

液相微萃取-高效液相色谱法测定油脂中 1,4-特丁基对苯二酚

张立新*, 邹 蕾, 宋君威, 王小迪
(河南省产品质量监督检验院, 郑州 450000)

摘要: 目的 建立一种液相微萃取-高效液相色谱法测定油脂中 1,4-特丁基对苯二酚(t-butyl hydroquinone, TBHQ)的方法。**方法** 以 0.1 g 油脂为原料, 以 400 μ L 1,4-丁二醇作为样品前处理萃取剂, 旋涡萃取 2 min, 提取物采用高效液相色谱法(紫外检测)进行分析。**结果** 本方法线性关系良好, r^2 为 1; 加标回收率较高(96.00%~114.67%), 日内和日间测定精密度良好(小于 3%)。本方法应用于不同种类的食用油中 TBHQ 的测定时, 得到的测定结果与使用常规溶剂甲醇萃取前处理的结果相近。**结论** 该方法准确性高, 且效率高、时间短; 并且所需样品量小, 适合用于油脂中 TBHQ 的测定。

关键词: 抗氧化剂; 特丁基对苯二酚; 液相微萃取; 高效液相色谱法

Determination of 1,4-t-butyl hydroquinone in edible oils by liquid phase microextraction-high performance liquid chromatography

ZHANG Li-Xin*, ZHOU Lei, SONG Jun-Wei, WANG Xiao-Di

(Jewelry Inspection Center, Henan Provincial Quality Supervision and Inspection Institute, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method that determination of 1,4-t-butyl hydroquinone (TBHQ) in edible oils by liquid phase microextraction-high performance liquid chromatography. **Methods** Using 0.1 g of fat as raw material and 400 μ L of 1,4-TBHQ as sample pretreatment extractant, the mixture was extracted by vortexing for 2 min, and the extract was analyzed by high performance liquid chromatography (ultraviolet detector). **Results** This established method showed good linearity ($r^2=1$). The recoveries were in the range of 96.00%–114.67%, and the intra-day and inter-day precision were all less than 3.0%. When the method was applied to the determination of TBHQ in different kinds of edible oils, the obtained measurement results were similar to those obtained by the conventional solvent methanol extraction pretreatment. **Conclusion** The method has high accuracy, high efficiency and short time; and the required sample amount is small, which is suitable for the determination of TBHQ in fats and oils.

KEY WORDS: antioxidants; 1,4-t-butyl hydroquinone; liquid-liquid microextraction; high performance liquid chromatography

1 引言

食用油是人们日常生活中不可缺少的食品与营养物质的重要来源。大多数食用油富含不饱和脂肪酸, 在储存

和加工过程易受氧气、水、光、热等因素的影响, 品质易发生明显改变, 如不饱和脂肪酸含量下降、油脂发生氧化并产生醛、酮、及酸类等的小分子物质^[1]。这些物质会使油脂食用品质发生变化, 产生令人不愉快的味道, 其营养

*通讯作者: 张立新, 硕士, 工程师, 主要研究方向质量检验。Email: 791832788@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Li-Xin, Master, Engineer, Jewelry Inspection Center of Henan Provincial Quality Supervision and Inspection Institute, Zhengzhou 450000, China. E-mail: 791832788@qq.com

价值也会被破坏。为防止油脂氧化酸败, 通常在食用油脂中添加抗氧化剂。抗氧化剂通过防止油脂与空气因长时间接触发生氧化变质, 能够延缓食品的腐败, 达到延长保质期的效果。

食用油中所使用或含有的抗氧化剂, 可分为合成抗氧化剂和天然抗氧化剂。常用的合成抗氧化剂有特丁基对苯二酚(*t*-butyl hydroquinone, TBHQ)、丁基羟茴香醚(butylated hydroxyanisole, BHA)和 2, 6-二叔丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)等。常用的天然抗氧化剂有维生素 E、维生素 C 等。由于天然抗氧化剂价格较贵, 因此向食用油中添加的一般是合成抗氧化剂。

