

## تشخیص تقلب روغن حیوانی افزوده شده به روغن گیاهی با استفاده از میزان استرولها: مطالعه موردی روغن زیتون حاوی لارد

مریم کاشی<sup>۱</sup>، زهرا طالب پور<sup>۲\*</sup>، بهروز جنت<sup>۴</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشکده فیزیک و شیمی، دانشگاه الزهراء<sup>(س)</sup>، تهران، ایران
  - ۲- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده فیزیک و شیمی، دانشگاه الزهراء<sup>(س)</sup>، تهران، ایران
  - ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات آنالیز و بیوآنالیز، دانشگاه الزهراء<sup>(س)</sup>، تهران، ایران
- \* نویسنده مسئول (ztalebpour@alzahra.ac.ir)
- ۴- دانشیار، مرکز ملی تحقیقات حلال، سازمان غذا و دارو، تهران، ایران

### چکیده

در این پژوهش، نوع و میزان استرولهای موجود در روغنهای گیاهی (زیتون، کانولا، ذرت، کنجد و آفتابگردان) و چربی خوک (لارد) با روش استخراج مایع-مایع و آنالیز با کروماتوگرافی گازی-طیفسنجی جرمی بررسی شد. همچنین استرولهای موجود با مقایسه طیف جرمی ثبت شده با کتابخانه دستگاه، شناسایی شدند. به منظور اندازه گیری کمی استرولها، منحنی درجه بندی با ضریبهای رگرسیون بزرگتر از ۰/۹۹ به دست آمد. حد تشخیص روش پیشنهادی برای سه ترکیب بتا-سیتوسترول، کمپسترول و کلسترول به ترتیب ۰/۴۸، ۲/۳۸ و ۰/۴۴ میلی گرم بر لیتر بود. صحت و دقت روش با محاسبه بازیابی و انحراف استاندارد نسبی در یک روز و بین روز محاسبه شد. نتایج بازیابی ۱۰۹-۹۵ درصد و انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۹ درصد را نشان دادند. همچنین مشخص شد مقدار کلسترول لارد بیش از ۵ برابر روغنهای دیگر است. در ادامه، مخلوطهایی از یک نوع روغن گیاهی (روغن زیتون فرابکر) و لارد تهیه و با روش پیشنهادی آنالیز شدند. ارتباط غلظت کلسترول بر حسب درصد لارد اضافه شده با ضریب همبستگی بزرگتر از ۰/۹۹، خطی به دست آمد و با استفاده از روش پیشنهادی، تشخیص ۱ درصد لارد در روغن زیتون با خطای کمتر از ۳ درصد امکان پذیر بود. از نتایج این روش می توان برای تشخیص تقلب در سایر روغنهای گیاهی (فاقد کلسترول) با چربیهای حاوی کلسترول نیز استفاده کرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۲

### واژه های کلیدی

بتا سیتوسترول  
تقلب در روغن زیتون  
کلسترول  
کمپسترول  
لارد

### مقدمه

Almeida, Baggio, Mariutti, & Bragagnolo, 2020) یا حتی با برخی چربیهای حیوانی (He, Wan, Wang, & Jiao, 2014; Rohman, Che Man, Hashim, & Ismail, 2015; Xu et al., 2011) و یا پسماند روغنهای پخت و پز (Zhao et al., 2015) مشکل مهمی در بازار فروش روغنها، ایجاد کرده است. مصرف روغنهای تقلبی نه تنها می تواند سلامت افراد را به خطر اندازد بلکه

در سالهای اخیر، به دلیل کاهش هزینه های تولید محصولات غذایی گران قیمت و کسب سود و منفعت اقتصادی بیشتر از تجارت مواد غذایی، تقلب در روغنهای گیاهی با ارزش و مخلوط کردن آنها با روغنهای گیاهی ارزان تر (Al-Ismail, Alsaed, Ahmad, & Al-Dabbas, 2010; Al-Kahtani, Abou Arab, & Asif, 2014;

2019) معرفی شده‌اند. همچنین با بررسی پروفایل تری‌گلیسرول با کروماتوگرافی مایع با کارایی فوق بالا و دتکتور آیرسول باردار<sup>۹</sup> (UHPLC-CAD)، نسبت دو تری‌گلیسرول تری‌لینولئین و تری‌اولئین، به‌عنوان نشان‌گر وجود روغن‌های گیاهی دیگر در روغن‌زیتون فرابکر معرفی شده است (Green et al., 2020).

از آنجا که مقدار اسیدهای چرب و تری‌گلیسریدها در روغن‌ها و چربی‌ها به شرایط محیطی رشد گیاه روغنی و تغذیه حیوانات بستگی دارند، نمی‌توان آنها را به‌عنوان یک نشان‌گر مناسب در نظر گرفت (Al-Kahtani et al., 2014). همچنین شباهت ترکیب درصد اسیدهای چرب در روغن‌ها، تشخیص تقلب به کمک بررسی پروفایل غلظتی اسیدهای چرب را مشکل می‌کند (Cercaci, Rodriguez- Estrada, & Lercker, 2003). در مقابل استرول‌ها که جزء مواد غیرصابونی‌شونده و بخش جزئی روغن‌ها محسوب می‌شوند، به شرایط محیطی ذکرشده بستگی جدی‌ای ندارند و به‌عنوان نشان‌گر، برای آنالیز و تشخیص تقلب در روغن‌ها مناسب هستند. بتا-سیتوسترول<sup>۱۰</sup> و کمپسترول<sup>۱۱</sup> فراوان‌ترین استرول موجود در روغن‌های گیاهی هستند (Almeida et al., 2020). از سوی دیگر کلسترول نوعی استرول حیوانی است که فقط در مواد غذایی با منشأ حیوانی (گوشت، تخم‌مرغ، چربی‌های حیوانی و غیره) دیده می‌شود (Hajjar, Rizk, Akoka, & Bejjani, 2019). این در حالی است که این ترکیب در برخی روغن‌های گیاهی به مقدار بسیار کم وجود دارد (Thomas, 2012). بنابراین به نظر می‌آید، می‌تواند نشان‌گر مناسبی برای حضور چربی حیوانی در روغن‌های گیاهی باشد.

روش‌های استاندارد که برای آنالیز استرول‌ها در روغن‌ها، مورد استفاده قرار می‌گیرد روش کدکس (Codex Alimentarius, 1999)، ایزو (ISO, 1999) و روش آیوپک (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1992) هستند (Laakso, 2005). روش استاندارد استخراج استرول‌ها شامل صابونی‌کردن با پتاسیم هیدروکسید الکلی، جداکردن استرول‌ها و حذف مزاحمت‌ها با کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۱۲</sup> (TLC)، مشتق‌سازی با واکنش‌گر و آنالیز با کروماتوگرافی گازی با

منجر به نقض قوانین حمایت از حقوق مصرف‌کننده نیز می‌شود (Zhao et al., 2015). مخلوط کردن روغن‌های گیاهی با روغن‌های دیگر می‌تواند برخی خصوصیات فیزیکی و ترکیب درصد اجزای مختلف روغن را تغییر دهد. بنابراین اصالت‌سنجی روغن‌ها با تعیین ترکیب درصد اجزای موجود در آنها، امکان‌پذیر است (Su et al., 2019).

