

分散式固相萃取结合高效液相色谱法快速测定 油脂中三种抗氧化剂含量

王 浩, 杨悠悠, 刘 佟, 杨永坛*

(中粮营养健康研究院, 营养健康与食品安全北京市实验室, 北京 102209)

摘 要: **目的** 建立食用油脂中叔丁基羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)残留的快速检测方法。**方法** 采用分散式固相萃取技术结合高效液相色谱(HPLC), 选用中性氧化铝作为吸附剂, 以整合了吸附剂活化、目标物提取和样品净化等步骤的“一步式”前处理方式净化样品, 最后用高效液相色谱二极管阵列检测器(DAD)对三种抗氧化剂含量进行测定。**结果** 在优化实验条件下, 方法的线性范围为 0.2~200 mg/L, 线性相关系数 $R^2 \geq 0.9997$, 对 BHA、BHT、TBHQ 的检出限($S/N=3$)均为 0.5 mg/kg, 回收率为 85.5%~95.4%, 峰面积的相对标准偏差为 2.10%~3.53%。**结论** 本文所建立的方法较液液萃取、固相萃取、凝胶渗透色谱等传统的方法更为简便快速, 高效环保, 成本低廉, 可满足油脂中 BHA、BHT、TBHQ 含量检测需求; 整个样品前处理过程仅需 10~15 min, 适合 BHA、BHT、TBHQ 含量检测的批量实验。

关键词: 高效液相色谱法; 分散固相萃取; 抗氧化剂; 食用油脂

Determination of 3 antioxidant residues in edible oil by high performance liquid chromatography with dispersive solid phase extraction

WANG Hao, YANG You-You, LIU Tong, YANG Yong-Tan*

(Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, COFCO Nutrition and Health Research Institute, Beijing 102209, China)

ABSTRACT: Objective An analytical method for the determination of BHA, BHT and TBHQ residues in edible oil was investigated. **Methods** The new method based on dispersive solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) was established. Using Alumina-N as adsorbent, the traditional adsorbent activation, sample cleaning and target extraction were integrated as the “one-step” sample preparation process. Then the three antioxidants were analyzed by HPLC (Diode array detector, DAD). **Results** Under the optimized condition, using HPLC-DAD, the calibration of antioxidants were linear in the range of 0.2~200 mg/L with R^2 more than 0.9997. In addition, the limit of detection (LOD) was found of 0.5 mg/kg ($S/N=3$). The spiked recoveries of the BHA, BHT and TBHQ from animal and plant oil were in the range of 85.5%~95.4%, with the relative standard deviations (RSDs) of peak area of 2.10%~3.53%. **Conclusion** Compared to the traditional methods such as liquid-liquid extraction, solid phase extraction and gel permeation chromatography (GPC), this method was easy, quick, good efficient, low-pollution and low-cost. It only took 10~15 min, suitable for batch experiments.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; dispersive solid phase extraction; antioxidants; edible oil

*通讯作者: 杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: yangyongtan@cofco.com

*Corresponding author: YANG Yong-Tan, Senior Engineer, COFCO Nutrition & Health Research Institute, Future Science and Technology Park South Road NO.4 Beiqijia, Changping, Beijing 102209, China. E-mail: yangyongtan@cofco.com

1 引 言

叔丁基羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基羟基甲苯(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)是一类油脂中经常复配添加的人工合成抗氧化剂。其酚类结构可作为自由基终止剂, 干扰自由基连锁反应中的增殖步骤, 形成稳定的共振结构阻断氧化反应, 从而保持油脂的稳定性^[1]。然而, 合成抗氧化剂的过量添加会对人体健康造成伤害: 如大剂量 BHA、BHT 可致癌^[2], BHT 会抑制人体呼吸酶活性^[3], TBHQ 有导致 DNA 损伤致突变的危险^[4]。自 2012 年 12 月媒体曝光徐福记“滥用抗氧化剂”事件后, 公众对食品中合成抗氧化剂的使用高度关注。美国、欧盟、日本等国家和地区对合成抗氧化剂的添加及添加量严格限制。我国食品添加剂使用标准 GB 2760-2011^[5]油脂中抗氧化剂的最大使用量做出限量规定: BHA、BHT 和 TBHQ 均为 0.2 g/kg(以油脂中的含量计)。