现行我国国家标准允许使用的合成抗氧化剂有 TBHQ、BHA 等, 其最大添加限量为 0.2 g/kg^[2]。过量使用合成抗氧化剂将影响人体健康, 也会影响食品安全。TBHQ 是食用油(尤其是大豆油和调和油)中一种最常用的合成抗氧化剂。其具有很强的抗氧化性, 比 BHA、BHT、维生素 E 等的抗氧化能力更强。因其良好的热稳定性而适宜添加到常见的食用油中。但据研究报告, TBHQ 对实验动物的胃有一些副作用, 如引发肿瘤、损伤 DNA 等^[3]。因此, TBHQ 的使用需要由政府有关部门来监管, 其不同国家或地区的使用规则也不尽相同。例如, 中国、美国等国家的食品中允许使用 TBHQ, 而欧盟和日本禁止在食品中使用^[4]。但是过量添加 TBHQ 等合成抗氧化剂在食品中有致畸形、致癌的风险^[5]。因此, 准确测定食用油中 TBHQ 对人体健康和食品安全至关重要。

用于检测食用油中抗氧化剂的分析方法有比色法、紫外-可见分光光度法、气相色谱法^[6]和高效液相色谱法^[7]等。薄层色谱法检测抗氧化剂只能大致定量, 比色法检测抗氧化剂只能检测油脂中的 BHT, 适用抗氧化剂种类有限^[8]。虽然气相色谱法应用广泛, 但其存在所需试剂多、操作难、成本高等问题^[9,10]。而高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)适用范围广、分离效率高、速度快、流动相可选择范围宽、灵敏度高、色谱柱可反复使用、安全等特点^[11]。

由于常规方法在进行高效液相色谱分析前, 需要使用甲醇等有毒溶剂进行萃取, 因此应用将无毒或低毒的溶剂(如离子液体等)是近年来研究的热点^[12-15]。本研究使用低毒溶剂对食用油中的 TBHQ 进行液相微萃取, 并采用高效液相色谱法进行分析, 以期分析检测油脂中的抗氧化剂 TBHQ 提供新的分析方法。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(2489 型紫外检测器)(美

国沃特世(Waters)公司); VM-T1 旋涡振荡器(上海泰坦科学仪器有限公司); TDL-80-2B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂); BSA224S 电子天平(赛多利斯仪器有限公司)。

大豆油(不含合成抗氧化剂)、菜籽油、玉米油、葵花籽油: 在当地超市购置; TBHQ(纯度 99.0%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 1,4-丁二醇、甘油、乙二醇、1,2-丙二醇、乳酸(分析纯, 科密欧化学试剂(天津)有限公司); 甲醇、正己烷(色谱纯, 国药试剂(上海)有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

准确称取 0.05 g TBHQ 于棕色容量瓶中, 用甲醇(色谱纯)溶解并定容至 100 mL, 制得浓度为 500 μg/mL 的 TBHQ 储备液, 置于 4 °C 冰箱中保存备用。分别移用不同体积的 TBHQ 储备液于容量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 制成浓度为 0、5、10、20、25、50、100、200 μg/mL 的标准溶液。混合均匀, 分别用 0.45 μm 有机滤膜过滤后取适量样, 进液相色谱仪分析。

2.2.2 油样的制备

准确称取 0.0500 g TBHQ 溶于 50 g 大豆油中, 振荡加以超声混匀, 确保 TBHQ 充分溶解在大豆油中, 配得 1000 mg/kg 的 TBHQ 油样, 将高浓度的 TBHQ 油样稀释到 100 mg/kg。

2.2.3 样品中 TBHQ 的萃取方法

甲醇萃取法: 参考 NY/T 1602-2008^[15]并加以改进。具体过程为: 准确称取 3.000 g 油样(精确至 0.001 g)于长试管中, 加入 8 mL 甲醇, 涡旋振荡 2 min, 4000 r/min 离心 2 min, 取出上层清液于 25 mL 容量瓶中, 残余物每次用 8 mL 甲醇萃取 2 次, 上层清液合并于容量瓶中, 用色谱甲醇定容后混合均匀, 用针管取出一定量将液体经 0.45 μm 滤膜过滤, 进行液相色谱分析。