بیشتر روش‌هایی که برای اصالت‌سنجی، تشخیص تقلب و کنترل کیفیت در روغن‌ها مورد استفاده قرار گرفته بر مبنای روش‌های کروماتوگرافی هستند (Esteki et al., 2017; Hong et al., 2018) و اساس آنها دنبال کردن پروفایل غلظتی برخی ترکیبات موجود در این روغن‌ها بر اساس روش‌های کمومتریکس و پیدا کردن یک نشان‌گر<sup>۱</sup> جهت تشخیص نوع خاصی از تقلب است (Danezis, 2016; Tsagkaris, Camin, Brusica, & Georgiou, 2016). نشان‌گرهای موجود در روغن را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد. گروه اول از میان ترکیبات عمده موجود در روغن‌ها (ترکیبات صابونی‌شونده) مانند تری‌گلیسریدها یا اسیدهای چرب انتخاب می‌شوند و دسته دوم، نشان‌گرهایی از بین ترکیبات جزئی (غیرصابونی‌شونده) مانند استرول‌ها، رنگدانه‌ها، ترکیبات فنولی و اسکوالن<sup>۲</sup> هستند (Ergönül, 2019; Kenar et al., 2019; Lioupi, Nenadis, & Theodoridis, 2020; Yan, Oey, van Leeuwen, & van Ruth, 2018). به‌طور مثال با بررسی پروفایل اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی<sup>۳</sup> (GC-MS)، متیل استئرات<sup>۴</sup>، متیل پالمیتات<sup>۵</sup>، متیل مریستات<sup>۶</sup> و متیل اولئات<sup>۷</sup> به‌عنوان نشان‌گر برای تشخیص وجود لارد در روغن‌زیتون فرابکر (Heidari et al., 2020)، با استفاده از روش رزونانس مغناطیسی هسته<sup>۸</sup>، لینولئیک اسید و اروسیک اسید به‌عنوان نشان‌گر تشخیص وجود روغن‌سویا در روغن‌کنجد (McDowell, Defernez, Kemsley, Elliott, & Koidis, 2019) و با استفاده از کروماتوگرافی گازی، لینولنیک اسید و اروسیک اسید به‌عنوان نشان‌گر وجود روغن‌گلزا در روغن بادام‌زمینی (Tian, Zeng, Zheng, Chiu, & Liu, 2019).

<sup>1</sup> Marker

<sup>2</sup> Squalene

<sup>3</sup> Gas Chromatography-Mass Spectrometry

<sup>4</sup> Methyl Stearate

<sup>5</sup> Methyl Palmitate

<sup>6</sup> Methyl Myristate

<sup>7</sup> Methyl Oleate

<sup>8</sup> Nuclear Magnetic Resonance

<sup>9</sup> Ultra High Performance Liquid Chromatography-Charged Aerosol Detector

<sup>10</sup>  $\beta$ -Sitosterol

<sup>11</sup> Campesterol

<sup>12</sup> Thin Layer Chromatography

تصفیه شده، زیتون پوماس<sup>۵</sup>، ذرت، کانولا، آفتاب گردان و کنجد) و لارد پس از صابونی کردن و استخراج با روش استخراج مایع-مایع<sup>۶</sup> (LLE)، با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله ای و جرمی شناسایی و اندازه گیری شدند. ارزیابی روش پیشنهادی با تعیین محدوده خطی، حد تشخیص و صحت و دقت بین روز و درون روز صورت گرفت. نتایج نشان دادند براساس نوع و مقدار استرول های هر نمونه روغن و نسبت آنها، تشخیص حضور لارد در روغن های گیاهی امکان پذیر است. به منظور بررسی صحت تشخیص تقلب در روغن زیتون فرابکر با لارد از طریق ردیابی میزان کلسترول، مخلوط هایی از این دو روغن تهیه و پروفایل استرول های آنها بررسی شد. خطای کمتر از ۳ درصد، انتخاب کلسترول را به عنوان یک نشانگر مناسب، تأیید کرد.

## مواد و روش

### مواد شیمیایی و حلال ها

استاندارد بتا-سیتوسترول، کمپسترول و کلسترول از شرکت سیگما (Darmstadt، ساخت آلمان) و استاندارد روغن زیتون و لارد از شرکت سوپلکو (Bellefonte، ساخت پنسیلوانیا) خریداری شدند. پتاسیم هیدروکسید، اتانول ۹۶ درصد، هگزان و متانول با درجه خلوص HPLC از شرکت مرک (Darmstadt، ساخت آلمان) خریداری شدند. محلول های استاندارد با غلظت ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم بر لیتر استرول ها در هگزان با درجه خلوص HPLC تهیه و در فریزر نگهداری شدند. این محلول های استاندارد به مدت ۲ ماه پایدار بودند.

### نمونه های حقیقی روغن

در این پژوهش روغن زیتون فرابکر (EVOO<sup>۷</sup>)، زیتون بکر (VOO<sup>۸</sup>)، زیتون پوماس (POO)، زیتون تصفیه شده (PUO<sup>۹</sup>)، ذرت (CO<sup>۱۰</sup>)، کانولا (CaO<sup>۱۱</sup>)، آفتاب گردان

دکتور یونش شعله ای<sup>۱</sup> (FID) و طیف سنج جرمی (MS) است (ISO, 1999; Laakso, 2005). تهیه مشتق استرول ها نه تنها باعث فراربت بهتر این ترکیبات می شود، بلکه محصول مشتق شده، پایداری گرمایی بیشتری نیز پیدا می کند. واکنش گری که به طور معمول برای مشتق سازی استرول ها به کار می رود، بیس تری متیل سیلیل تری فلئوئورو استامید<sup>۲</sup> (BSTFA) با ۱ درصد تری متیل کلروسیلان<sup>۳</sup> (TMCS) است (Gorassini, Verardo, & Bortolomeazzi, 2019) که استرول ها را به مشتق تری متیل سیلان<sup>۴</sup> تبدیل می کند. استفاده از واکنش گر مشتق ساز ذکر شده، معیایی از قبیل ایجاد محصولات جانبی اضافی، ایجاد آلودگی برای دکتور بخصوص FID و صرف وقت و هزینه بالا و پیچیدگی روش را به همراه دارد (Dinh et al., 2011). واکنش گر مشتق ساز دیگری که مورد استفاده قرار می گیرد، پتاسیم هیدروکسید الکلی است که ترکیبات را به مشتق متیل استر تبدیل می کند. استفاده از این واکنش گر مشتق ساز ساده تر و ارزان تر است و تکرار پذیری بهتری دارد.