目前, 国内外对油脂中抗氧化剂类的检测方法已有许多报道。主要包括: 比色法^[6]、气相色谱法^[7]、气相色谱质谱法^[8]、液相色谱法^[9,10]、液相色谱质谱法^[11,12]、毛细管电泳法^[13]等。前处理方法主要有薄层层析法^[6]、液液萃取法^[7,10,12]、固相萃取法^[9]、凝胶渗透色谱法^[14]等。这些传统的提取净化方法都存在一些缺点: 液液萃取法净化效果较差, 溶剂使用量较多; 固相萃取法萃取柱成本高, 溶剂使用种类较多; 凝胶渗透色谱法溶剂使用量大成本高, 时间长; 层析法定量不准确, 重现性差。本研究采用高效液相色谱-二极管阵列检测方法, 结合分散式固相萃取技术对油脂进行提取净化, 极大提高了检测效率, 降低了实验成本和有机试剂的使用量, 实现了油脂制品中 BHA、BHT 和 TBHQ 的快速精确定量。

2 材料与方法

2.1 主要仪器与试剂

Thermo UltiMate 3000 型高效液相色谱仪, 配备二极管阵列检测器(美国 Thermo 公司); ST 16R 型高速离心机(美国 Thermo 公司); QL-902 型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); BSA224-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); TTL-DC II 型氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司)。

甲醇、乙醇、乙腈(色谱纯, Thermo Fisher 公司); 乙酸(分析纯, 天津化工公司); 弗罗里硅土、C₁₈ 硅胶(分析纯, 北京艾杰尔科技有限公司); 中性氧化铝(100-300 目)(分析纯, 天津光复科技发展有限公司); BHA、BHT、TBHQ 标准品(德国 Dr.E 公司)。

本实验中的各种食用油均购于本地超市。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); 流动相 A: 甲醇, 流动相 B: 1%乙酸水溶液, 流动相 C: 异丙醇。梯度洗脱条件: 起始 40% A, 60% B 洗脱; 随后 7.5 min 内 A 相体积比由 40%线性上升至 100%, 保持 4 min; 11.6 min 后以 10% B, 90% C 冲洗色谱柱, 保持 4 min; 16 min 后恢复至初始 40% A, 60% B, 保持 7 min。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 20 μL; 检测器波长 280 nm。

2.3 样品处理方法

取 0.2 g 油脂样品, 于 50 mL 离心管中加入吸附剂中性氧化铝 10 g, 20 mL 甲醇, 涡旋振荡 1 min。取提取液 10 mL 于 50 °C 水浴中氮吹至干, 用 0.5 mL 甲醇复溶。再经 0.45 μm 滤膜过滤后, 进行色谱分析。

3 结果与讨论

3.1 吸附剂及用量的选择

该研究中, 样品前处理的净化过程包括干扰目标分析物的杂质的去除以及影响回收率油脂基质的去除。实验发现, 经过分散固相萃取, 在目标分析物附近, 不存在干扰峰。然而, 当油脂未去除干净时, 会显著影响目标物的回收率。考察了弗罗里硅土、中性氧化铝和 C₁₈ 硅胶的净化效果。实验发现, 弗罗里硅土、C₁₈ 硅胶对三种抗氧化剂的吸附过强, 使目标物完全被吸附, 无法被提取溶剂甲醇或乙腈所提取, 回收率为零。然而, 选用中性氧化铝作为吸附剂得到较高的回收率, 回收率达到 85.5%~95.4%。由于作为活性中心的铝离子暴露于中性氧化铝晶体表面, 在提取剂甲醇的作用下, 一些表面裸露的铝离子与游离的氢氧根离子逐渐结合, 减弱了中性氧化铝的吸附作用, 使其在吸附杂质的同时不吸附目标物^[15]。最终选用中性氧化铝作为吸附剂。