多元醇液相微萃取法: 用具塞试管准确称取一定量油样(0.1 g), 加入一定量(如 400 μL)多元醇, 涡旋振荡一定时间, 然后将混合液转移至离心管, 在 4000 r/min 下离心 5 min, 用微量注射器取出多元醇相 100 μL 到 1 mL 容量瓶, 用甲醇定容后混合均匀, 用针管取出一定量将液体经 0.45 μm 滤膜过滤, 进行液相色谱分析。

所有实验均重复 3 次, 取平均值计算数据, 数据均用平均值±标准偏差表示。萃取效率根据下式计算:

$$\text{萃取效率} = (\text{实际测定浓度} / \text{理论添加浓度}) \times 100\%$$

2.2.4 高效液相色谱法检测 TBHQ

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。采用梯度洗脱, 流动相 A: 甲醇, B: 0.5% 乙酸水溶液, 其中 0~7 min, 40%A~80%A; 7~15 min, 80%A~100%A; 15~20 min, 100%A; 20~28 min, 100%A~40%A; 28~40 min, 40%A。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

按 2.2.1 方法配置不同浓度的 TBHQ 标准溶液。分别用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 各取 20 μL 进反相 HPLC 进行检测分析。TBHQ 的高效液相色谱图如图 1 所示, TBHQ 在 11.5 min 出峰, 且液相色谱峰形良好。以 TBHQ 标准品的浓度为横坐标, 不同浓度所对应的 HPLC 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果如图 2 所示。TBHQ 的线性回归方程为: $Y=19591X-34088$ ($r^2=1$), 说明 TBHQ 在 0.00~500.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

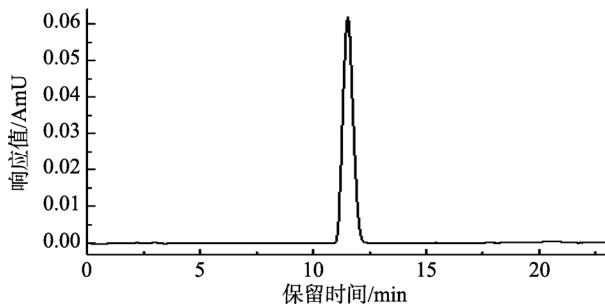


图1 TBHQ 标样的液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of TBHQ standard solution

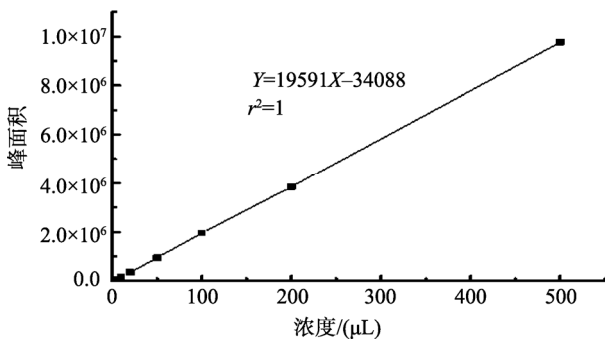


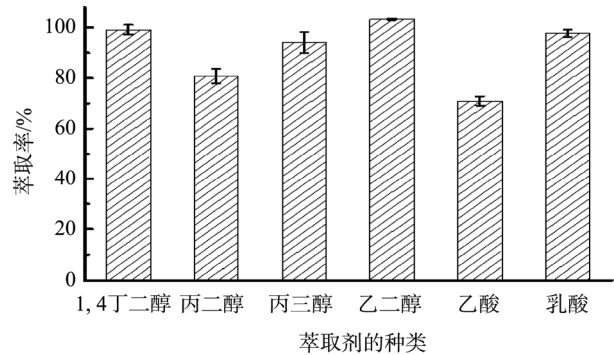
图2 TBHQ 的标准曲线

Fig.2 Standard curve of TBHQ

3.2 萃取溶剂的选择

在食品样品分析中, 液相微萃取是一种代替常规萃取的有效方法。液相微萃取技术作为一种样品前处理技术, 其主要的优点在于对萃取溶剂用量与样品用量要求低, 一般为 0.1~1 g; 而常规萃取方法需要萃取溶剂与样品量都为 2~50 g。

