

甲醇萃取法在食用油中酚类抗氧化剂检测中的应用研究

杨李胜, 刘志鹏*, 柯华南

(广东省生物工程研究所(广州甘蔗糖业研究所), 广州 510316)

摘要: 目的 对比国标方法与甲醇萃取法萃取食用油中的酚类抗氧化剂。**方法** 分别用乙酸乙酯:环己烷(1:1, V:V)萃取凝胶渗透色谱仪(gel permeation chromatograph, GPC)进行样品净化气相色谱检测和甲醇萃取冷冻过滤气相色谱检测。**结果** 甲醇萃取法在检测叔丁基羟基苯酚(butyl hydroxyl acids, BHA)、2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT)、叔丁基对苯二酚(tertiary butylhydroquinone, TBHQ) 3种抗氧化剂在各自的线性范围内, 线性关系良好, 相关系数 r 大于0.999, 相对标准偏差(relative standard deviation RSD)为0.91%~1.75%, 回收率为89%~98%。**结论** 该方法简单、快速、准确、实验成本低, 适用于食用油中酚类抗氧化剂的测定。

关键词: 食用油; 抗氧化剂; 甲醇萃取法

Study on the application of methanol extraction in the determination of phenolic antioxidants in edible oil

YANG Li-Sheng, LIU Zhi-Peng*, KE Hua-Nan

(Guangdong Bioengineering Institute (Guangzhou Sugar Cane Industry Research Institute), Guangzhou 510316, China)

ABSTRACT: Objective To compare the extraction of phenolic antioxidants in edible oil by the national standard method and methanol extraction method. **Methods** Extracted with ethyl acetate: cyclohexane (1:1, V: V), respectively, using a gel permeation chromatograph (GPC) for sample purification gas chromatography and methanol extraction freeze filtration gas chromatography. **Results** Methanol extraction method for the detection of butyl hydroxyl acids (BHA), 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), tert-butyl hydroquinone (tertiary butylhydroquinone), TBHQ) The three antioxidants have good linearity in their respective linear ranges, the correlation coefficient was greater than 0.999, the relative standard deviations (RSDs) were 0.91% to 1.75%, and the recovery were 89% to 98%. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and low in experimental cost, which is suitable for the determination of phenolic antioxidants in edible oils.

KEY WORDS: edible oil; antioxidant; methanol extraction

1 引言

食用油脂在生产、贮藏、使用过程中, 受热、光、水分等因素的影响易引发酸败, 致使品质下降, 产生对人体

有害物质, 特别是含有不饱和脂肪酸的油脂及含油食品^[1], 由于其结构上的不稳定性, 最终使其发生酸败, 品质下降, 甚至产生毒性物质。目前防止食品中油脂氧化酸败的方法很多, 如真空、充氮、使用除氧剂等方法, 但最有效的方

基金项目: 广州市科技项目(201806010093)

Fund: Supported by Guangzhou Science and Technology Project (201806010093)

*通讯作者: 刘志鹏, 工程师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: 714388520@qq.com

*Corresponding author: LIU Zhi-Peng, Engineer, Guangdong Bioengineering Institute (Guangzhou Sugar Cane Industry Research Institute), Guangzhou 510316, China. E-mail: 714388520@qq.com

法之一就是添加抗氧化剂^[2,3]。抗氧化剂的作用原理是:

(1) 它们比油脂更容易氧化, 结合容器中的氧而保护了油脂; (2) 它们能与过氧化自由基结合生成稳定的化合物, 阻止连锁反应的传播, 延长诱导期。抗氧化剂通常都是酚类或芳胺类化合物。根据抗氧化剂的抗氧化机制可将抗氧化剂分为: 自由基清除剂、氢过氧化物分解剂、抗氧化剂增效剂、抗氧化剂还原剂、抗氧化剂混用剂、金属螯合剂、单线态氧淬灭剂、脂氧合酶抑制剂。常见的抗氧化剂有: 叔丁基羟基茴香醚(butyl hydroxyl acids, BHA), 2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT), 叔丁基对苯二酚(tertiary butylhydroquinone, TBHQ), 没食子酸丙酯(propyl gallate, PG)等^[4-7]。在几种抗氧化剂复合使用的情况下, 抗氧化效果会更好些, 并且不同的抗氧化剂组合对油脂的抗氧化效果不同, 在使用时需根据具体情况选择抗氧化剂的用量及种类^[8]。然而抗氧化剂在减缓油脂腐败的同时也给人们带来了健康风险。研究表明 BHT、BHA 超量使用均对人体有害^[9]。根据国家食品添加剂使用卫生标准 GB 2760-2014(CNS 号 04.001、04.002)规定^[10], BHA、BHT、TBHQ 可用于油脂, 添加限量为 0.2 g/kg, 其检测方法有薄层色谱法、比色法、气相色谱法、液相色谱法、毛细管电泳法、气相色谱-质谱法等^[11-18]。国标法中的样品前处理要使用到凝胶渗透色谱仪(GPC)进行样品净化, 净化时间长, 使用溶剂量大, 每个样品要消耗 145 mL[乙酸乙酯:环己烷=1:1(V:V)]。本研究采用甲醇萃取法提取食用油中的抗氧化剂, 并与国标法比较, 观察两者的精密度实验以及回收率实验, 验证甲醇萃取法的可行性, 旨在日常大批量检测工作中, 使甲醇萃取法能够得到更大推广和应用。