中性氧化铝用量分别选择 7、8、9、10、11 g 作为水平条件考察了吸附剂的最佳使用量,以 20 mL 甲醇提取,对 10 mg/L 的加标样进行测定,结果见图 1。实验结果表明,中性氧化铝用量在 10 g 时, BHT、TBHQ 的回收率达到最大,分别为 85.7% 和 87.1%, BHA 同时也具有较好的回收率达到 95.0%,且具有较好的净化效果。最终选择中性氧化铝用量为 10 g。

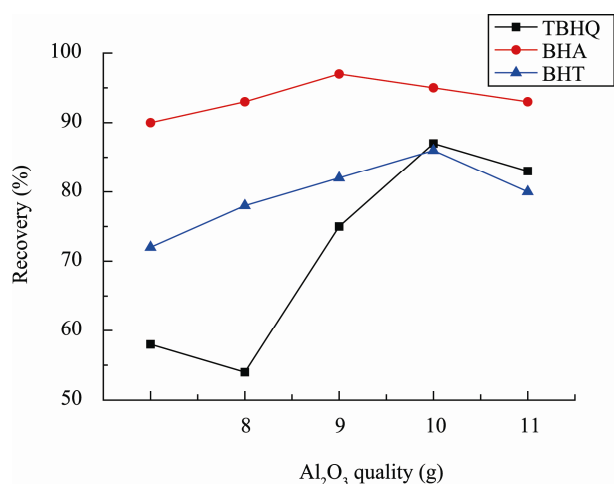


图 1 中性氧化铝用量对回收率的影响

Fig. 1 Effects of amount of Al₂O₃ on the recovery

3.2 提取溶剂及用量的选择

三种抗氧化剂均具有酚羟基结构,易溶于醇类、乙腈等有机溶剂。考察了甲醇、乙醇和乙腈的提取效果。实验发现,与郭岚等^[8]液液萃取时乙腈提取效力明显高于醇类提取效力的情况不同,采用分散式固相萃取时:乙腈作为提取剂的情况下,三种抗氧化剂回收率均为零;醇类作为提取剂时,三种抗氧化剂均具有较高的回收率。由于甲醇具有对目标物回收率高,沸点较低方便浓缩的特点,最终选用甲醇作为提取剂。

萃取剂体积分别选择 14、16、18、20、22 mL 作为水平条件考察了提取剂甲醇的最佳使用量,以 10 g 中性氧化铝为吸附剂,对 10 mg/L 的加标样进行测定,结果见图 2。实验结果表明,随着萃取剂体积的增加 BHA、BHT、TBHQ 三者的回收率呈上升趋势,至提取剂为 20 mL 时 BHA 和 BHT 的回收率达到最大,分别为 95.0% 和 85.7%, TBHQ 同时也具有较好的回收率达到 87.1%。提取剂用量 22 mL 时的回收率与用量 20 mL 时的相近。所以为方便实验操作,最终选择提取液甲醇体积为 20 mL。

3.3 色谱条件的优化

色谱条件中起始流动相的配比和 11.6 min 内的洗脱梯度变化均参考 NY/T 1602-2008^[10]的色谱条件,使得三种抗氧化剂达到基线分离。11.6 min 到 16 min 之间,流动相中高比例的亲油脂有机相的配比是为了更好地洗脱色谱柱中的甘油三酯类物质^[16],在延长柱寿命的同时,也便于前处理净化效果的监控。图 3 为三种抗氧化剂混合标准品、玉米油样品和玉米油加标样品比对色谱图。