本研究选择了几种在食品工业上被认为是无毒的溶剂或添加剂, 如乙二醇(沸点 197 $^{\circ}\text{C}$)、丙二醇(沸点 188 $^{\circ}\text{C}$)、1, 4-丁二醇(沸点 228 $^{\circ}\text{C}$)、丙三醇(沸点 290 $^{\circ}\text{C}$)、乳酸等作为液相微萃取的溶剂, 且其不易挥发, 从而减小了萃取过程中误差的产生。将以上几种极性溶剂(400 μL)用于萃取大豆油样品(0.1 g)中的 TBHQ, 其萃取效率如图 3 所示。



注: 溶剂用量 400 μL , 正己烷用量 100 μL , 油用量 0.1 g, 萃取时间 2 min, 常温萃取。

图3 溶剂种类对萃取效率的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of solvent on the extraction efficiency ($n=3$)

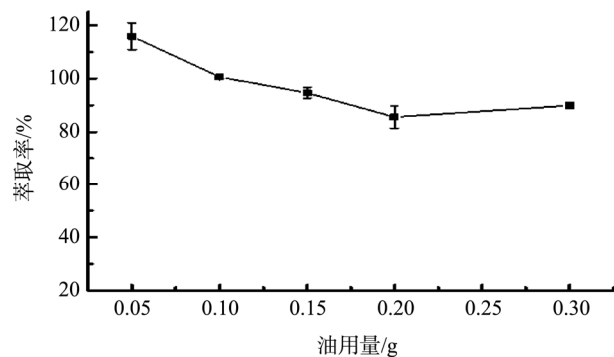
从图 3 可知, 6 种极性溶剂对 TBHQ 的萃取率都较高。在 6 种考察的溶剂中, 多元醇类的溶剂萃取效果较好, 萃取率均在 80% 以上。其中 1, 4-丁二醇对油样中 TBHQ 的萃取率达到 99.06%。而乙二醇的萃取结果超过了理论值 (100%), 说明其不适合用于液相微萃取。此外, 1, 4-丁二醇萃取的结果经 HPLC 检测, 其 HPLC 色谱图中 TBHQ 的峰形也好, 干扰较小。因此, 选择 1, 4-丁二醇作为油脂样品液相微萃取最佳的萃取剂。

3.3 萃取条件的选择

3.3.1 油样用量的优化

油样用量同样影响着油脂中抗氧化剂 TBHQ 的萃取效率。在确定 1, 4-丁二醇用量为 400 μL 条件下, 接下来对油样用量进行了优化试验。

图 4 是油样用量对萃取效率的影响。从图中可以看出, 油样由 0.05 g 增到 0.2 g 时, TBHQ 的萃取效率逐渐减小; 继续增加油样用量, 萃取效率趋于平稳。当油样用量为 0.05 g 时 TBHQ 萃取效率达 115%, 偏离真实值。因此, 为保证实验的准确度, 减少因油量过少、操作不便造成的测量误差, 油样选用 0.1 g 为最佳样品用量。