در میان انواع روغن های گیاهی، روغن زیتون فرابکر به دلیل خواص منحصربه فرد و طعم مطلوب از جمله روغن های گران قیمت پرمصرفی است که بسیار مورد تقلب قرار می گیرد (Filoda et al., 2019; Li et al., 2020; Yan, Erasmus, Toro, Huang, & van Ruth, 2020) و یکی از موارد تقلب، مخلوط شدن روغن زیتون فرابکر با چربی ارزان قیمت خوک (لارد) است. از آنجاکه در برخی مذاهب از جمله دین اسلام، مصرف هرگونه مواد غذایی حاوی چربی خوک ممنوع است، تشخیص تقلب لارد موجود در روغن زیتون فرابکر از این رو نیز بسیار حائز اهمیت خواهد بود (Fadzillah et al., 2017).

در این پژوهش روش آنالیز ساده و در دسترس برای تشخیص چربی حیوانی (لارد) موجود در روغن زیتون فرابکر معرفی شده است. از مزایای این روش حذف مرحله کروماتوگرافی لایه نازک و مشتق سازی با مخلوط واکنش گرهای BSTFA و 1% TMCS قبل از آنالیز است. برای نیل به این هدف، استرول های موجود در تعدادی از روغن های گیاهی (زیتون فرابکر، زیتون بکر، زیتون

<sup>5</sup> Pomace Olive Oil

<sup>6</sup> Liquid-Liquid Extraction

<sup>7</sup> Extra Virgin Olive Oil

<sup>8</sup> Virgin Olive Oil

<sup>9</sup> Purified Olive Oil

<sup>10</sup> Corn Oil

<sup>11</sup> Canola Oil

<sup>1</sup> Flame Ionization Detector

<sup>2</sup> Bis (trimethylsilyl) acetamide

<sup>3</sup> Trimethylchlorosilane

<sup>4</sup> Trimethylsilane

در این دما ماند. زمان کل آنالیز در این برنامه دمایی ۳۰ دقیقه است.

**مراحل استخراج استرول‌ها از نمونه‌های روغن و چربی**  
به منظور استخراج استرول‌ها از تمامی روغن و چربی‌های مورد آزمایش، ابتدا به ۵۰ میلی گرم روغن، ۵/۵ میلی لیتر پتاسیم هیدروکسید اتانولی ۲ مولار افزوده شد. سپس ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در حال هم‌خوردن قرار داده شد تا صابونی شود. پس از گذشت زمان کوتاهی برای خنک‌شدن محلول، به آن ۳ میلی لیتر هگزان و ۳ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. برای کمک به تسریع فرایند استخراج، مخلوط ۱ دقیقه ورتکس گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتی‌فیوژ با دور ۳۰۰۰ g قرار گرفت و پس از جدایی دو فاز، لایه فوقانی (مواد حل شده در هگزان) برای مرحله بعدی نگهداری شد. مرحله استخراج با هگزان دو بار دیگر انجام گردید. در ادامه هر سه لایه فوقانی با هم مخلوط و با نیتروژن تا خشک حلال‌پرانی شد. سپس، ۱ میلی لیتر هگزان به ظرف اضافه شد، ۲ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ g سانتی‌فیوژ گردید. در پایان لایه فوقانی جمع‌آوری شده و ۱ میکرولیتر از آن به دستگاه GC و GC-MS تزریق شد.

#### اعتبارسنجی روش

جهت ارزیابی روش، منحنی‌های درجه‌بندی برای بتا-سیتوسترول، کمپسترول و کلسترول به‌طور جداگانه رسم شدند و معادله خط، دامنه دینامیکی خطی<sup>۴</sup> و ضریب همبستگی<sup>۵</sup> آن با استفاده از روش حداقل مربعات به‌دست آمد. از آزمون آنالیز واریانس برای بررسی کیفیت مدل و اطمینان از عدم وجود نقص مدل<sup>۶</sup> در آنها استفاده شد. همچنین جهت بررسی اینکه در منحنی درجه‌بندی هیچ خطای سیستماتیک قابل توجهی وجود ندارد، منحنی‌های باقی‌مانده رسم شد. حد تشخیص (LOD<sup>۷</sup>) و حد کمی روش (LOQ<sup>۸</sup>) با در نظر گرفتن شیب منحنی درجه‌بندی (b) و انحراف استاندارد<sup>۹</sup> پاسخ محلول شاهد (S<sub>p</sub>) (۸) تکرار) براساس رابطه‌های (۱) و (۲) به‌دست آمدند.

(SFO<sup>۱</sup>) و کنجد (SeO<sup>۲</sup>) از سطح بازار خریداری شد. نمونه‌های روغن‌های گیاهی در بطری‌های تیره و به دور از حرارت نگهداری شدند. یک نمونه چربی لارد (L) از سوپر مارکت‌های خارج از کشور خریداری و در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و قبل از مصرف، در یک بشر روی هیتر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به آرامی ذوب شد تا آماده مصرف شود. به منظور تأیید روش پیشنهادی برای تشخیص حضور چربی لارد در روغن‌زیتون فرابرکر، ۴ نسبت وزنی/وزنی از لارد (۱، ۶، ۲۴ و ۷۰ درصد) در روغن‌زیتون فرابرکر، تهیه شد.

#### دستگاهوری

در این پژوهش از یک سیستم کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent, CA, Santa Clara, N 6890، ساخت آمریکا) به همراه گاز حامل هلیوم و آشکارساز جرمی مدل ۵۹۷۳ با آنالیزور جرمی چهارقطبی با ولتاژ ۷۰ الکترون‌ولت و نرم‌افزار Chem Station برای جمع‌آوری اطلاعات ثبت‌شده استفاده شد. ستون موئین HP-5MS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر (Agilent, CA, Santa Clara، ساخت آمریکا) در طول آزمایش‌ها استفاده شد.

