



论文

基于¹H NMR 指纹图谱结合多变量分析的 地沟油检测方法

蔡波太^①, 袁龙飞^①, 周影^①, 许秀丽^③, 杨总^①, 刘庆菊^①, 黄金成^①, 仲维科^{③*},
王二强^①, 何裕建^{①②*}

① 中国科学院大学化学与化学工程学院, 北京 100049

② 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

③ 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123

*通讯作者, E-mail: zhongweike@caiqtest.com; heyujian@gucas.ac.cn

收稿日期: 2012-08-30; 接受日期: 2012-09-10; 网络版发表日期: 2012-11-18

doi: 10.1360/032011-427

摘要 地沟油事件是中国近期发生的严重食品安全事故, 而针对地沟油的检测目前尚无非常有效的方法报道. 本研究对 60 种市售植物油和地沟油样品分别进行了核磁 H 谱测定, 建立了 12 个鉴别指标, 采用聚类分析技术对样品进行聚类分析, 并将样品分为 8 大类, 建立了判别函数. 将未知样品的 ¹H NMR 数据代入判别函数, 可检测和判别未知油的来源和品质. 将该方法应用于两次盲测共 69 个样品, 结果显示, 两次盲测的正确率分别为 91.9% 和 93.8%, 可作为食用油品质检测的重要参考.

关键词
地沟油
¹H NMR
指纹图谱
聚类分析
判别分析

1 引言

地沟油是指餐饮业的废弃油脂、废弃的动物脂肪、反复使用的油脂以及其他的废弃油经提炼后形成的油脂. 地沟油的一般加工程序为: 水、渣、油混合物经粗滤得到粗毛油, 然后经加热除味和白土脱色得到毛油, 最后再经低压除臭等步骤得到精炼地沟油.

经过几道提炼后, 精炼地沟油在色泽和气味上都和正常食用油没有明显差别. 社会上一些不法分子受暴利驱动, 将这些油回流到食用油市场. 但是由于地沟油有可能接触了多种病菌、有毒化学试剂等, 并且回收地沟油经过多次使用、煎炸、加热等过程, 使其不饱和度降低、产生高聚物等变化, 长期食用会给人们的健康带来极大的危害. 近期, 中国警方全环节破获多起特大制售地沟油案件. 然而, 对地沟油的

治理不仅要从行政上入手, 检测技术的进步也极其重要. 目前对地沟油的检测大多使用液相色谱、质谱、气相色谱质谱、气液色谱等技术, 检测的指标包括油脂的胆固醇含量、聚合物含量、维生素 A 和维生素 E 的含量等, 但是这些指标在地沟油检测过程中的特异性较差.

van Rutha 等^[1]采用气相色谱技术, 通过检测油脂中三酰甘油、脂肪酸、可挥发性成分的含量及种类, 结合主成分分析法、偏最小二乘法数据处理技术, 对动物脂肪、鱼油和回收食用油进行分类鉴定. Goren 等^[2]用气相色谱技术分析了山茶叶中主要的油类组成. Taamalli 等^[3]采用液相色谱技术, 通过测定油品中酚的含量, 并且通过数据处理对来自不同地区的橄榄油进行鉴别. 这些方法因存在复杂的样品预处理、标准样品测定等环节而非常耗时.

近年来核磁技术,特别是 ^1H NMR谱,具有对样品破坏小、速度快、灵敏度高、一次 ^1H NMR谱中可以测定大范围样品信息等优点,正得到广泛的应用^[4-8].

本研究发展了一种方便、快速、有效地鉴别地沟油的方法.鉴别方法主要基于 ^1H NMR谱,结合多变量分析软件,对油品进行分析,并将该方法应用于两次盲测,来评价其正确率和重复性.

2 实验部分

2.1 样品采集

60种食用油和地沟油用来建立 ^1H NMR谱库.食用油主要来自市售产品,地沟油主要来自公安部门查处的地沟油.表1给出了样品的详细信息.