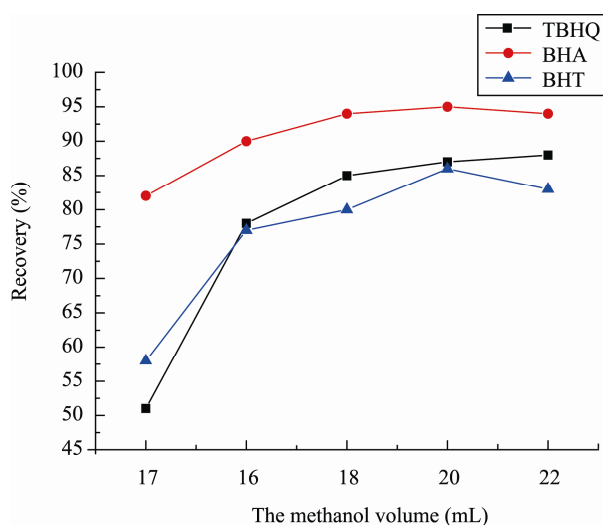


图 2 提取剂甲醇用量对回收率的影响

Fig. 2 Effects of methanol volume on the recovery

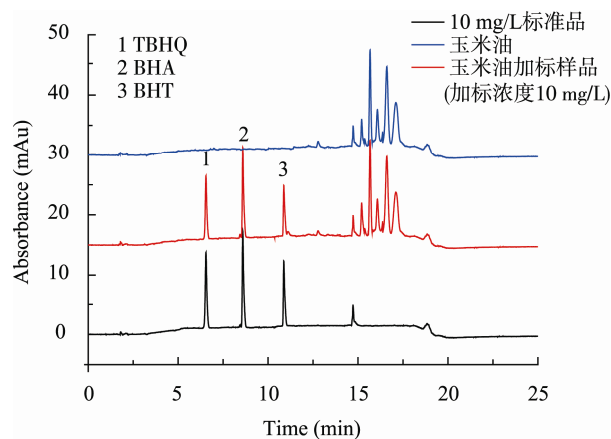


图 3 三种抗氧化剂混合标准品、玉米油样品和玉米油加标样品比对色谱图

Fig. 3 LC-DAD chromatograms of standard mixture of 3 antioxidants compare with corn oil sample and the spiked sample
1: TBHQ; 2: BHA; 3: BHT

3.4 标准曲线的绘制和检出限

用甲醇作为溶剂分别配制 3 种抗氧化剂的标准储备液, 浓度均为 1000 mg/L。将 3 种标准储备液进行混合、稀释、定容配制成质量浓度为 0.2、1.0、10.0、50.0、200 mg/L 的混合标准溶液。各进样 20 μ L 测定其峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X), 采用外标法定量, 绘制标准曲线并计算回归方程。进空白样品, 以 3 倍信噪比(S/N)作为检出限(LOD)。结果如表 1 所示, 峰面积与浓度线性关系良好, BHA、BHT、TBHQ 的检出限均为 0.5 mg/kg。

表 1 方法的线性回归方程、线性范围及检出限
Table 1 Regression equations, linear range and detection limit of BHA, BHT and TBHQ

抗氧化剂	线性回归方程	相关系数 (R^2)	线性范围 (mg/L)	检出限 (mg/kg)
BHA	$Y=18.249X-8.1762$	0.9998	0.2~200	0.5
BHT	$Y=10.33X-4.5564$	0.9998	0.2~200	0.5
TBHQ	$Y=10.963X+20.283$	0.9997	0.2~200	0.5

3.5 回收率和精密度的测定

对阴性油脂样品的三水平加标样各进行 6 次分析, 方法的回收率和相对标准偏差见表 2。三种抗氧化剂加标回收率范围是 85.5%~95.4%, 精密度范围是 2.10%~3.53%, 精密度良好。

表 2 方法回收率和精密度(n=6)
Table 2 The recoveries and precisions for 3 antioxidants (n=6)