2 材料与方 法

2.1 仪器与设备

7890B 气相色谱仪(美国安捷伦科技公司); KQ-100E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);

Prep linc GPC 型全自动凝胶渗透色谱装置(gel permeation chromatography, GPC)(美国 J2 scientific 公司); IKA HB10 旋转蒸发器(德国 IKA 公司)。

2.2 试 剂

叔丁基羟基茴香醚(BHA 98.0%)、2, 6-二叔丁基对甲酚(BHT 99.9%)、叔丁基对苯二酚(TBHQ 99.3%)(东京化成工业株式会社); 乙酸乙酯、环己烷(色谱纯, 北京百灵威科技有限公司); 甲醇(优级纯, 广州化学试剂厂)。

2.3 样品采集

众家厨花生调和油, 市场随机购买; 200 份食用油样品, 采用随机抽样方法市场上各个不同超市中采购。

2.4 实验方法

2.4.1 气相色谱条件

气相色谱柱: 毛细管柱 HP-5(30 m×0.32 mm, 0.5 μm); 进样器: 柱前压: 12 psi; 温度: 230 °C; 柱箱: 起始温度 80 °C, 停留 1 min, 后以 10 °C/min 升温至 250 °C, 停留 5 min; 火焰离子检测器(flame ionization detector, FID): 250 °C; 进样体积: 1 μL。

2.4.2 前处理方法

国标法: 准确称取备用油脂 0.5 g(精确到 0.01 mg), 用乙酸乙酯:环己烷(1:1, V:V)准确定容至 10.0 mL, 涡旋混合 2 min, 经凝胶渗透色谱装置净化, 收集流出液, 旋转蒸发浓缩至近干, 用乙酸乙酯:环己烷(1:1, V:V)定容至 2 mL, 进气相色谱仪分析。

凝胶渗透色谱条件: Bio Beads(S-X3)凝胶色谱柱: 300 mm×20 mm 玻璃柱; 柱分离度: 玉米油与抗氧化剂(BHA、BHT、TBHQ)的分离度:>85%; 流速: 5 mL/min; 进样量: 5 mL; 流出液收集时间: 13~65 min。

甲醇萃取法: 称取均匀样品 2.00 g 置于 10 mL 具塞比色管, 用 10 mL 甲醇超声萃取 10 min, 置冰箱冷冻层(-18 °C低温使油脂与甲醇更易分层)冷冻 1 h, 用滤纸过滤提取液(除去溶剂中剩余油脂)。

2.4.3 国标法 BHA、BHT、TBHQ 混合标准溶液的配制

准确称取 BHA、BHT、TBHQ 各 0.1000 g 混合后乙酸乙酯:环己烷(1:1, V:V)溶解, 定容至 100 mL, 此溶液中 BHA、BHT、TBHQ 的浓度均为 1.0 mg/mL。再从中移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别于 10 mL 容量瓶中, 乙酸乙酯:环己烷(1:1, V:V)定容, 此时标准系列的浓度分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL。对标准系列分别进样 1 μL 进行气相色谱分析。

2.4.4 甲醇萃取法 BHA、BHT、TBHQ 混合标准溶液的配制

甲醇萃取法: 准确称取 BHA、BHT、TBHQ 各 0.1000 g 混合后用甲醇溶解, 定容至 100 mL, 此溶液中 BHA、BHT、TBHQ 的浓度均为 1.0 mg/mL。再从中移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别于 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容, 此时标准系列的浓度分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL。对标准系列分别进样 1 μL 进行气相色谱分析。

