛对照品,本实验未对其进行定量分析。与食用油相比,精制地沟油色谱图中保留时间为8.2 min和10.6 min处的色谱峰明显增加,可能为不饱和脂肪醛类或酮类衍生物(图3A、C)。因此精制地沟油中显著增加的甲醛、乙醛和其他不饱和醛的检测与定量可作为鉴别地沟油的指标。

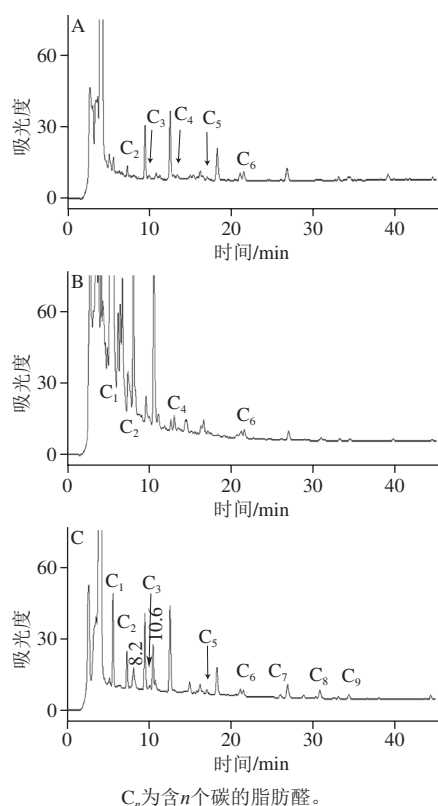


图3 食用油(A)、粗制地沟油(B)和精制地沟油(C)的色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatography of edible oil (A), crude waste cooking oil (B), and refined waste cooking oil (C) after derivatization with DNPH and reduction with 2-PB

表2 食用油、粗制地沟油、精制地沟油测定结果(n=3)  
Table 2 Results for determination of aliphatic aldehydes in edible oil, crude waste cooking oil and refined waste cooking oil (n=3)

	μmol/L		
醛类	食用油	粗制地沟油	精制地沟油
乙醛	40.3	210.5	122.7
丙醛	13.1	17.5	13.8
丁醛	12.8	21.0	10.5
戊醛	13.5	12.6	15.1
己醛	20.9	20.4	16.0

注:用峰面积计算出1 mL反应液中的浓度后将此浓度换算成200 μL油样中的浓度。

### 3 结论

本研究中采用DNPH作为醛的衍生化试剂,以2-PB为还原剂,可以有效改善因生成异构体而导致的定量不准确的问题,取食用油样品直接进行衍生化、还原,乙腈萃取后直接进样分析,使检测流程更加简捷、快速。本方法还可以避免因反应产率造成的结果偏低的问题。实验结果表明,通过HPLC法测定脂肪醛类物质,来检测食用油中是否掺入了地沟油的方法是可行的,并且准确度好、灵敏度很高,可以为地沟油的检测提供参考。