样品名称	抗氧化剂	加标水平(mg/kg)	回收率(%)	RSD (%)
玉米油	BHA	10	95.4	2.10
		50	95.0	2.86
		200	94.9	2.59
玉米油	BHT	10	90.2	3.53
		50	85.7	3.15
		200	85.5	2.92
玉米油	TBHQ	10	91.3	3.47
		50	87.1	3.03
		200	90.5	3.45

3.6 实际样品测定

采用本方法的前处理条件和色谱条件, 对购于市场的 20 个油脂样品进行测定。样品种类包括: 菜

籽油、葵花籽油、玉米油、花生油、大豆油、调和油等。20 个样品中玉米油和花生油均未检出含有 BHA、BHT 或 TBHQ, 所检出的样品中 TBHQ 检出频次最高, 均满足 GB2760-2011 限量的要求。检出抗氧化剂的样品的检测结果见表 3。一个菜籽油中测定抗氧化剂的色谱图见图 4。

表 3 实际样品中三种抗氧化剂的含量测定(n=3)
Table 3 The content of 3 antioxidants (n=3) in real oil samples

样品名称	检出抗氧化剂名称	含量(mg/kg)
葵花籽油 A	TBHQ	28.2
葵花籽油 B	TBHQ	54.7
大豆油 A	TBHQ	55.2
大豆油 B	TBHQ	62.5
菜籽油 A	TBHQ	18.4
	BHT	17.1
菜籽油 B	BHT	57.0
	TBHQ	9.2
调和油 A	BHA	9.9
	TBHQ	56.6
起酥油 A	TBHQ	46.3
	BHA	39.5

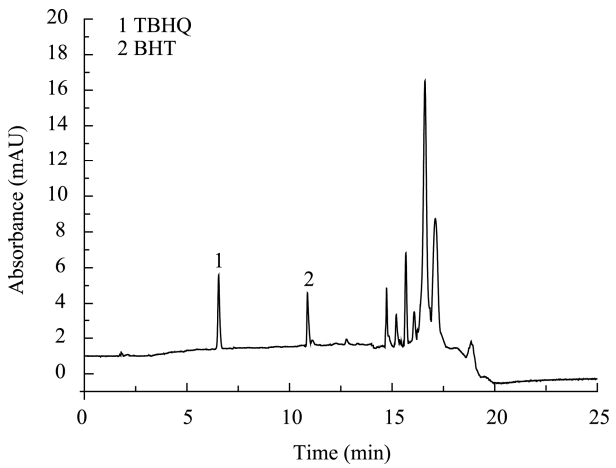


图 4 菜籽油中抗氧化剂测定的色谱图
Fig. 4 A typical chromatograms of antioxidants in canola oil
1: TBHQ; 2: BHT

4 结 论

建立了一种应用分散式固相萃取技术测定食用

油脂中 BHA、BHT、TBHQ 残留的检测方法。本方法将吸附剂活化、目标物提取和基质净化同时进行,较液液萃取、固相萃取、凝胶渗透色谱等传统方法更为简便快速,高效环保,成本低廉。由于步骤简单,在大幅度提高工作效率的同时,使人为操作误差降至最低,具有更好的准确度和精密度。结果表明,BHA、BHT、TBHQ 的方法检出限均为 0.5 mg/kg,加标回收率为 85.5%~95.4%,精密度为 2.10%~3.53% ($n=6$),符合油脂中抗氧化剂残留的检测要求,尤其适合批量油脂样品中 BHA、BHT、TBHQ 含量的测定。