表1 样品名称及编号

编号	名称	编号	名称
1	古法小榨花生油(胡姬花,京客隆甜水园店)	31	一级大豆油(五湖,华联超市公益西桥店)
2	山东济南格林生物(成品油罐,包装1)	32	大豆油(元宝,京客隆甜水园店)
3	核桃油-1(滋采,京客隆甜水园店)	33	黄金产地玉米油(福临门,京客隆甜水园店)
4	82号地沟油(麻涌公安分局,包装1)	34	玉米油(古船,京客隆甜水园店)
5	83号地沟油(包装1)与核桃油1:1勾兑	35	植物甾醇玉米油(金龙鱼,京客隆甜水园店)
6	83号地沟油(麻涌公安分局,包装1)	36	玉米油(金龙鱼,京客隆甜水园店)
7	82号地沟油(包装1)与核桃油1:1勾兑	37	鲜胚玉米胚芽油(西王,乐天超市公益西桥店)
8	食用调和油(绿宝,京客隆甜水园店)	38	玉米胚芽油(西王,京客隆甜水园店)
9	地沟油(江西1号)	39	特级初榨橄榄油(科瑞欧)
10	地沟油(重庆康舜)	40	特级初榨橄榄油(多力)
11	调和油(绿宝,京客隆甜水园店)	41	特级初榨橄榄油(多力优选)
12	山东济南格林生物(成品油罐,包装2)	42	特级初榨橄榄油(鲁花)
13	82号地沟油(麻涌公安分局,包装2)	43	特级初榨橄榄油(奥丽贝娅)
14	83号地沟油(麻涌公安分局,包装2)	44	山东济南格林生物(成品油罐,包装3)
15	古法小榨花生油(胡姬花,京客隆公益西桥店)	45	82号地沟油(麻涌公安分局,包装3)
16	金莲一级大豆油	46	83号地沟油(麻涌公安分局,包装3)
17	黄金产地玉米油(福临门,京客隆甜水园店)	47	古法小榨花生油(胡姬花,京客隆甜水园店)
18	松籽食用油(红松宝)	48	山东济南格林生物(成品油罐,包装4)
19	花生调和油(福临门)	49	核桃油-2(滋采,京客隆公益西桥店)
20	天然谷物调和油(福临门)	50	82号地沟油(麻涌公安分局,包装4)
21	压榨一级花生油(福临门)	51	83号地沟油(包装4)与核桃油1:1勾兑
22	5s压榨一级花生油(鲁花,京客隆甜水园店)	52	83号地沟油(麻涌公安分局,包装4)
23	压榨一级花生油(汇福,京客隆甜水园店)	53	82号地沟油(包装4)与核桃油1:1勾兑
24	古法小榨花生油(胡姬花,京客隆公益西桥店)	54	食用调和油(绿宝,京客隆甜水园店)
25	特香型花生油(胡姬花,京客隆甜水园店)	55	调和油(金龙鱼)
26	压榨浓香型花生油(淳金,京客隆甜水园店)	56	食用植物调和油(福临门)
27	花生油(绿宝,京客隆甜水园店)	57	天然谷物调和油(福临门)
28	醇香花生油(花生花,京客隆甜水园店)	58	核桃油-3(滋采,超市发玉泉路店)
29	一级大豆油(福临门,京客隆甜水园店)	59	核桃油-4(多慧,京客隆甜水园店)
30	大豆油(福临门,京客隆甜水园店)	60	核桃油-5(多慧,京客隆公益西桥店)

2.2 样品准备和 NMR 谱测定

取1 mL样品溶于约4 mL氘代三氯甲烷(CDCl_3)中,调整其质量比为1:7.漩涡震荡5 s混匀后,取0.6 mL装入NMR管中,温度平衡5 min至室温后进行测量.实验在Bruker Avance III核磁共振仪上进行,质子共振频率为600 MHz.

^1H NMR谱测定参数设置:时域为32 K,脉冲为90,时间为11 μs ,谱宽为10 ppm,恢复时间为2 s,信号检测时间为2.73 s,每次自由感应衰减扫描次数为32,虚拟扫描次数为4.化学位移以ppm为单位,以四甲基硅烷(TMS, $\delta = 0$)为内标.

2.3 核磁数据处理

NMR图谱数据处理在Bruker TopSpin 2.1软件上操作.在 ^1H NMR图谱中,以总的峰面积为单位1,

对各类质子的积分值进行归一化处理, 即将各 ^1H NMR 峰面积除以总 ^1H NMR 峰面积, 得到各峰的相对值, 导出各类质子的相对含量, 为下一步的数据处理做准备.

2.4 聚类分析和判别分析

数据处理在 SPSS 18.0 软件上操作, 先建立 12 个变量, 然后将经过归一化处理的 ^1H NMR 数据输入, 进行聚类分析. 聚类分析所采用的算法为临近算法, 因为经过与软件所包含的其他几种方法的对比, 临近算法所得到的分类图正确率接近 100%.

通过聚类分析可以将已知样品分为若干类, 将各类进行命名后建立判别函数, 将未知油的 ^1H NMR 数据代入判别函数来对其进行判别分析. 本研究一共使用了 6 种函数来进行判别分析, 其中同时输入变量的方法包含 1 种, 使用的参数设置如下: 统计量输出选择“Means”复选项, 可输出各类自变量均值和标准偏差; 判别函数系数采用 Fisher 系数; 自变量系数矩阵选择“Within-groups”复选项, 即在计算相关矩阵之前, 根据每类协方差均值来计算; 先验概率选择各类先验概率相等; 使用组内协方差矩阵进行分类. 步进式方法包含 5 种, 即 wilk's lambda, unexplained variance, mahalanobis distance, smallest F ratio 和 Rao's V. 步进式方法的 F 值均采用进入值为 3, 删除

值为 1. 其他设置同, 同时输入变量方法.

3 结果与讨论

3.1 食用油主成分分析及 ^1H NMR 谱图解析

对食用油的 ^1H NMR 谱图解析已经有多篇文献进行了报道^[8-16], 尽管这些文献给出了详细的解析结果, 但是这些结果大多是用在橄榄油分类、二酰甘油的含量计算等方面, 对地沟油 ^1H NMR 谱图解析还没有涉及. 本研究在以上工作的基础上, 针对地沟油的 ^1H NMR 特征谱图进行解析, 以达到地沟油鉴别的目的.

食用油的化学本质是甘油三酯, 即以甘油为骨架, 通过酯键连接三分子脂肪酸. 其主要营养价值在于脂肪酸的种类和不饱和度. 如果油脂在制作和使用过程中造成化学键断裂, 不饱和度降低, 并产生聚合物, 则预示着油脂质量的下降.