همچنین از سیستم کروماتوگرافی گازی دیگری با آشکارساز یونش شعله‌ای (مدل Young-Lin، ۶۵۰۰۰، Anyang-si، ساخت کره) همراه با گاز حامل نیتروژن و نرم‌افزار YL CLARITY برای جمع‌آوری اطلاعات ثبت‌شده، استفاده شد. ستون موئین به‌کاربرده شده در این دستگاه، TRB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۵۳ میلی‌متر و ضخامت فیلم فاز ساکن ۱ میکرومتر بود. به منظور جداسازی استرول‌ها، ۱ میکرولیتر از نمونه آماده‌شده با برنامه دمایی بهینه زیر و در حالت بدون تقسیم<sup>۳</sup> به دستگاه‌های GC و GC-MS تزریق شد:

دمای ابتدایی ستون ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد بود که ۵ دقیقه در این دما باقی ماند و سپس با گرادیان حرارتی ۲۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید. در ادامه با گرادیان حرارتی ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسیده و ۱۰ دقیقه

<sup>4</sup> Linear Dynamic Range

<sup>5</sup> Correlation Coefficient

<sup>6</sup> Lack of Fit

<sup>7</sup> Limit of Detection

<sup>8</sup> Limit of Quantitation

<sup>9</sup> Standard deviation

<sup>1</sup> Sunflower Oil

<sup>2</sup> Sesame Oil

<sup>3</sup> Splitless mode

رابطه (۱)

$$\text{حد تشخیص} = \frac{3 \text{ Sb}}{b}$$

رابطه (۲)

$$\text{حد کمی روش} = \frac{10 \text{ Sb}}{b}$$

لیگنان‌هاست، به مقدار نسبتاً زیاد در روغن کنگد دیده شده و ویتامین E نیز در بیشتر روغن‌های گیاهی وجود دارد اما در لارد دیده نشده است.

ترکیبات استرولی از قبیل کمپسترول، استیگماسترول<sup>۴</sup>، بتا-سیتوسترول و فوکوسترول<sup>۵</sup> در روغن‌های گیاهی دیده شدند که در این میان، کمپسترول و بتا-سیتوسترول از فراوان‌ترین استرول‌ها در این نمونه‌ها بودند. همچنین کلسترول به مقدار بسیار بیشتر در چربی لارد دیده شد. نتایج به‌طور مفصل در بخش‌های بعد آورده شده است.

### اعتبارسنجی روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری استرول‌ها

به‌منظور ارزیابی روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری استرول‌ها در روغن‌های گیاهی و چربی لارد، ۱۲ محلول استاندارد مخلوط بتا-سیتوسترول، کمپسترول و کلسترول در محدوده غلظتی ۱-۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط بهینه ذکر شده در بخش مراحل استخراج استرول‌ها از نمونه‌های روغن و چربی، تهیه و به سیستم GC-FID تزریق شدند. سپس منحنی‌های درجه‌بندی براساس رسم بهترین خط با استفاده از روش حداقل مربعات به‌صورت جداگانه برای هر ترکیب رسم شدند. همان‌طور که نتایج در جدول (۱) نشان می‌دهد ضریب همبستگی برای هر سه استرول بزرگ‌تر از ۰/۹۹ به‌دست آمد. علاوه بر این محدوده دینامیکی خطی برای بتا-سیتوسترول و کلسترول ۱-۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و برای کمپسترول ۳۰-۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دیده شد. حد تشخیص روش نیز به ترتیب برای بتا-سیتوسترول، کمپسترول و کلسترول، ۰/۴۸، ۰/۳۸ و ۰/۴۴ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید. برای بررسی دقت و صحت بین روز و درون روز، مخلوط استاندارد ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر سه استرول در ۱ روز و ۳ روز متوالی با سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. باتوجه به نتایج در جدول (۱) بازایی روش بین ۹۵ تا ۱۰۹ درصد و دقت درون روز و بین روز کمتر از ۹ درصد به‌دست آمد.

دقت درون روز و بین روز روش نیز، با تهیه یک نمونه از مخلوط استاندارد استرول‌ها در سطح غلظتی ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۳ بار آنالیز آن با استفاده از روش پیشنهادی در ۱ و ۳ روز متوالی به‌دست آمد. برای محاسبه صحت روش، سطح زیر پیک هر استرول در نمونه مذکور در منحنی درجه‌بندی مربوطه قرار گرفت و غلظت آن استرول محاسبه شد. سپس درصد بازایی<sup>۱</sup> مربوط به هر استرول با تقسیم غلظت به‌دست‌آمده بر غلظت اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت. دقت روش از محاسبه انحراف استاندارد نسبی (RSD%) این نتایج، حاصل شد.

### نتایج و بحث

#### جداسازی و شناسایی استرول‌ها در نمونه‌های حقیقی

به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در عصاره استخراج شده از روغن‌های مختلف و چربی لارد، ۱ میکرولیتر از محلول استخراج‌شده نهایی هر نمونه حقیقی (که طبق بخش مراحل استخراج استرول‌ها از نمونه‌های روغن و چربی تهیه شد) به دستگاه GC-MS تزریق گردید. با استفاده از کتابخانه دستگاه، برای هر یک از نمونه‌ها تمامی اجزای جدا شده در کروماتوگرام جریان کل یونی (TIC<sup>۲</sup>) با درصد شباهت بالای ۹۰ درصد شناسایی شدند (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). نتایج نشان دادند در تمامی روغن‌های گیاهی مورد بررسی، اسیدهای چرب از C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> با مقدارهای مختلف وجود دارد. به‌عنوان مثال اولئیک اسید در روغن‌زیتون فرابکر و بکر بیشتر از روغن‌های زیتون خالص و پوماس دیده شده است. همچنین لینولئیک اسید بیشتر در روغن آفتاب‌گردان و اسید چرب اشباع مریستیک اسید بیشتر در لارد وجود دارد. برخی از هیدروکربن‌های C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> در نمونه‌های روغن‌های گیاهی و لارد دیده شدند. به‌علاوه اسکوالن به‌طور عمده در روغن‌های گیاهی وجود دارد اما در لارد به مقدار کمتری دیده شده است. سسامین<sup>۳</sup> که یکی از ترکیبات متعلق به