2.4.5 2 种方法的精密度实验

国标法: 称取混合均匀样品 0.500 g 放入 10 mL 容量瓶中, 向容量瓶滴加国标法混标储备液 0.20 mL, 用乙酸乙酯:环己烷(1:1, V:V)准确定容至 10.0 mL, 转移到 GPC 专用进样管上, 上 GPC 净化, 收集流出液 13~65 min, 旋转蒸发至近干, 用乙酸乙酯:环己烷(1:1, 体积比)定容至 5 mL, 进行气相色谱分析, 用同一样品进行测定 10 次。

甲醇萃取法: 称取均匀样品 2.00 g 置于 10 mL 具塞比色管, 加入甲醇萃取法混标储备液 0.4 mL, 用 10 mL 甲醇分 2 次涡旋加超声萃取 10 min, 置冰箱冷冻层(-18 °C)冷冻

1 h, 用滤纸过滤提取液(除去溶剂中剩余油脂), 进行气相色谱分析, 用同一样品进行测定 10 次。

根据得出的 2 组数据, 计算两组测定结果的相对标准偏差, 进行比较。

2.4.6 2 种方法的回收实验

国标法: 称取不含 BHT、BHA、TBHQ 的食用油 0.500 g 于 10 mL 容量瓶中, 分别加入 BHA、BHT、TBHQ 各 0.10、0.20、0.40、0.60 mg, 每组添加量平行做 2 份, 以下处理用国标第一法, 用气相色谱分析。

甲醇萃取法: 称取不含 BHT、BHA、TBHQ 的食用油 2.00 g 于 10 mL 具塞比色管中, 分别加入 BHA、BHT、TBHQ 各 0.10、0.20、0.40、0.60 mg, 每组添加量平行做 2 份, 以下处理用甲醇萃取法, 用气相色谱分析, 根据得出的数据, 对 2 种方法进行比较。

2.4.7 甲醇萃取法的最适萃取时间实验

根据超声萃取时间分别为 1、5、10、20、30 min 将实验分为 5 组, 每组称取不含 BHT、BHA、TBHQ 的食用油 2.00 g 于 10 mL 具塞比色管中, 分别加入 BHA、BHT、TBHQ 各 0.40 mg, 每组平行 5 份样品, 进行甲醇萃取法处理, 用气相色谱分析, 根据得出的数据以萃取时间为横坐标, 测出抗氧化剂的含量为纵坐标, 作出曲线图, 用以确定使用甲醇萃取法时的最佳超声萃取时间。

2.4.8 甲醇萃取法验证实验

发挥甲醇萃取法在检测样品量较大时的优势, 用甲醇萃取法对来自广东省中山市不同超市的 200 份食用油样品进行处理, 通过气相色谱检测, 整理实验数据了解目前市场上酚类抗氧化剂在食用油中的使用情况。