首先, 我们列出了经高温、氧化等条件造成酯键断裂和双键加成时而可能形成的各种结构式, 然后结合经验公式计算各结构式中 H 的化学位移, 将所得结果带入 ^1H NMR 谱图对各类 H 进行指认(图 1). 同时, 在二维 ^1H - ^1H 全相关谱解析的基础上, 确认出 ^1H NMR 谱中化学位移对应的结构^[5], 结果见表 2.

在化学位移 $\delta = 0.94$ 处为亚麻酸 C18 上的甲基

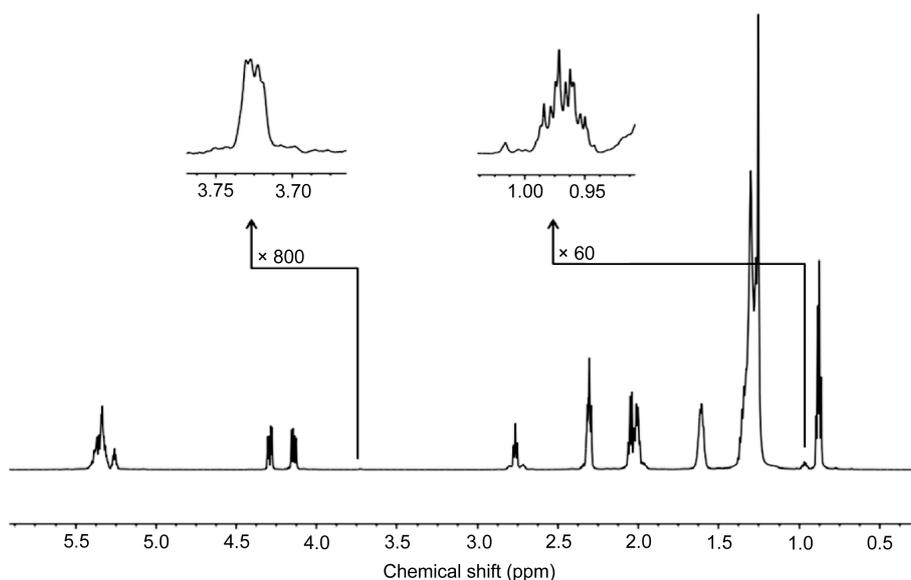


图 1 初炼地沟油(山东格林罐装成品地沟油)的 ^1H NMR 谱图

表2 ^1H NMR 谱各化学位移下对应的质子

指标	化学位移(δ , ppm)	氢归属	化学环境
1	~ 0.88	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	饱和脂肪酸、油酸、亚油酸末端甲基氢
2	~ 0.94	$-\text{CH}_2\text{CH}_2$	亚麻酸末端甲基氢
3	~ 1.30	$-(\text{CH}_2)_n-$	多个 CH_2 累积, 四类脂肪酸在该处均有吸收
4	~ 1.60	$-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2-$	酯键后第二个碳上的氢, 四类脂肪酸在该处均有吸收
5	~ 2.05	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	油酸、亚油酸、亚麻酸该处均有吸收峰
6	~ 2.30	$-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2-$	甘油三酯、甘油二酯该处均有吸收峰
7	~ 2.75	$-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	亚油酸和亚麻酸在该处均有吸收
8	~ 3.72	$-\text{CH}_2\text{OCO}$	1, 2-二酰甘油
9	~ 4.13	$-\text{CH}_2\text{OCO}$	1, 3-二酰甘油
10	~ 4.29	1,3- CH_2OCO	三酰甘油
11	~ 5.26	2- CHOCO	甘油三酯碳骨架中间碳
12	~ 5.34	$-\text{CH}=\text{CH}-$	双键氢

氢. 由于亚麻酸中在 C9、C12、C15 处存在双键, 因此亚麻酸的末端甲基氢化学位移高于亚油酸、油酸和饱和脂肪链末端的甲基氢的化学位移, 从而使 $\delta = 0.94$ 处归属为亚麻酸的特征峰. 有的油中不含有亚麻酸, 则在此处无信号. 一般来说, 地沟油由于是混合油, 因而在该处有峰, 但是含量会低于调和油和大豆油; 同时花生油中亚麻酸含量低, 在该处几乎无 H 谱峰出现, 因此该处 H 含量成为鉴别各类油的一个重要指标(指标 2). $\delta = 1.30$ 处为多个 CH_2 累积时, CH_2 上 H 的化学位移. 由于地沟油中双键含量少, 因此 CH_2 累积量高, 即该处 H 含量要高, 成为鉴别地沟油的一个指标(指标 3). $\delta = 2.05$ 处为与单个双键共轭的碳上的 H 化学位移, 由于地沟油中双键含量低于天然油, 因此该处 H 含量成为鉴别地沟油的一个重要指标(指标 5). $\delta = 2.30$ 处为形成酯键后碳上 H 的化学位移, 该处 H 的含量指示的是酯键的含量. 由于地沟油中酯键被破坏得较多, 因此该处 H 的含量低于天然油的含量, 成为鉴别地沟油的指标之一(指标 6). $\delta = 2.75$ 处为与两个双键共轭的碳上 H 的化学位移, 该处地沟油的 H 含量要低于天然油, 为鉴别地沟油的一个指标(指标 7). $\delta = 3.72$ 处为 1, 2-二酰甘油第一个酯键碳上的 H 的化学位移, 由于地沟油在使用和炼制过程中, 往往会造成酯键的断裂, 因此 1, 2-二酰甘油含量多于天然油, 也就是该处 H 含量多于天然油, 成为鉴别精炼地沟油的重要指标(指标 8). $\delta = 4.29$ 处为甘油三酯碳骨架上第一和第三个碳上 H 的化学位移, 由于地沟油中完整的甘油三酯的含量低于天然油, 因此该处 H 含量为鉴别精炼地沟油的另一个重要指标(指标 10). 在 $\delta = 5.25 \sim 5.37$ 处为双键氢与甘油三酯碳骨架上中间碳上的氢化学位移重合区, 两类氢在 600 MHz 核磁仪下可以得到很好区分, 其中 δ