<sup>4</sup> Stigmasterol

<sup>5</sup> Fucosterol

<sup>1</sup> Recovery

<sup>2</sup> Total Ion Current

<sup>3</sup> Sesamin

تعیین مقدار استرول‌ها در روغن‌های گیاهی و چربی لارد به‌منظور تعیین مقدار استرول‌های روغن‌های موردبررسی، هر ۹ نمونه (سه بار) با روش پیشنهادی LLE آماده و تزریق شدند و غلظت هر استرول در نمونه‌های حقیقی با استفاده از منحنی‌های درجه‌بندی مربوطه به‌دست آمد. در جدول (۲)، غلظت استرول‌های محاسبه‌شده در نمونه‌ها آورده شده است. همان‌طورکه از داده‌ها مشخص است تمامی روغن‌های گیاهی موردبررسی، دارای دو ترکیب بتا-سیتوسترول و کمپسترول هستند. با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس<sup>۱</sup> معین گردید که میزان بتا-سیتوسترول و کمپسترول در روغن‌های گیاهی تفاوت معنی‌داری با هم دارند. علاوه‌بر این نسبت کمپسترول به بتا-سیتوسترول در این روغن‌ها با هم متفاوت است. در روغن کانولا این نسبت بیشترین مقدار و در روغن‌زیتون با کیفیت‌های مختلف این نسبت زیر ۱ است. در میان روغن‌های زیتون، بیشترین مقدار این نسبت در روغن‌زیتون فرابکر دیده‌شده و نتایج نشان داد هرچه زیتون بیشتر فراوری شود یا روغن از تفاله تهیه شود این نسبت کاهش پیدا کرده است. از طرف دیگر در روغن‌های گیاهی آفتاب‌گردان و کنجد در حد تشخیص روش، کلاسترول دیده‌نشده ولی در دیگر روغن‌های گیاهی، مقادیر کم کلاسترول دیده‌شده که زیتون پوماس در این بین بیشترین میزان کلاسترول را دارد. در برخی منابع نیز وجود مقادیر کم کلاسترول در روغن‌های ذرت، کانولا و زیتون گزارش شده است که مقدار آنها با مقدار کلاسترول به‌دست‌آمده در این پژوهش مطابقت دارند ( Thomas, 2012). در مقابل در چربی لارد هیچ‌یک از ترکیبات بتا-سیتوسترول و کمپسترول وجود نداشته ولی میزان کلاسترول آن بسیار بالاتر از کلاسترول روغن‌های گیاهی (دست‌کم بیش از ۵ برابر) است. این نتایج نشان می‌دهند چنانچه روغن‌های گیاهی مانند روغن‌زیتون فرابکر با چربی حیوانی حاوی کلاسترول بالا مانند لارد مخلوط شود، می‌توان از میزان کلاسترول موجود در نمونه تقلب در روغن گیاهی را موردبررسی قرار داد. از سوی دیگر می‌توان گفت در صورتی‌که روغن‌های گیاهی دیگر نیز با روغن‌زیتون فرابکر مخلوط شود از افزایش نسبت میزان کمپسترول به بتا-سیتوسترول در نمونه روغن‌زیتون فرابکر، می‌توان به ناخالص بودن آن پی‌برد.

جدول ۱- نتایج منحنی کالیبراسیون و ارزیابی دقت و صحت روش پیشنهادی برای اندازه‌گیری استرول‌ها در روغن‌های گیاهی و چربی لارد

استرول	معادله خطی	R <sup>2</sup>	محدوده خطی (میلی‌گرم بر لیتر)	LOD (میلی‌گرم بر لیتر)	غلظت مخلوط		میانگین SD±	RSD (درصد)	میانگین SD±	RSD (درصد)	بازیابی (درصد)	بازیابی (درصد)
					استرول‌ها در نمونه	کنترلی (میلی‌گرم بر لیتر)						
سیتوسترول	$y = 377.01(\pm 1.5446)x - 741.06(\pm 73/9198)$	۰/۹۹۷۹	۱-۳۰۰۰	۰/۴۸	۱۴۰۰	۱۴۹۳±۱۰۹	۷	۱۴۴۳±۴۰	۱۰/۳	۱۰/۷	۱۰/۷	۱۰/۳
کمپسترول	$y = 4268(\pm 109)x - 56493(\pm 181372)$	۰/۹۹۶۲	۳-۳۰۰۰	۲/۳۸	۱۴۰۰	۱۵۲۸±۶۵	۵	۱۵۰۰±۳۱	۱۰/۷	۱۰/۹	۱۰/۹	۱۰/۷
کلاسترول	$y = 43164(\pm 105119)x - 50448(\pm 69479)$	۰/۹۹۸۶	۱-۳۰۰۰	۰/۴۴	۱۴۰۰	۱۴۷۵±۱۲۱	۹	۱۳۲۶±۱۰۳	۹/۵	۱۰/۵	۱۰/۵	۹/۵

X: غلظت استرول در مخلوط استاندارد

Y: سطح زیر پیک استرول

SD: انحراف استاندارد

<sup>1</sup> ANOVA

جدول ۲- غلظت استرول ها در نمونه های حقیقی روغن های گیاهی و لارد

نسبت کلاسترول لارد به کلاسترول روغن های گیاهی	نسبت کمپسترول به بتا-سیتوسترول	کلاسترول (میلی گرم بر لیتر)	کمپسترول (میلی گرم بر لیتر)	بتا-سیتوسترول (میلی گرم بر لیتر)	روغن
-	۰/۹۸±۰/۰۵	ND	۲۲۵±۵	۲۲۹±۱۰	استاندارد روغن زیتون (StOO)
-	ND	۲۶۵±۱۶	ND	ND	استاندارد لارد (SL)
۹/۳۰±۰/۹۰	۰/۹۷±۰/۰۳	۲۶±۱	۲۵۲±۱	۲۵۸±۷	روغن زیتون فراپکر (EVOO)
۱۲/۶۰±۰/۲۰	۰/۸۹±۰/۰۳	۱۹±۱	۲۸۵±۵	۳۲۰±۱۱	روغن زیتون بکر (VOO)
۹/۸۰±۰/۹۰	۰/۷۵±۰/۰۴	۲۵±۱	۲۲۵±۱۱	۲۹۸±۱۲	روغن زیتون تصفیه شده (PUO)
۵/۶۰±۰/۶۰	۰/۶۵±۰/۰۴	۴۳±۴	۳۷۹±۱۱	۵۷۹±۲۸	روغن زیتون پوماس (POO)
۸/۴۰±۰/۷۰	۵/۴۲±۰/۰۴	۲۹±<۱	۴۲۷۵±۱۶	۷۸۵±۶	روغن کانولا (CaO)
۱۴/۲۰±۰/۲۰	۳/۰۲±۰/۰۷	۱۷±۳	۲۸۳۴±۵۲	۹۳۷±۱۳	روغن ذرت (CO)
ND	۳/۶۵±۰/۱۷	ND	۶۴۹±۱۰	۱۷۸±۸	روغن کنجد (SeO)
ND	۲/۱۳±۰/۲۲	ND	۷۶۹±۶۳	۳۶۰±۲۴	روغن آفتاب گردان (SFO)
ND	ND	۲۴۲±۲۲	ND	ND	لارد (L)

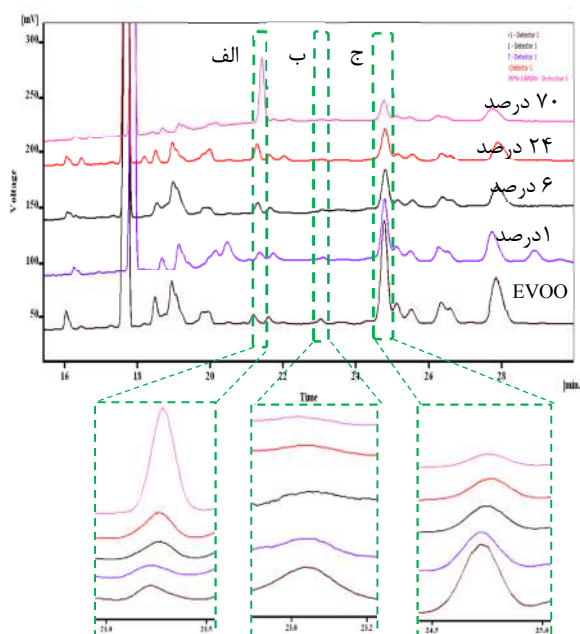
ND: مشاهده نشده

داده ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد است.