3 结果与分析

3.1 国标法 BHA、BHT、TBHQ 混合标准溶液曲线

以标准溶液浓度为横坐标 X , 以峰面积为纵坐标 Y , 进行线性回归, 标准曲线如图 1、2、3 所示。

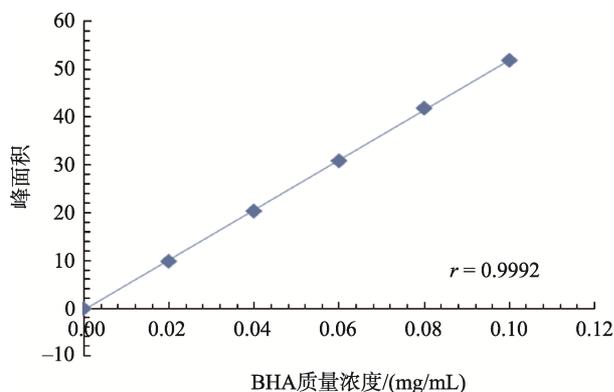


图 1 国标法 BHA 标准曲线

Fig.1 BHT standard curve of national standard method

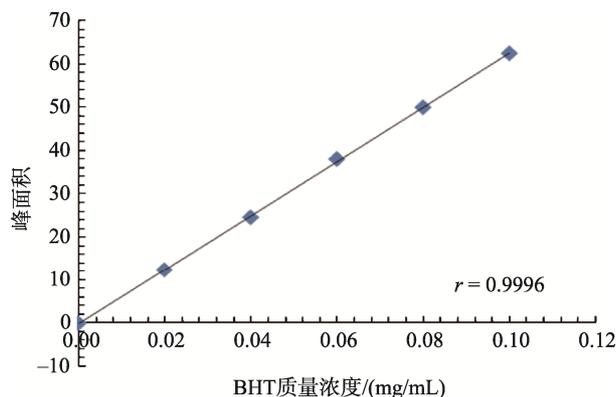


图 2 国标法 BHT 标准曲线

Fig.2 BHT standard curve of national standard method

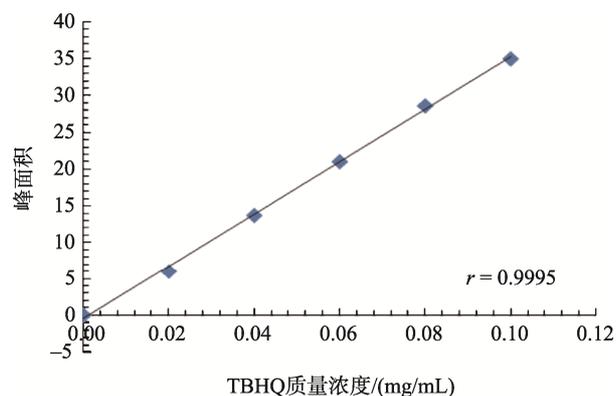


图 3 国标法 TBHQ 标准曲线

Fig.3 TBHQ standard curve of national standard method

3.2 甲醇法 BHA、BHT、TBHQ 混合标准溶液曲线

以标准溶液浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 标准曲线如图 4、5、6 所示。

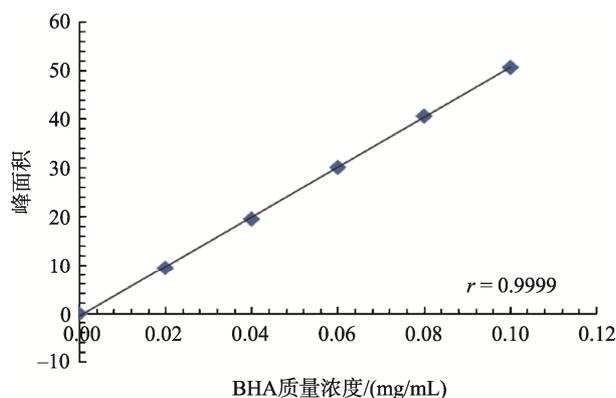


图 4 甲醇法 BHA 标准曲线

Fig.4 BHA standard curve of methanol method

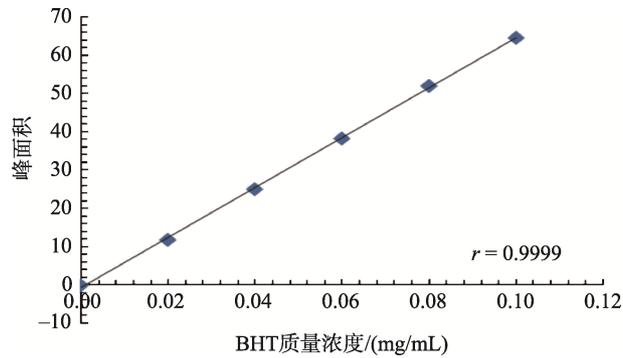


图5 甲醇法 BHT 标准曲线

Fig.5 BHT standard curve of methanol method

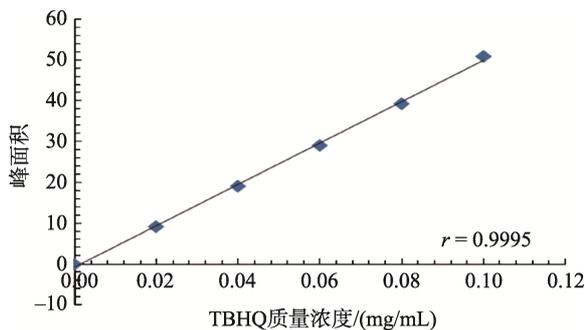


图6 甲醇法 TBHQ 标准曲线

Fig.6 TBHQ standard curve of methanol method

3.3 2种方法的精密度实验

按照 2.3.3 实验的方法对同一样品的不同处理方法分别测定 10 次, 得出的结果见表 1。由表 1 可知, 2 种方法的相对标准偏差均小于 5%, 精密度较好。

3.4 2种方法的回收率实验

2 种方法的回收率结果见表 2。从表 2 可以看出对于检测 BHA 和 BHT, 国标法以及甲醇萃取法均有不错的效果, 回收率都达到 90% 左右, 但国标法检测 TBHQ 回收率偏低, 而甲醇萃取法却有很好的效果, 回收率达到了 98%。