$= 5.26$ 处为甘油三酯骨架上中间碳上的酯键断裂, 只连有一个羟基时, 碳上的 H 的化学位移. 由于地沟油在使用和炼制过程中会造成该处酯键的断裂, 因此该处 H 的含量要高于天然油的. 从而该碳上的 H 含量成为鉴别地沟油的另一个重要指标(指标 11). $\delta = 5.34$ 为双键碳上 H 的化学位移, 地沟油在该处 H 的含量要低于天然油, 因此该处成为鉴别精炼地沟油的又一个指标. 其他处($\delta = 0.88$, $\delta = 1.60$, $\delta = 4.13$, 指标 1, 4, 9)H 的含量虽在鉴别地沟油方面特异性不强, 但可用于鉴别不同种类的油.

3.2 基于 ^1H NMR 谱图的油品聚类分析

通过对各类油的 ^1H NMR 测定, 可以得到各类油中各化学位移下 H 的积分值, 将各积分值进行归一化处理可以得到各化学位移下 H 的相对含量.

本研究中将这 12 个指标作为变量输入到分析系统, 采用临近算法进行聚类分析. 聚类分析结果以树状图给出(图 2).

聚类分析一共可以得到 8 种分类, 按照样品列表信息, 这 8 种分类完全正确. 但是其中第 IV 类为大豆油或精炼地沟油类, 这意味着大豆油和精炼地沟油的各个指标都很接近, 采用聚类分析也不能将其完全分开. 此时需要人工进行进一步区分, 实验发现, 在 $\delta = 3.72$ 处的 1, 2-二酰甘油指标在两者之间存在差异. 样品库中 7 种大豆油在 $\delta = 3.72$ 处 H 的平均相对含量为 0.012%, 而 8 种精炼地沟油在该处的平均相对含量为 0.0158%. 进行单一样本 T 检验, $p = 0.038$, 存在显著性差异. 分析其原因在于, 地沟油经天然油使用和制作过程中容易使甘油上第三个碳上的酯键断裂而造成 1, 2-二酰甘油含量增加, 因此地沟油在 $\delta = 3.72$ 处 H 的相对含量要高于天然油. 因此在该处

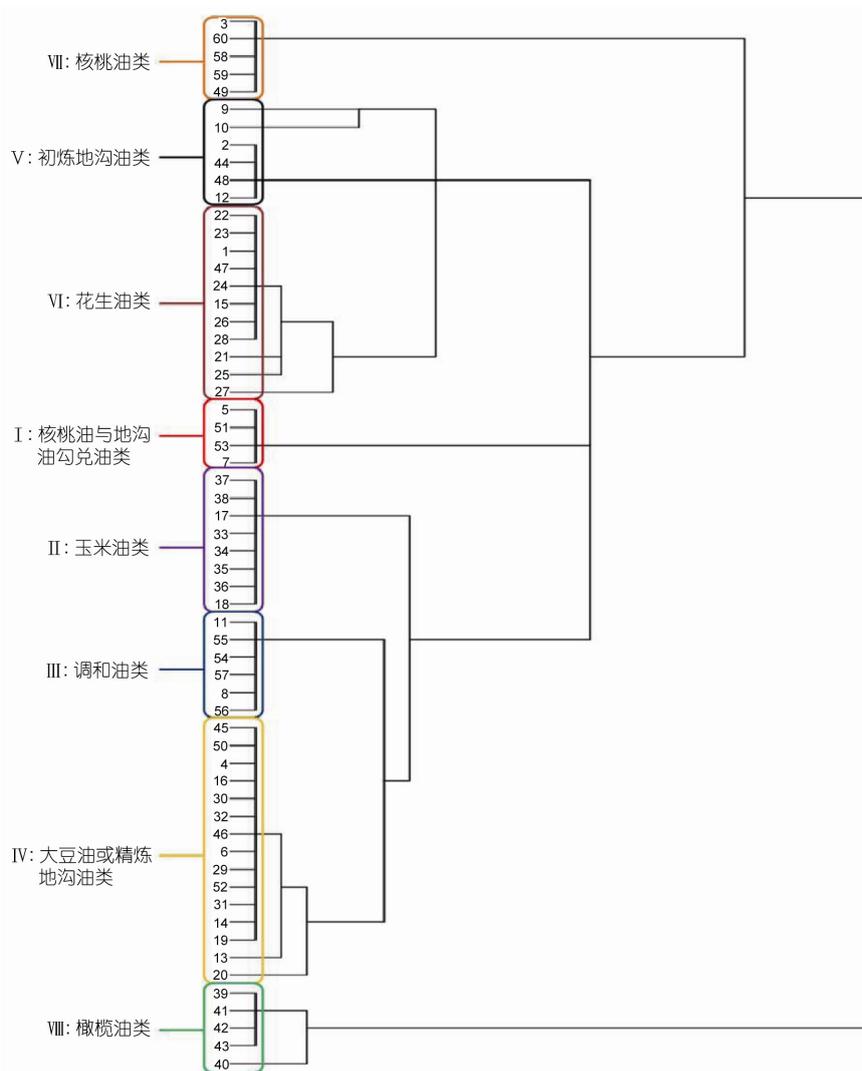


图 2 60 种油聚类分析树状图 (油品编号对应的油名称见表 1)