درصد مقدار  $p$  برابر با  $۰/۰۰۱۱۳۳$  به دست آمد. بنابراین تفاوت معنی دار بین مقدار کلاسترول در روغن زیتون خالص و روغن زیتون آلوده به ۱ درصد لارد وجود دارد و می توان این مقدار ناخالصی لارد را در روغن زیتون فراپکر با روش پیشنهادی تشخیص داد.

### اندازه گیری میزان ناخالصی لارد در روغن زیتون فراپکر با روش پیشنهادی

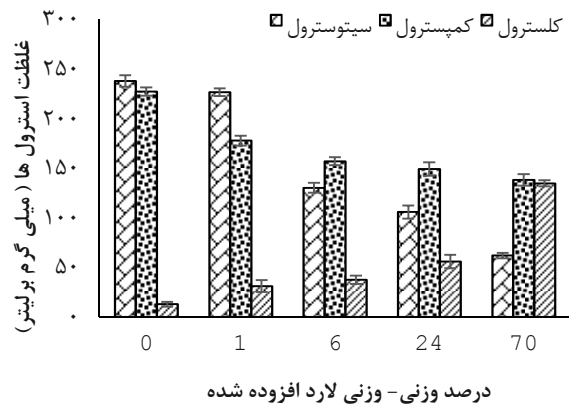
به منظور بررسی امکان تشخیص لارد در روغن زیتون فراپکر براساس ردیابی غلظت استرول ها با روش پیشنهادی، نمونه روغن زیتون آلوده به لارد در ۴ درصد وزنی-وزنی مختلف (۱، ۶، ۲۴ و ۷۰ درصد) تهیه شد و با روش پیشنهادی، استخراج گردید و به GC-FID تزریق شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و پس از ثبت کروماتوگرام ها و به دست آوردن سطح زیر پیک استرول ها، غلظت هریک براساس منحنی کالیبراسیون مربوطه محاسبه شد. کروماتوگرام روغن زیتون فراپکر آلوده به لارد در شکل (۱) و تغییرات غلظت بتا-سیتوسترول، کمپسترول و کلاسترول در روغن زیتون فراپکر برحسب درصد لارد افزوده شده، در شکل (۲) آورده شده است. همان طور که انتظار می رفت با افزایش درصد لارد، سطح زیر پیک بتا-سیتوسترول و کمپسترول کاهش و سطح زیر پیک کلاسترول افزایش می یابد. به منظور مقایسه مقدار کلاسترول در نمونه خالص روغن زیتون فراپکر و نمونه آلوده شده با کمترین مقدار لارد (۱ درصد وزنی-وزنی)، ابتدا با آزمون آماری  $F$ ، تفاوت واریانس غلظت کلاسترول به دست آمده در دو نمونه در سطح اطمینان ۹۵ درصد و سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی داری بین واریانس ها وجود نداشت. سپس با آزمون  $t$  مربوطه و در سطح اطمینان ۹۵



شکل ۱- کروماتوگرام روغن زیتون فراپکر (EVOO) و روغن آلوده به لارد با درصدهای وزنی-وزنی ۱، ۶، ۲۴ و ۷۰، تزریق شده به GC-FID در شرایط بهینه، الف) کلاسترول، ب) کمپسترول و ج) بتا-سیتوسترول

۲ و ۶۰ درصد وزنی-وزنی تهیه شدند و پس از آنالیز با روش پیشنهادی و تعیین غلظت کلسترول در آنها، میزان ناخالصی لارد با استفاده از معادله خط، به دست آمد. در نهایت در هر سطح مورد آزمایش (۲ و ۶۰ درصد وزنی-وزنی) درصد بازیابی محاسبه شد که نتایج آن در جدول (۳) آورده شده است. باتوجه به نتایج به دست آمده در جدول (۳) می توان گفت که این روش، حضور لارد در روغن زیتون فرابکر را به خوبی و با خطای کمتر از ۳ درصد نشان می دهد.

در جدول (۴) مقایسه ای از پژوهش حاضر با تعدادی از مقاله های منتشر شده آمده است. همان طور که مشخص است حد تشخیص تقلب لارد در روغن زیتون فرابکر در روش پیشنهادی نسبت به روش های مشابه بهتر است اما با روش GC\*GC-TOF/MS قابل رقابت نیست. این موضوع به دلیل حساسیت و حد تشخیص بهتر تشخیص با دتکتور MS نسبت به FID است. با این حال و باتوجه به پیچیدگی روش GC\*GC-TOF/MS و عدم دردسترس بودن آن در بیشتر آزمایشگاه ها، روش پیشنهادی می تواند روش جایگزین مناسبی باشد.



شکل ۲- تغییرات غلظت استرول ها در روغن زیتون فرابکر (EVOO) آلوده به درصد های وزنی-وزنی مختلف لارد

به منظور پیش بینی میزان ناخالصی لارد در روغن زیتون فرابکر، از رابطه خطی بین درصد وزنی-وزنی ناخالصی و غلظت کلسترول استفاده شد. برای به دست آوردن رابطه خطی هر نمونه سه بار آنالیز شد. معادله خط مذکور و ضریب همبستگی در جدول (۳) آورده شده است. سپس برای توانایی پیش بینی این مدل، دو نمونه روغن زیتون آلوده به لارد با درصد ناخالصی

جدول ۳- مدل خطی پیشنهادی برای پیش بینی درصد وزنی-وزنی ناخالصی لارد در روغن زیتون فرابکر

شیب خط*	عرض از مبدأ	ضریب همبستگی	ناخالصی لارد افزوده شده (درصد وزنی-وزنی)	ناخالصی لارد پیش بینی شده (درصد وزنی-وزنی)	درصد خطای نسبی**
۱۵۷±۹	۲۷±۳	۰/۹۹۳۲	۲	۲/۰۶±۰/۱۶	۳
			۶۰	۵۸/۶۰±۰/۵۲	-۲

\* برای رسم خط از ۴ درصد وزنی-وزنی لارد در روغن زیتون استفاده شد و هر نمونه سه بار آنالیز شد.  
\*\* درصد خطای نسبی از تقسیم تفاوت مقدار پیش بینی شده از مقدار افزوده شده بر مقدار افزوده شده ضرب در ۱۰۰ محاسبه شده است.