3.5 甲醇萃取法的最适萃取时间实验

甲醇萃取法最适萃取时间曲线图如图 7 所示。

超声萃取时间设为 1、5、10、20、30 min 时, 其 3 种抗氧化剂的平均回收率分别是 36.67%、78.33%、93.67%、93.33%、93.67%。因此, 确定甲醇萃取法的最适萃取时间为 10 min。

3.6 甲醇萃取法验证实验结果

对市场食用油按照 2.3.6 实验的方法测定, 得出的结果见表 3。

表 1 精密度实验结果

Table 1 Precision test results

方法	添加剂	测定结果/(g/kg)										平均值/(g/kg)	相对偏差/%
国标法	BHA	0.187	0.184	0.188	0.179	0.185	0.188	0.178	0.188	0.185	0.185	0.1847	1.94
	BHT	0.183	0.181	0.185	0.183	0.182	0.183	0.181	0.178	0.185	0.182	0.1823	1.13
	TBHQ	0.138	0.136	0.141	0.137	0.137	0.142	0.139	0.139	0.137	0.142	0.139	4.77
甲醇萃取法	BHA	0.184	0.182	0.189	0.180	0.178	0.185	0.183	0.185	0.187	0.185	0.1838	1.75
	BHT	0.175	0.185	0.186	0.186	0.182	0.175	0.183	0.182	0.180	0.179	0.1813	0.99
	TBHQ	0.195	0.198	0.195	0.196	0.197	0.198	0.193	0.195	0.193	0.195	0.1955	0.91

表 2 回收率实验结果

Table 2 Recovery experiment results

方法	添加剂	添加量/mg	平均测定值/mg	回收率/%	平均回收率/%
国标法	BHA	0.1	0.08	80	91
		0.2	0.19	95	
		0.4	0.37	92	
	BHT	0.6	0.59	98	91
		0.1	0.09	90	
		0.2	0.18	90	
		0.4	0.36	90	
		0.6	0.57	95	

续表 2

方法	添加剂	添加量/mg	平均测定值/mg	回收率/%	平均回收率/%
国标法	TBHQ	0.1	0.07	70	63
		0.2	0.14	70	
		0.4	0.27	68	
		0.6	0.41	68	
甲醇萃取法	BHA	0.1	0.09	90	91
		0.2	0.18	90	
		0.4	0.37	93	
		0.6	0.56	93	
	BHT	0.1	0.08	80	89
		0.2	0.18	90	
		0.4	0.36	90	
		0.6	0.57	95	
	TBHQ	0.1	0.10	100	98
		0.2	0.19	95	
		0.4	0.39	98	
		0.6	0.59	98	

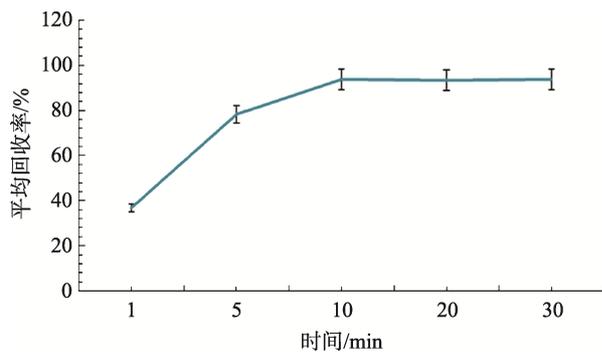


图 7 甲醇萃取法最适萃取时间曲线图(n=3)

Fig.7 The optimal time curve of methanol extraction(n=3)

表 3 市场食用油检测实验结果
Table 3 Market edible oil test results

添加剂	<检出限(0.005g/kg)	<0.01 g/kg	<0.2 g/kg	>0.2 g/kg
BHA	198	2	0	0
BHT	175	23	2	0
TBHQ	168	6	26	0