含量高于 0.0158% 时则倾向于判定其为地沟油, 相反则判定为天然油. 另外, 第五个指标, 即与单个双键共轭的碳上 H 的含量, 在精炼地沟油中的含量(8 种精炼地沟油均小于 10%)始终略低于在大豆油中的含量(7 种大豆油均大于 10%). 进行单一样本 T 检验, $p = 0.048$, 存在显著性差异; 第十个指标, 即甘油三酯中甘油碳骨架的第一、第三个碳上酯键的含量. 精炼地沟油的含量(8 种精炼地沟油均小于 1.97%)始终低于大豆油的含量(7 种大豆油均大于 1.98%). 进行单一样本 T 检验, $p = 0.044$, 存在显著性差异. 这些指标均可作为辨别大豆油和精炼地沟油的特征指标. 大豆油和精炼地沟油 ^1H NMR 谱图比对见图 3.

在各类油中, 初炼地沟油和压榨花生油的区分

也存在一定难度, 因初炼地沟油和压榨花生油中都存在丰富的极性分子, 通过测电导率等常规手段难以实现. 在 ^1H NMR 谱中, 二者在 $\delta = 0.94$ 和 $\delta = 3.72$ 处均有明显差异. $\delta = 0.94$ 处为与三个双键共轭的 H 的化学位移, 由于地沟油为多种油的混合油, 在此处有峰, 而花生油在此处无峰, 从而该处为区别二者的特征峰; 同时二者在 $\delta = 3.72$ 处的 1, 2-二酰甘油含量也存在差别. 通过这两个指标可以将初炼地沟油和压榨花生油得到很好区分, 如图 4 所示.