参考文献

- [1] 贾继红, 盛佳坤. 天然抗氧化剂及其在食品中的应用[J]. 化学工程师, 2004, (7): 46-47.
Jia JH, Sheng JK. Natural antioxidants and their application in food [J]. Chem Eng, 2004, (7): 46-47.
- [2] Whysner J, Wang CX, Zhang E. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumors of the rat forest on ach [J]. Food Chem Toxicol, 1994, 32(03): 215-222.
- [3] 朱臻怡, 冯民, 熊华莹, 等. 食品中抗氧化剂的应用及其检测技术研究进展[J]. 化学分析计量, 2013, 22 (5): 104-108.
Zhu ZY, Feng M, Xiong HX, *et al.* Research progress of application and detection technology of antioxidants in food [J]. Chem Anal Meter, 2013, 22 (5): 104-108.
- [4] S. Kashanian, J. Ezzati Nazhad Dolatabadi. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive [J]. Food Chem, 2009, 116(3): 605-610.
- [5] GB 2760-2011 食品添加剂使用卫生标准[S].
GB 2760-2011 Hygienic standards for uses of food additives [S].
- [6] GB/T 5009.30-2003 食品中叔丁基羟基茴香醚(BHA)与 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的测定[S].
GB/T 5009.30-2003 Determination of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in foods [S].
- [7] 黄锦燕, 张全美, 王守卿, 等. 采用甲醇提取-气相色谱法检测食用油中两种抗氧化剂的研究[J]. 化学分析计量, 2011, 20(5): 89-91.
Huang JY, Zhang QM, Wang SQ, *et al.* Determination of two antioxidants in edible oil by methanol extraction and gas phase chromatography [J]. Chem Anal Meter, 2011, 20(5): 89-91.
- [8] 郭岚, 谢明勇, 鄢爱平, 等. 气相色谱-质谱法同时测定食用植物油中三种抗氧化剂[J]. 分析科学学报, 2007, 23(2): 169-172.
Guo L, Xie MY, Yan AP, *et al.* Simultaneous determination of there antioxidants in edible vegetation oil by GC-MS [J]. J Anal Sci, 2007, 23(2): 169-172.
- [9] 张璐, 孔祥虹, 李建华, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定食品中 13 种抗氧化剂[J]. 分析试验室, 2014, 33(1): 43-47.
Zhang L, Kong XH, Li JH, *et al.* Simultaneous determination of 13 antioxidants in foodstuffs by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography -electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2014, 33(1): 43-47.
- [10] NY/T 1602-2008 植物油中叔丁基羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)和特丁基对苯二酚(TBHQ)的测定 高效液相色谱法[S].
NY/T 1602-2008 Determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tertiary butylhydroquinone content in vegetable oil High performance liquid chromatography [S].
- [11] 凌云, 储晓刚, 张峰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定调味料中的 17 种防腐剂和抗氧化剂[J]. 色谱, 2011, 29(8): 723-730.
Ling Y, Chu XG, Zhang F, *et al.* Simultaneous determination of 17 preservatives and antioxidants in condiments using ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr., 2011, 29(8): 723-730.
- [12] 朱臻怡, 魏云计, 冯民, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定食用油中的 16 种抗氧化剂[J]. 化学分析计量, 2014, 23 (2): 23-26.
Zhu ZY, Wei YJ, Feng M, *et al.* Simultaneous determination of 16 antioxidants in edible oil by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Chemistry Anal Meter, 2014, 23 (2): 23-26.
- [13] Delgado-Zamarreno MM, Gonzalez-Maza I, Sanchez-Perez A, *et al.* Analysis of synthetic phenolic antioxidants in edible oils by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1722-1727.
- [14] 林捷, 张彩云, 郑申西, 等. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱法测定食品中抗氧化剂 BHA、BHT、TBHQ[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 7: 1694-1696.
Lin J, Zhang CY, Zheng SX, *et al.* Determination of BHA, BHT and TBHQ in foods by HPLC with GPC [J]. Chin J Health Lab Technology, 2010, 7: 1694-1696.
- [15] Peri JB. Infrared and gravimetric study of the surface hydration of 7-alumina [J]. Physical Chemistry, 1965, 69: 211-219.
- [16] AOCS Ce 5b-89, 2009 Triglycerides in vegetable oil by HPLC [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 浩, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: wanghao3@cofco.com



杨永坛, 高级工程师, 副总工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: yangyongtan@cofco.com