注: 实验条件: 溶剂用量 400 μL , 正己烷用量 100 μL , 萃取时间 2 min, 常温萃取。

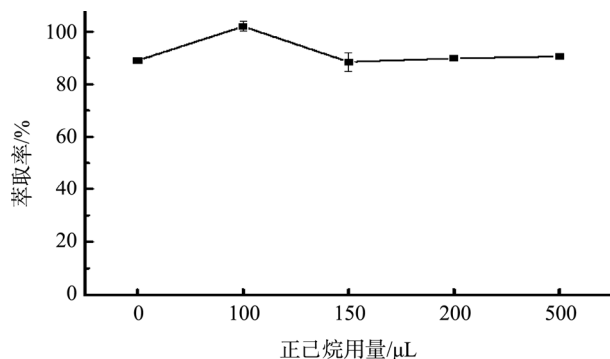
图4 样品用量对萃取效率的影响($n=3$)

Fig.4 Effect of solvent volume on the extraction efficiency ($n=3$)

3.3.2 正己烷用量的优化

通过实验发现, 单纯使用 1, 4-丁二醇做萃取剂萃取油样中的 TBHQ 时, 萃取效率不太高。分析原因, 可能是食用油在常温下有一定的黏度, 影响了萃取效果。因此考虑向其中加入非极性溶剂, 如正己烷, 可以适当调节萃取体系的黏度, 从而提高萃取效率。添加正己烷的用量对 TBHQ 萃取效率的影响如图 5 所示。

由图 5 可知, 不加正己烷时, TBHQ 的萃取效率为 88.14%。而加入 100 μL 正己烷后, TBHQ 的萃取效率由 88.14% 升到 101.99%。萃取效率有明显提高, 说明适量正己烷的加入对萃取产生有利影响。这可能是因为正己烷的加入降低了油脂样品的黏度。但加入过量正己烷导致萃取效率都有所降低。这是因为正己烷对 TBHQ 也有一定的溶解性, 正己烷用量增加, 导致丁二醇相中 TBHQ 的含量降低, 故 TBHQ 萃取效率降低。因此, 选择向油样添加 100 μL 正己烷为宜。



注: 实验条件: 溶剂 1, 4-丁二醇用量 400 μL , 油用量 0.1 g, 萃取时间 2 min)

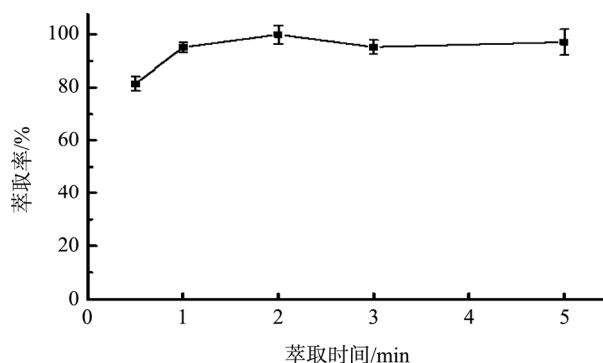
图 5 添加正己烷对萃取效率的影响

Fig.5 Effect of hexane on the extraction efficiency ($n=3$)

3.3.3 萃取时间的优化

萃取时间决定着萃取达到平衡的程度。在一定时间范围内, 延长萃取时间可以使萃取更加充分, 从而萃取效率更高。旋涡混合萃取是目前实验室进行高效萃取最有效的一种萃取方法, 其萃取一般在 3~10 min 内即能达到萃取平衡。因此, 对旋涡混合萃取的时间进行了优化, 其结果如图 6。从图中可以看出, 随着时间的增加, 油样中抗氧化剂 TBHQ 的萃取效率先增加后趋于平稳。当萃取达到平衡后, 延长对萃取效率没有影响。因此, 本研究选取的萃取

时间为 2 min, 萃取率高且时间短。



注: 实验条件: 1, 4-丁二醇用量 400 μL , 正己烷用量 100 μL , 油用量 0.1 g。

图 6 萃取时间对萃取效率的影响($n=3$)

Fig.6 Effect of extraction time on the extraction efficiency ($n=3$)

3.4 方法表征

将某一实际油样按照 2.2.3 所述方法进行检测, 重复 6 次测其日内重复性; 重复 5 d, 每天重复 3 次测其日间重复性。测定结果表明, TBHQ 日内精密度的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 1.31%, TBHQ 日间精密度的 RSD 为 2.88%。由此可得, TBHQ 测定方法的日内、日间稳定性都较好。