3.3 未知油品鉴别及盲样测试

首先对未知样进行聚类分析. 由于聚类分析获得了非常好的结果, 将单个未知样品和样品库中的

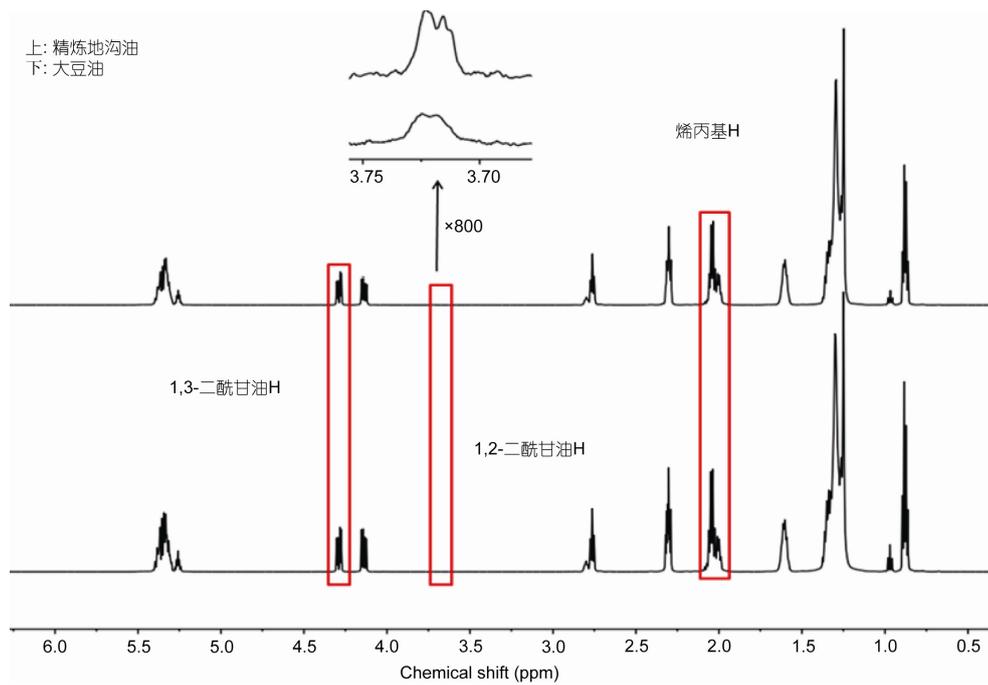


图3 精炼地沟油和大豆油 ^1H NMR 谱图比对

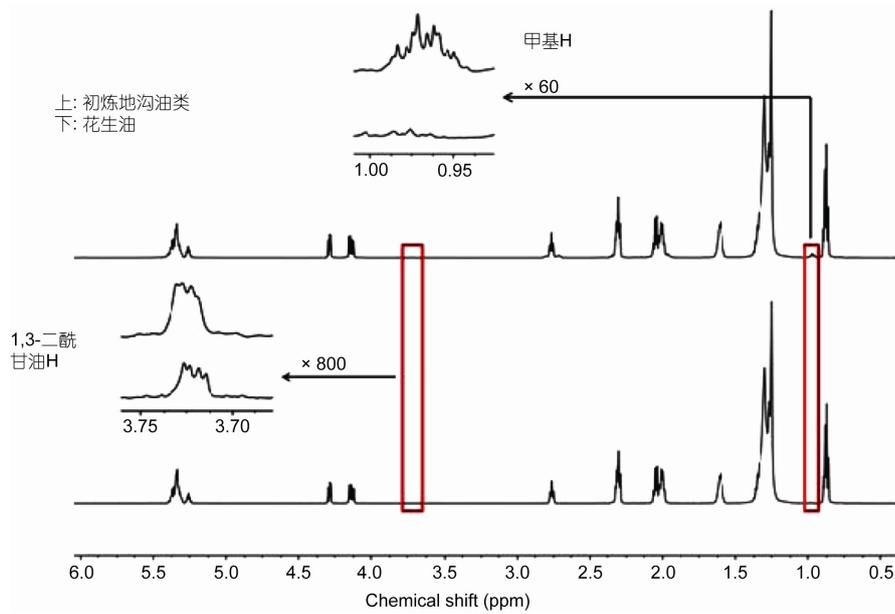


图4 初炼地沟油和花生油 ^1H NMR 谱图比对

油混合后进行聚类分析,可以看出该未知样品属于哪一类. 需要指出的是,如果将大量未知样品和样品库混合后进行聚类分析会破坏样品库的聚类结构,因此该方法只能进行单个或少量未知样品的分析.

接下来对未知样进行判别分析. 采用判别分析

方法建立判别函数,对未知油品进行判别分析(见实验部分),分析系统会将其归纳到聚类分析结果中的某一类,由此来判别未知油品的来源. 本工作通过6个函数来对样品进行判别分析. 不同的函数对样品的判别分析结果有时会不同,如果大多数判定结果

指向某一类油, 则倾向于该判定结果.

最后根据散点图对未知样进行分析. 图 5 为判别分析的散点图, 如果未知油在散点图中介于某两类油之间, 则倾向于认为该未知样品为两类油的勾兑油.

将该方法用于盲样测试来评价方法的正确率和重复性. 盲测样品由中国检验检疫科学研究院提供, 样品由各种植物油、动物油、地沟油等勾兑或保持原样, 两次盲测分别配制了 37 和 32 个未知样品, 由本方法进行检测. 检测结果正确率分别为 91.9% 和 93.8%, 在此只列出了第一次盲测结果, 见表 3.

由表 3 可见, 第 13、20、33 号样品判断错误. 其中第 13 号样品为棕榈油, 纯棕榈油在常温下呈乳白

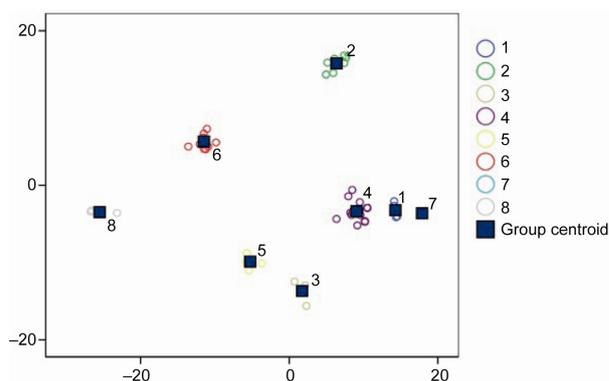


图 5 判别分析散点图. 图中为 60 个样品油被分为 8 类, 其中 I 类为 IV 和 VII 类 1:1 混合, 因此介于二者之间

表 3 37 个未知样品判别分析结果

编号	函数 1	函数 2	函数 3	函数 4	函数 5	函数 6	判断	盲样表
1	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为 IV 类大豆油或者精炼地沟油, 由于甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油. (判断正确)	重庆地沟油 1+ 调和油 (10%)
2	III	III	III	III	III	III	函数判断倾向于 III 类调和油, 但甘油二酯含量极高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油. (判断正确)	广州地沟油 2+ 混油 (50%)
3	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为 IV 类, 散点图介于 III 和 IV 类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油与调和油勾兑. (判断正确)	广州地沟油 2+ 混油 (20%)
4	I	IV	IV	I	I	IV	函数判断为 I 或 IV 类, 散点图更接近 IV 类, 由于甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油. (判断正确)	泰鑫地沟油 3+ 调和油 (10%)
5	III	V	V	V	V	V	函数判断为 V 类地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	千门 4+ 混油 (50%)
6	III	V	V	V	V	V	函数判断为 V 类地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	千门 4+ 混油 (20%)
7	V	V	V	V	V	V	函数判断为 V 类地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	千门 4+ 混油 (10%)
8	I	IV	IV	I	I	IV	函数判断为 I 或 IV 类, 散点图介于 I 和 IV 类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 为食用调和油与精炼地沟油勾兑. (判断正确)	泰鑫地沟油 3+ 混油 (50%)
9	III	IV	IV	III	I	IV	函数判断为 IV 类, 散点图介于 III 和 IV 类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 为食用调和油与精炼地沟油勾兑. (判断正确)	重庆地沟油 1+ 混油 (100%)
10	III	V	V	V	V	V	函数判断为 V 类地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	重庆混合地沟油 5
11	I	IV	IV	I	I	IV	函数判断为 I 或者 IV 类, 散点图介于 I 和 IV 类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 为食用调和油与精炼地沟油勾兑. (判断正确)	辽宁食用地沟油 10
12	I	II	II	II	II	II	函数判断为 II 类玉米油, 但是甘油二酯含量极高, 聚类分析时库中无匹配油类, 与亚麻酸共轭的甲基含量低, 酯键含量低, 综合各项指标判断为地沟油. (判断正确)	新疆地沟油 11
13	V	V	V	V	V	V	函数判断为 V 类地沟油, 聚类分析时无匹配油类, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量、总酯键含量、双键含量低, 综合各项指标判断为地沟油. (判断错误)	KFC 纯棕榈油
14	V	V	V	V	V	V	函数判断为 V 类地沟油, 聚类分析时无匹配油类, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量、总酯键含量、双键含量低, 综合各项指标判断为地沟油. (判断正确)	KFC 棕榈油一滤
15	I	IV	IV	IV	I	IV	函数判断为 IV 类, 散点图介于 I 和 IV 类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 为食用调和油与精炼地沟油勾兑. (判断正确)	泰鑫地沟油 3+ 混油 (10%)