### 参考文献:

- [1] 邹君,姜雪,梁丹丹,等.地沟油的危害及合理利用[J].吉林医药学院学报,2015,36(4):296-299. DOI:10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2015.04.026.
- [2] 李臣,周洪星,石骏,等.地沟油的特点及其危害[J].试验研究,2010(6):69-70. DOI:10.3969/j.issn.1671-9646-C.2010.06.045.
- [3] 马遇涵.科技为先,法制为道,化害为利,变废为宝:对废弃油脂处理方式的思考[J].中国资源综合利用,2000(12):20-24. DOI:10.3969/j.issn.1674-0912.2001.02.003.
- [4] 陈媛,陈智斌,张立伟.食用油脂安全性及对人体健康的影响[J].西部粮油科技,2001,26(2):42-45. DOI:10.3969/j.issn.1007-6395.2001.02.016.
- [5] 焦云鹏.地沟油鉴别和检测的研究进展[J].现代食品科技,2008,24(4):378-380. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2008.04.014.
- [6] 崔晓举,蒋世云,张夏辉,等.地沟油检测技术研究进展[J].化学分析计量,2013,22(2):100-104. DOI:10.3969/j.issn.1008-6145.2013.02.029.
- [7] 张蕊,祖丽亚,樊铁,等.测定胆固醇含量鉴别地沟油的研究[J].中国油脂,2006,31(5):65-67. DOI:10.3321/j.issn.1003-7969.2006.05.019.
- [8] 胡小泓,刘志金,郑雪玉,等.应用电导率检测泔水油方法的研究[J].食品科学,2007,28(11):482-484. DOI:10.3321/j.issn.1002-6630.2007.11.114.
- [9] 朱锐,王督,杨小京,等.电导率测定在鉴别食用植物油掺伪应用研究[J].粮食与油脂,2008(11):42-43. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2008.11.014.
- [10] 伊平河,王桂华,赵铃,等.GC-MS法食用油和餐饮业中废弃油脂的研究[J].分析试验室,2004,23(4):8-11. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2004.0082.
- [11] 全常春,伊平河,赵铃,等.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. DOI:10.3321/j.issn.1002-6630.2004.04.030.
- [12] 毛新武,贾熙,胡国媛,等.泔水油等废弃食用油脂检测指标的建立研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(2):258-260. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2007.02.027.
- [13] 刘波,杨建国,张雪梅.地沟油鉴别检测指标的研究进展[J].职业与健康,2011,27(10):1167-1169. DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2011.10.035.
- [14] 黄道平,彭进,谢燕湘,等.泔水油鉴别检测方法研究[J].中国卫生检验杂志,2006,16(2):151-153. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2006.02.008.
- [15] 李琛.地沟油检测技术研究现状[J].化工技术与开发,2012(12):46-49. DOI:10.3969/j.issn.1671-9905.2012.12.015.



- [16] 曹文明, 薛斌, 杨波涛, 等. 地沟油检测技术的发展与研究[J]. 粮食科技与经济, 2011(1): 41-44. DOI:10.3969/j.issn.1007-1458.2011.01.014.
- [17] 李小凤, 王超, 汪勇, 等. 固相微萃取-气相色谱-质谱法对比分析湘菜类地沟油与市售植物油中的挥发性成分[J]. 现代食品科技, 2015, 31(3): 242-248. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.040.
- [18] FRITZ K S, PETERSEN D R. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes[J]. Free Radical Biology and Medicine 2013, 59: 85-91. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025.
- [19] KAWAI Y, TAKEDA S, TERAOKA J. Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chemical Research Toxicology, 2007, 20: 99-107. DOI:10.1021/tx060199e.
- [20] ZHANG J B, LI M J, LI W L, et al. A novel capillary electrophoretic method for determining aliphatic aldehydes in food samples using 2-thiobarbituric acid derivatization[J]. Electrophoresis, 2011, 32: 705-711. DOI:10.1002/elps.201000533.
- [21] 邓鹏, 王守经, 王文亮. 食用油氧化机理及检测方法研究[J]. 中国食物与营养, 2008(8): 17-19. DOI:10.3969/j.issn.1006-9577.2008.08.005.
- [22] 董树清, 王利涛, 张霞, 等. 高效液相色谱法测定地沟油中脂肪醛类物质[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 313-316. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.11.016.
- [23] 董树清, 杨孟铭, 王利涛, 等. 高效液相色谱法测定油脂中的脂肪醛[J]. 分析实验室, 2013, 32(11): 67-71. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2013.0301.
- [24] UCHIYAMA S, INABA Y, MATAUMOTO M, et al. Reductive amination of aldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazones using 2-picoline borane and high-performance liquid chromatographic analysis[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81: 485-489. DOI:10.1021/ac802163y.
- [25] UCHIYAMA S, INABA Y, KUNUGITA N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879: 1282-1289. DOI:10.1016/j.jchromb.2010.09.028.