实验采用常用的规定方法, 以 3 倍信噪比来估算 TBHQ 的最低检出限, 10 倍的信噪比作为最低定量限。将 500.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TBHQ 标准储备液进行梯度稀释成不同浓度, 各取 10 μL 进反相 HPLC。得到的 TBHQ 最低检出限为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$; TBHQ 的最低定量限为 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

为了验证本方法的准确性, 进行了加标回收率实验。制备含不同浓度 TBHQ 的油样, 在优化的条件进行萃取, 根据标准曲线分别对 TBHQ 的加标回收率进行计算, 结果如表 1 所示。由表可以看出, TBHQ 的加标回收率的测定结果在 96%~114.67% 之间。这表明建立的方法准确性好, 适用于食用油中的抗氧化剂 TBHQ 的准确检测。

3.5 实际样品检测

为了进一步对该方法进行验证, 我们选用了 4 种不同的食用油 (如大豆油、菜油、玉米油等) 作为实际样品 (所购油样中不含 TBHQ, 实验向其中添加 50 mg/kg), 用建立的方法对 TBHQ 的含量进行了测定。其测定结果如表 2 所示。

表 1 油脂样品添加 TBHQ 的回收实验测定结果($n=3$)

Table 1 Recovery of TBHQ in oil samples ($n=3$)

样品浓度/(mg/kg)	加标浓度 20/(mg/kg)	加标浓度 50/(mg/kg)	加标浓度 100/(mg/kg)	回收率/%	
TBHQ	95.72	127.32 \pm 5.24	151.08 \pm 4.01	189.58 \pm 1.68	96.00~114.67%

表2 不同油脂样品添加TBHQ的实验测定结果($n=3$)Table 2 Real sample analysis using different extraction methods ($n=3$)

样品	丁二醇萃取/(mg/kg)	甲醇萃取/(mg/kg)
大豆油(转基因)	50.85±0.85	49.32±9.32
大豆油(非转基因)	50.55±0.50	50.12±0.15
菜籽油	50.95±0.95	49.65±9.65
玉米油	49.92±9.92	50.05±0.05
葵花籽油	49.77±9.77	49.25±9.25

由表2可知,用本方法测得的结果与使用甲醇萃取的常规方法(国标推荐方法)结果基本一致。另外,用丁二醇萃取方法所需的油样量(0.1 g)和萃取溶剂的量(400 μ L)比用现行国标方法中甲醇萃取法(油样量3 g,甲醇25 mL)更少,因此本方法具有一定的创新性和可操作性。此外,本方法所用试剂与设备在一般食品分析实验室都能够满足。综上所述,采用丁二醇液相微萃取的方法是一种萃取效率高、环境友好型的萃取技术。

4 结论

本研究选择1,4-丁二醇作为样品前处理的萃取剂,研究了其对食用油中合成抗氧化剂TBHQ的萃取效果。研究表明400 μ L 1,4-丁二醇作为萃取剂,旋涡振荡2 min、油样用量0.1 g、正己烷用量为100 μ L;在此条件下,TBHQ萃取效率高达100%。基于1,4-丁二醇液相微萃取-高效液相色谱-方法,用于食用油脂样品中TBHQ的检测,线性关系良好, r^2 大于0.9999;加标回收率较高,日内和日间测定精密度良好(小于3%)。最后将建立的分析方法应用于不同种类的食用油中TBHQ的测定,得到的结果与使用常规溶剂甲醇萃取的结果相近,表明该法真实可靠。该方法真实可靠,效率高、时间短;并且所需样品量小。

参考文献

- [1] 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 oil by GC-MS [J]. J Anal Sci, 2007, 23(2): 169-172.
- [2] 王华丽,骆鹏杰,张霁月,等.《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》(GB 2760-2011)标准修订[J].中国食品添加剂,2013,23(3):67-71.
Wang HL, Luo PJ, Zhang JY, et al. Revision on the National food safety standard-standards for uses of food additives (GB 2760-2011) [J]. China Food Addit, 2013, 23(3): 67-71.
- [3] Eskandani M, Hamishehkar H, Jafar END. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive [J]. Food Chem, 2014, (153): 315-320.
- [4] Liu W, Zhang K, Yu J, et al. A green ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of TBHQ in edible oils [J]. Food Anal Method, 2017, 10(9):

1-7.