(续表 3)

编号	函数 1	函数 2	函数 3	函数 4	函数 5	函数 6	判断	盲样表
16	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	重庆地沟油 1+混油(50%)
17	III	VI	VI	V	V	VI	函数判断倾向于VI类花生油, 聚类分析为花生油, 判断为花生油. (判断正确)	花生油
18	I	IV	IV	VII	VII	IV	函数判断为IV类, 聚类分析为大豆油类, 甘油二酯含量较低, 双键含量高, 甘油碳骨架中间碳上酯键H含量高, 判断为大豆油. (判断正确)	大豆油
19	I	IV	IV	I	I	IV	函数判断为I或IV类, 各项指标均良好, 甘油二酯含量低, 双键含量高, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量高, 聚类分析为调和油, 判断其为调和油. (判断正确)	调和油
20	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为IV类, 散点图介于II和IV类之间, 更接近IV类, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为玉米油与调和油勾兑. (判断错误)	玉米油+大豆油+花生油+调和油
21	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	深圳宝安混合地沟油 6
22	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	深圳博罗混合地沟油 7
23	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	广州混合地沟油 8
24	II	II	II	II	II	II	函数判断为II类玉米油类, 散点图落在II类, 聚类分析为玉米油, 判断其为玉米油. (判断正确)	玉米油+调和油
25	I	IV	IV	V	I	IV	函数判断倾向于IV类调和油类, 聚类分析为调和油, 甘油二酯含量较低, 双键含量高, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量高, 判断其为调和油. (判断正确)	花生油+调和油
26	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 判断为地沟油. (判断正确)	KFC 棕榈油一滤炸
27	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为IV类, 由于甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断其为精炼地沟油. (判断正确)	吉林长春大豆地沟油 9
28	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 地沟油. (判断正确)	深圳宝安混合地沟油 6(第一次)
29	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类地沟油类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 地沟油. (判断正确)	KFC 棕榈油二滤
30	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为IV类, 甘油二酯含量较高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断其为精炼地沟油. (判断正确)	深圳博罗混合地沟油 7(第一次)
31	II	II	II	II	II	II	函数判断为II类, 散点图落在II类, 聚类分析为玉米油, 判断其为玉米油. (判断正确)	玉米油
32	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为IV类, 散点图介于I和IV类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 为食用调和油与精炼地沟油勾兑. (判断正确)	泰鑫地沟油 3+ 调和油 (20%)
33	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 地沟油. (判断错误)	混油: 调和油+花生油+大豆油
34	III	IV	IV	III	I	IV	函数判断为IV类, 散点图介于III与IV类之间; 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油与调和油勾兑. (判断正确)	重庆地沟油 1+ 调和油 (50%)
35	V	V	V	V	V	V	函数判断为V类, 散点图落在地沟油类, 双键和不饱和键含量低, 甘油二酯含量高, 地沟油. (判断正确)	广州地沟油 2+混油(10%)
36	IV	IV	IV	IV	IV	IV	函数判断为IV类, 散点图介于III与IV类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油与调和油勾兑. (判断正确)	泰鑫地沟油 3+ 调和油 (50%)
37	I	IV	IV	III	I	IV	函数判断为IV类, 散点图介于III与IV类之间, 甘油二酯含量高, 双键含量低, 甘油碳骨架中间碳上酯键含量低, 判断为精炼地沟油与调和油勾兑. (判断正确)	重庆地沟油 1+ 调和油 (20%)

色半固体状态. 由于样品库中没有棕榈油, 因此 13 号样品判别分析时被划为地沟油类; 同时棕榈油 ¹H NMR 各项指标均比其他液态油要差, 因此人工判断时造成了假阳性判断. 第 20 和 33 号样品为花生油、大豆油、调和油、玉米油等多种油的混合油, 多种油混合后会使得各项指标混淆, 特征性不明显; 同时在人工判别时, 更多地依赖于主要特异性指标, 忽略了次要特异性指标, 造成判断错误. 针对以上判断错误出现的原因, 可通过以下两点来进行改进: (1) 扩大核磁样品库容量, 将棕榈油等油类也纳入其中, 这样在判别分析时方可直接识别未知油; (2) 对于多种油混合的油, 应在考虑主要特异性指标的同时, 综合考虑次要特异性指标, 同时开发出更多的鉴别指标来进行识别, 提高判别能力.