جدول ۴- مقایسه روش پیشنهادی در پژوهش حاضر با تعدادی از مقالات منتشر شده در سال های اخیر

ردیف	نمونه روغن	تقلب به کاررفته	روش آنالیز	حد کمی درصد تقلب	آنالیت	RSD% روش	مرجع
۱	لارد	روغن پخت و پز تصفیه شده	LC-MS/MS	-	استرول های گیاهی	۱۲/۵	(Liao et al., 2017)
۲	روغن نارگیل بکر	لارد	GC*GC-TOF/MS	۰/۲۵	کلسترول	۷/۱۴ - ۲/۴۹	(Xu et al., 2015)
۳	روغن های گیاهی	پسماند روغن پخت و پز	GC-MSD/MS	۵	استرول های گیاهی و کلسترول	۳	(Zhao et al., 2015)
۴	روغن زیتون	روغن های گیاهی	GC-FID	۵	استرول های گیاهی	-	Al-Ismael et al., (2010)
۵	روغن زیتون فرابکر	لارد	GC-FID	۱	استرول های گیاهی و کلسترول	<۳	پژوهش حاضر



## نتیجه گیری

یکی از مناسبترین روشها برای تشخیص تقلب در روغن‌ها، آنالیز بخش جزئی روغن‌ها و بررسی پروفایل استرول‌هاست که به شرایط محیطی و جغرافیایی بستگی زیادی ندارند. روش پیشنهادی در این پژوهش براساس استخراج استرول‌ها در نمونه‌های روغن با روش LLE و آنالیز با GC-FID بدون نیاز به مشتق‌سازی با واکنش‌گرهای مشتق‌ساز BSTFA و TMCS است که باعث کاهش هزینه‌ها می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش و نتایج حاصل از آزمون‌های آماری نشان دادند که وجود کلسترول در روغن‌زیتون آلوده به لارد با کلسترول موجود در روغن‌زیتون خالص تفاوت معنی‌داری دارند. بنابراین می‌توان از کلسترول به‌عنوان نشانگر وجود لارد در روغن‌زیتون فرابکر استفاده کرد. در این روش می‌توان حضور ۱ درصد لارد را در روغن‌زیتون فرابکر با خطای

کمتر از ۳ درصد نشان داد. علاوه‌بر این می‌توان از این روش برای تشخیص چربی حیوانی لارد در سایر روغن‌های گیاهی فاقد کلسترول نیز استفاده کرد. به‌عنوان یکی از نتایج فرعی این تحقیق پیش‌بینی می‌شود بتوان براساس نسبت استرول‌های گیاهی به‌دست‌آمده، حضور هر نوع روغن گیاهی دیگر در روغن‌زیتون فرابکر را تشخیص داد. این روش ساده و کم هزینه است و دقت خوبی دارد. از این‌رو، می‌تواند در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت برای بررسی تقلب در روغن‌های گیاهی به‌کار رود.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله لازم است از معاونت محترم پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه الزهراء<sup>(س)</sup> و مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران (۹۵/۲۰۸) جهت حمایت از پژوهش انجام‌شده تشکر و قدردانی به عمل آید.

## منابع

- Al-Ismail, K. M., Alsaed, A. K., Ahmad, R., & Al-Dabbas, M. (2010). Detection of olive oil adulteration with some plant oils by GLC analysis of sterols using polar column. *Food Chemistry*, 121(4), 1255-1259. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.016>
- Al-Kahtani, H., Abou Arab, A., & Asif, M. (2014). Detection of lard in binary animal fats and vegetable oils mixtures and in some commercial processed foods. *International Journal of Nutrition and Food Eegineering*, 8(11), 1244-1252. doi:<https://doi.org/10.5281/zenodo.1326830>
- Almeida, C. A. S., Baggio, S. R., Mariutti, L. R. B., & Bragagnolo, N. (2020). One-step rapid extraction of phytosterols from vegetable oils. *Food Research International*, 130, 108891. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108891>
- Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M. T., & Lercker, G. (2003). Solid-phase extraction–thin-layer chromatography–gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *Journal of Chromatography A*, 985(1-2), 211-220. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01397-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01397-3)
- Codex Alimentarius. (1999). Codex standard for named vegetable oils. *Codex stan*, 210, 1-13.
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusica, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>
- Dinh, T. T., Thompson, L. D., Galyean, M. L., Brooks, J. C., Patterson, K. Y., & Boylan, L. M. (2011). Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat and poultry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(5), 269-289. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00158.x>
- Ergönül, P. G., & Özbek, Z. A. (2018). Identification of bioactive compounds and total phenol contents of cold pressed oils from safflower and camelina seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2313-2323. doi:<https://doi.org/10.1007/s11694-018-9848-7>
- Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., & Vander Heyden, Y. (2018). A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food control*, 93, 165-182. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.015>