- [5] 吴丽华.凝胶色谱-气相色谱法检测食用植物油中抗氧化剂BHA、BHT和TBHQ[J].粮食与食品工业,2015,22(3):89-93.
Wu LH. Determination on antioxidant BHA, BHT and TBHQ in edible vegetable oil by GC based on GPC purification [J]. Cereal Food Ind, 2015, 22(3): 89-93.
- [6] 张凤妹,朱炳祺,金绍强,等.气相色谱法同时测定油脂食品中抗氧化剂BHA、BHT、TBHQ的含量[J].湖北农业科学,2017,56(8):1545-1546.
Zhang FM, Zhu BQ, Jin SQ, et al. Simultaneous determination of BHA, BHT and TBHQ in oil foods by gas chromatography [J]. Hubei Agric Sci, 2017, 56(8): 1545-1546.
- [7] 郝媛媛,丁轶聪,张岩岩. HPLC-UV法测定食品中抗氧化剂特丁基对苯二酚(TBHQ)[J].中国卫生检验杂志,2010,20(4):748-749.
Hao YY, Ding YC, Zhang YY. Determination of TBHQ in food with HPLC-UV [J]. Chin J Health Lab Technol, 2010, 20(4): 748-749.
- [8] 李登红,粟晖,刘柳,等.紫外分光光度法结合向量-子空间夹角判据分析猪油中3种抗氧化剂的含量[J].食品科技,2016,(5):126-130.
Li DH, Su H, Liu L, et al. Analysis of three antioxidants in lard by ultraviolet spectrophotometry and vector subspace angle criterion [J]. Food Sci Technol, 2016, (5): 126-130.
- [9] 尹淑涛,薛文通,张惠,等.油脂中合成抗氧化剂检测技术的研究进展[J].中国油脂,2009,34(6):75-79.
Yin ST, Xue WT, Zhang H, et al. Research progress on the detection of synthetic antioxidants in oils and fats [J]. China Oil Fat, 2009, 34(6): 75-79.
- [10] 许国旺.现代实用气相色谱法[M].北京:化学工业出版社,2004.
Xu GW. Modern practical gas chromatography [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [11] 张璐,易敏之,吕红,等.高效液相色谱法在食品安全检测中的应用[J].江西中医药大学学报,2011,23(6):60-62.
Zhang L, Yi MZ, Lv H, et al. The applications of high phase liquid chromatography in the food safety detection [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2011, 23(6): 60-62.
- [12] Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications [J]. Chem Rev, 2014, 114(21): 11060-11082.
- [13] Hadi NA, Mei HN, Choo YM, et al. Performance of choline-based deep eutectic solvents in the extraction of tocopherols from crude palm oil [J]. J Am Oil Chem Soc, 2015, 92(11-12): 1709-1716.
- [14] Oliveira FS, Pereira AB, Rebelo LPN, et al. Deep eutectic solvents as extraction media for azeotropic mixtures [J]. Green Chem, 2013, 15(5): 1326-1330.
- [15] 张康迪.基于低共熔溶剂的液相微萃取-高效液相色谱法测定大豆油中的TBHQ[J].河南工业大学学报(自然科学版),2017,38(5):32-36.
Zhang KD. Deep eutectic solvent based solvent microextraction-hplc method for determination of TBHQ in soybean oil [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2017, 38(5): 32-36.

(责任编辑:陈雨薇)

作者简介



张立新,硕士,工程师,主要研究方向
质量检验。

E-mail: 791832788@qq.com