4 结论

通过建立各类油的¹H NMR 谱数据库, 结合多变量数据统计方法来对未知油品进行鉴别. 本方法一共开发出 12 个鉴别指标, 将该方法用于两次盲测以检测方法的正确率和重复性. 分别对第一轮 37 个未知油和第二轮的 32 个未知油进行了盲样鉴别, 两次正确率分别达到了 91.9% 和 93.8%. 结果准确率高、重复性好, 并且该方法无需对样品进行复杂的前处理操作, 因而快捷而不产生污染. 而且, 该方法可以通过扩大数据库的容量来不断提高鉴别的准确度和扩大使用范围. 当然, 该方法也需要通过进一步的努力, 来开发出更多的用于鉴别正常食用油和地沟油的特异性指标.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20877099, 20972183, 21272263)、北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室开放基金(K20120201)、中国科学院计算地球动力学重点实验室开放基金课题(006)、中国科学院研究生院课题基金(O8JT011J01)、国家十二五计划支撑项目(2012BAI37B03)的资助, 特此一并致谢.

参考文献

- van Ruth SM, Rozijn M, Koot A, Garcia RP, van der Kamp H, Codony R. Authentication of feeding fats: Classification of animal fats, fish oils and recycled cooking oils. *Anim Feed Sci Tech*, 2010, 155: 65–73
- Goren AC, Piozzi F, Akcicek E, Kilic T, Carikci S, Mozioglu E, Setzer WN. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem Lett*, 2011, 4: 448–453
- Taamalli A, Roman DA, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Classification of ‘Chemlali’ accessions according to the geographical area using chemometric methods of phenolic profiles analysed by HPLC-ESI-TOF-MS. *Food Chem*, 2012, 132: 561–566
- Shaw AD, di Camillo A, Vlahov G, Jones A, Bianchi G, Rowland J, Kell DB. Discrimination of the variety and region of origin of extra virgin olive oils using ¹³C NMR and multivariate calibration with variable reduction. *Anal Chim Acta*, 1997, 348: 357–374
- Guillen MD, Ruiz A. High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends Food Sci Tech*, 2001, 12: 328–338
- Fauhl C, Reniero F, Guillou C. ¹H NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin. *Magn Reson Chem*, 2000, 38: 436–443
- Kumar R, Bansal V, Tiwari AK, Sharma M, Puri SK, Patel MB, Sarpal AS. Estimation of glycerides and free fatty acid in oils extracted from various seeds from the indian region by NMR spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88: 1675–1685
- Sacchi R, Addeo F, Paolillo L. ¹H and ¹³C NMR of virgin oil: An overview. *Magn Reson Chem*, 1997, 35: S133–S145
- Vlahov G. Application of NMR to the study of olive oils. *Progr Nucl Magn Reson Spectrosc*, 1999, 35: 341–357
- Hatzakis E, Agiomyrgianaki A, Kostidis S, Dais P. High-resolution NMR spectroscopy: An alternative fast tool for qualitative and quantitative analysis of diacylglycerol (DAG) oil. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88: 1695–1708
- Knothe G, Kenar JA. Determination of the fatty acid profile by ¹H NMR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2004, 106: 88–96
- Longobardi F, Ventrella A, Napoli C, Humpfer E, Schutz B, Schafer H, Kontominas MG, Sacco A. Classification of olive oils according to geographical origin by using ¹H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chem*, 2012, 130: 177–183
- Sacchi R, Patumi M, Fontanazza G, Barone P, Fiordiponti P, Mannina L, Rossi E, Segre A. A high field ¹H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73: 747–758
- Guillén MD, Ruiz A. ¹H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures.

Eur J Lipid Sci Technol, 2003, 105: 502–507

- 15 Vigli G, Philippidis A, Spyros A, Dais P. Classification of edible oils by employing ^{31}P and ^1H NMR Spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for detection of seed oils adulteration in virgin olive oils. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 5715–5722
- 16 Knothe G, Kenar JA. Determination of the fatty acid profile by ^1H -NMR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2004, 106: 88–96

Identification of illegal cooking oils by using ^1H NMR fingerprints combined with multivariate analysis

CAI BoTai¹, YUAN LongFei¹, ZHOU Ying¹, XU XiuLi³, YANG Zong¹, LIU QingJu¹, HUANG JinCheng¹, ZHONG WeiKe^{3*}, WANG ErQiang¹, HE YuJian^{1,2*}

1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

2 State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China

3 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China

*Corresponding authors (email: zhongweike@caiqtest.com; heyujian@gucas.ac.cn)

Abstract: Illegal cooking oil incident is a serious food safety problem happened in China recently. There are still no efficient methods for illegal cooking oil identification. In this paper, 60 kinds of oils were detected by ^1H NMR, and 12 identification indicators were found. Based on those 12 fingerprintings, 60 kinds of oils could be divided into 8 categories by using cluster analysis. According to the 8 categories, discriminant function was established. When the unknown sample's ^1H NMR data were put into those functions, the discriminant analysis of the unknown samples could be done to identify the origin of the unknown oil samples. This method was applied twice in blind tests, and the results showed that the correct rate of the two blind tests were 91.9% and 93.8% respectively.

Keywords: illegal cooking oil, ^1H NMR, fingerprints, cluster analysis, discriminant analysis