- Fadzillah, N. A., Rohman, A., Salleh, R. A., Amin, I., Shuhaimi, M., Farahwahida, M., . . . Khatib, A. (2017). Authentication of butter from lard adulteration using high-resolution of nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-performance liquid chromatography. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2147-2156. doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1233428>
- Filoda, P. F., Fetter, L. F., Fornasier, F., de Souza Schneider, R. d. C., Helfer, G. A., Tischer, B., . . . da Costa, A. B. (2019). Fast methodology for identification of olive oil adulterated with a mix of different vegetable oils. *Food Analytical Methods*, 12(1), 293-304. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-018-1360-5>
- Gorassini, A., Verardo, G., & Bortolomeazzi, R. (2019). Polymeric reversed phase and small particle size silica gel solid phase extractions for rapid analysis of sterols and triterpene dialcohols in olive oils by GC-FID. *Food Chemistry*, 283, 177-182. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.120>
- Green, H. S., Li, X., De Pra, M., Lovejoy, K. S., Steiner, F., Acworth, I. N., & Wang, S. C. (2020). A rapid method for the detection of extra virgin olive oil adulteration using UHPLC-CAD profiling of triacylglycerols and PCA. *Food control*, 107, 106773. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106773>
- Hajjar, G., Rizk, T., Akoka, S., & Bejjani, J. (2019). Cholesterol, a powerful <sup>13</sup>C isotopic biomarker. *Analytica Chimica Acta*, 1089, 115-122. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.001>
- He, P., Wan, X., Wang, C., & Jiao, Y. (2014). Determination of animal oil added in vegetable oil by standard chemical method coupled with image texture analysis technology. *International Journal of Innovative Computing, Information and Control*, 10(1), 67-80.
- Heidari, M., Talebpour, Z., Abdollahpour, Z., Adib, N., Ghanavi, Z., & Aboul-Enein, H. Y. (2020). Discrimination between vegetable oil and animal fat by a metabolomics approach using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04375-9>
- Hong, E., Lee, S. Y., Jeong, J. Y., Park, J. M., Kim, B. H., Kwon, K., & Chun, H. S. (2017). Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3877-3896. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.8364>
- International Union of Pure and Applied Chemistry. (1992). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 151. Retrieved from [http://old.iupac.org/publications/books/ISBN0632033371\\_compress.pdf](http://old.iupac.org/publications/books/ISBN0632033371_compress.pdf)
- ISO. (1999). International Standards Official Methods 12228: 1999. *Animal and Vegetable Fats and Oils-Determination of Individual and Total Sterols Contents-Gas Chromatographic Method*.
- Kenar, A., Cicek, B., Arslan, F. N., Akin, G., Elmas, Ş. N. K., & Yilmaz, I. (2019). Electron impact–mass spectrometry fingerprinting and chemometrics for rapid assessment of authenticity of edible oils based on fatty acid profiling. *Food Analytical Methods*, 12(6), 1369-1381. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-019-01472-0>
- Laakso, P. (2005). Analysis of sterols from various food matrices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(6), 402-410. doi:<https://doi.org/10.1002/ejlt.200501134>
- Li, Y., Chen, S., Chen, H., Guo, P., Li, T., & Xu, Q. (2020). Effect of thermal oxidation on detection of adulteration at low concentrations in extra virgin olive oil: Study based on laser-induced fluorescence spectroscopy combined with KPCA–LDA. *Food Chemistry*, 309, 125669. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125669>
- Liao, C.-D., Peng, G.-J., Ting, Y., Chang, M.-H., Tseng, S.-H., Kao, Y.-M., . . . Cheng, H.-F. (2017). Using phytosterol as a target compound to identify edible animal fats adulterated with cooked oil. *Food control*, 79, 10-16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.026>
- Lioupi, A., Nenadis, N., & Theodoridis, G. (2020). Virgin olive oil metabolomics: A review. *Journal of Chromatography B*, 122161. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122161>
- McDowell, D., Defernez, M., Kemsley, E. K., Elliott, C. T., & Koidis, A. (2019). Low vs high field 1h Nmr spectroscopy for the detection of adulteration of cold pressed rapeseed oil with refined oils. *LWT*, 111, 490-499. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.065>
- Rohman, A., Che Man, Y. B., Hashim, P., & Ismail, A. (2011). FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard adulteration in some vegetable oils espectroscopia FTIR combinada con quimiometria

- para el análisis de adulteración con grasa de cerdo de aceites vegetales. *Cyta-Journal of Food*, 9(2), 96-101. doi:<https://doi.org/10.1080/19476331003774639>
- Su, T., Wei, P., Wu, L., Guo, Y., Zhao, W., Zhang, Y., . . . Qiu, L. (2019). Development of nucleic acid isolation by non-silica-based nanoparticles and real-time PCR kit for edible vegetable oil traceability. *Food Chemistry*, 300, 125205. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125205>
- Thomas, A. (2012). *Fats and Fatty Oils*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Tian, L., Zeng, Y., Zheng, X., Chiu, Y., & Liu, T. (2019). Detection of Peanut oil adulteration mixed with Rapeseed Oil using Gas Chromatography and Gas Chromatography–Ion Mobility Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 12(10), 2282-2292. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-019-01571-y>
- Xu, B., Li, P., Ma, F., Wang, X., Matthäus, B., Chen, R., . . . Zhang, Q. (2015). Detection of virgin coconut oil adulteration with animal fats using quantitative cholesterol by GC× GC–TOF/MS analysis. *Food Chemistry*, 178, 128-135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.035>
- Yan, J., Erasmus, S. W., Toro, M. A., Huang, H., & van Ruth, S. M. (2020). Food fraud: Assessing fraud vulnerability in the extra virgin olive oil supply chain. *Food control*, 111, 107081. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107081>
- Yan, J., Oey, S. B., van Leeuwen, S. P., & van Ruth, S. M. (2018). Discrimination of processing grades of olive oil and other vegetable oils by monochloropropanediol esters and glycidyl esters. *Food Chemistry*, 248, 93-100. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.025>
- Zhao, H., Wang, Y., Xu, X., Ren, H., Li, L., Xiang, L., & Zhong, W. (2015). Detection of adulterated vegetable oils containing waste cooking oils based on the contents and ratios of cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, and campesterol by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1645-1654. doi:<https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-112>
- Zhao, X., Ma, F., Li, P., Li, G., Zhang, L., Zhang, Q., . . . Wang, X. (2015). Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC–MS/MS. *Food Chemistry*, 176, 465-471. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.082>

## Authentication of Vegetable Oils from Lard Adulteration by Sterols Analysis: a case study of olive oil

Maryam Kashi<sup>1</sup>, Zahra Talebpour<sup>2,3\*</sup>, Behrooz Jannat<sup>4</sup>

1- MSc. Graduate, Department of Chemistry, Faculty of Physics and Chemistry, Alzahra University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Physics and Chemistry, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Analytical and Bioanalytical Research Centre, Alzahra University, Tehran, Iran

\*Corresponding author (ztalebpour@alzahra.ac.ir)

4- Associate Professor, Halal Research Center IRI, Tehran, Iran

### Abstract

In this study, the sterols of 5 different vegetable oils (olive, canola, corn, sesame as well as sunflower) and an animal fat (lard) were analyzed by liquid-liquid extraction and gas chromatography. The sterols in real samples were identified by mass spectrometry. Calibration curves were plotted with the correlation coefficients more than 0.99 for each sterol. The detection limits for  $\beta$ -sitosterol, campesterol, and cholesterol were 0.48, 2.38, and 0.44 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The recoveries were obtained in the range of 95-109%, and their relative standard deviations were less than 9% in a day and between three days. The concentration of each sterol in real samples was determined using the purposed method. To detect lard adulteration in vegetable oils, mixtures of extra virgin olive oil and lard in four different ratios were prepared and analyzed. According to the results, at a higher percentage of lard in extra virgin olive oil, cholesterol increased and plant sterols were decreased. The curve plotted via the cholesterol concentration versus the added amount of lard, was linear with the correlation coefficient of more than 0.99. Moreover, this method made the detection of lard adulteration possible in olive oil with 1% detection limit and less than 3% uncertainty. Therefore, the identification of lard adulteration in plant oils (cholesterol-free) can be based on the suggested method.

**Keywords:** Adulteration of olive oil,  $\beta$ -sitosterol, Campesterol, Cholesterol, Lard