从表 3 中可以看出, 本次抽取样品在抗氧化剂添加量上均符合国家食品添加剂使用卫生标准 GB 2760-2014。

4 结 论

国标 GPC 净化实验步骤复杂繁琐, 分析时间较长并

使用大量的有机溶剂, 检测成本高, 而甲醇萃取法仅需要 10 mL 甲醇, 简单、快速且节省试剂, 因此甲醇萃取法优于国标法。

参考文献

- [1] 徐金瑞, 邓翌凤, 列丽坤. 几种抗氧化剂协同作用对葵花籽油稳定性的影响[J]. 中国油脂, 2009, 34(8): 40-42.
Xu JR, Deng YF, Li LK. Effects of synergistic effects of several antioxidants on the stability of sunflower oil [J]. China Oils Fats, 2009, 34(8): 40-42.
- [2] 何琴. 食品抗氧化剂在油脂中的应用[D]. 重庆: 重庆市巴南区动物疫病预防控制中心, 2005.
He Q. Application of food antioxidants in oils and fats [D]. Chongqing: Banan District Animal Disease Prevention and Control Center, Chongqing, 2005.
- [3] 李银聪, 阚建全, 柳中. 食品抗氧化剂作用机理及天然抗氧化剂 [J]. 中国食物与营养, 2011, 17(2): 24-26.
Li YC, Kan JQ, Liu Z. Mechanism of action of food antioxidants and natural antioxidants [J]. Food Nutr China, 2011, 17(2): 24-26.
- [4] 李炎. 油脂氧化与抗氧化研究[J]. 中国食品添加剂, 1997, (4): 5-9.
Li Y. Study on oxidation and antioxidation of oils and fats [J]. China Food Addit, 1997, (4): 5-9.
- [5] 孙丽芹. 脂类的自动氧化机理[J]. 中国油脂, 1998, 23(5): 56-57.
Sun LQ. Autooxidation mechanism of lipids [J]. China Oils Fats, 1998, 23(5): 56-57.
- [6] 朱胜华, 车振明, 向廷建. 茶多酚对玉米油抗氧化的研究[J]. 食品工业, 2011, (9): 58-61.
Zhu SH, Che ZM, Xiang TJ. Study on antioxidation of corn oil by tea

- polyphenols [J]. *Food Ind*, 2011, (9): 58–61.
- [7] 张雅楠, 梁鹏, 谢静仪, 等. 天然食品抗氧化剂的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2019, 25(1): 67–71.
Zhang YN, Liang P, Xie JY, *et al.* Advances in research on antioxidants in natural foods [J]. *Food Nutr China*, 2019, 25(1): 67–71.
- [8] 穆同娜, 张惠, 景全荣. 油脂的氧化机理及天然抗氧化物的简介[J]. *食品科学*, 2004, 25(S): 241–244.
Mu TN, Zhang H, Jing QR. Introduction of oxidation mechanism of oils and fats and natural antioxidants [J]. *Food Sci*, 2004, 25(S): 241–244.
- [9] Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, *et al.* Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with quality [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1054: 17–31.
- [10] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for uses of food additives [S].
- [11] 凌关庭. 食品抗氧化剂及其进展(三)[J]. *粮食与油脂*, 2000, (8): 45–47.
Ling GT. Food antioxidants and its progress (3) [J]. *J Cere Oils*, 2000, (8): 45–47.
- [12] 中国林业科学研究院分析中心. 现代实用仪器分析方法[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994.
Analysis Center of Chinese Academy of Forestry. Modern practical instrument analysis method [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1994.
- [13] 胡小钟, 余建新, 钱浩明, 等. 油脂中九种抗氧化剂的反相高效液相色谱法分离和测定[J]. *分析科学学报*, 2000, 16(1): 23–26.
Hu XZ, Yu JX, Qian HM, *et al.* Separation and determination of nine antioxidants in oils by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2000, 16(1): 23–26.
- [14] 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 three antioxidants in edible vegetable oils by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Anal Sci*, 2007, 23(2): 169–172.
- [15] Dos SR, Da SP, Franco C, *et al.* Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40(7): 1133–1139.
- [16] Kubows. Toxicity of dietary lipid peroxidation products trends in food [J]. *Food Sci Technol*, 1990, 9(1): 67–71.
- [17] 林春晓, 付斌. 气相色谱法检测食用油脂中BHA、BHT样品前处理方法研究[J]. *中国热带医学*, 2005, 12(3): 255–257.
Lin CX, Fu B. Study on pretreatment of BHA and BHT samples in edible oils by gas chromatography [J]. *Chin J Trop Med*, 2005, 12(3): 255–257.
- [18] 左玉, 张国娟, 惠芳, 等. 食品抗氧化剂的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2018, 31(5): 1–3.
Zuo Y, Zhang GJ, Hui F, *et al.* Research progress of food antioxidants [J]. *J Cere Oils*, 2018, 31(5): 1–3.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

杨李胜, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 280922623@qq.com

刘志鹏, 工程师, 主要研究方向为食品营养与质量安全。

E-mail: 714388520@qq.com