

气相色谱法同时检测含油脂食品中 BHA、BHT 和 TBHQ 的改进

Application of gas chromatography in the determination of antioxidants BHA, BHT and TBHQ in foods abstract

王萍 郭金英 任国艳 崔国庭 吴影

WANG Ping GUO Jin-ying REN Guo-yan CUI Guo-ting WU Ying

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023)

(College of Food & Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要: 选用含油脂样品, 甲醇提取, 采用气相色谱法检测食品中的 BHA、BHT、TBHQ 指标。结果发现, 在浓度为 0.01~0.20 mg/mL 时, BHA、BHT 与 TBHQ 均呈现出较好的线性关系, 其相关系数 r 均 >0.999 , 检出限均 $<0.5 \mu\text{g/mL}$; 检测方法回收率符合实验室测定要求, 其标准偏差为 1.07~3.10, 相对标准差均 $<5\%$ 。

关键词: 气相色谱法; 食品; BHA; BHT; TBHQ

Abstract: Oil samples were extracted with methanol, and BHA, BHT and TBHQ in food were detected by gas chromatography. Result: When the concentration of BHA, BHT and TBHQ was in the range of 0.01~0.20 mg/mL, all of the correlation coefficients of BHA, BHT and TBHQ had good linear relation with $r > 0.999$, with the detection limits $< 0.5 \mu\text{g/mL}$. The recovery rate of the method met the requirements of laboratory determination, and the standard deviation was between 1.07~3.10 and the relative standard deviation was less than 5%.

Keywords: Gas chromatography; food; BHA; BHT; TBHQ

含油脂食品或食用油脂若长期保存在不适宜的环境下, 油脂会与空气发生反应, 产生一系列化学变化分解出氧化物及过氧化物, 常见的有酮、醛、低级脂肪酸等^[1-3], 这种现象被称为酸败。为了防止食品发生酸败, 延长食品的保质期, 需要加入适量抗氧化剂, 其中 BHA、BHT、TBHQ 是最为常见的 3 种酚类合成抗氧化剂, 能够延缓食品变质, 使食品贮存期延长, 有利于维护食品的稳定性和安全性, 可单独使用也可以混合使用^[4-5]。然而, 抗氧化剂食品摄入过量也会对人体产生

一定的危害, 损害肝、肾、脾。因此, 中国在食品加工行业抗氧化剂使用量都有明确的规定, GB 2760—2011《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中对 BHA、BHT 和 TBHQ 都限量使用, 在油及油脂食品中的限量均不得高于 0.2 g/kg^[6]。

检测含油脂食品中的抗氧化剂存在基底干扰较多、检测前处理复杂、检测精度不高的难题。传统气相色谱法测定食品中抗氧化剂程序是先将油脂溶解于己烷, 用乙腈和 80% 乙醇混合溶液萃取, 然后除去溶剂, 经硅烷化处理, 再进行检测^[7]。如果以 DC-200 为固定相, 则 BHA 出峰在前, BHT 在后。若以极性大 Carbo wax 20M 为固定相, 则出峰顺序相反。硅烷化抗氧化剂在气相色谱图上出峰顺序依次为: BHA、TBHQ、BHT、PG。该方法存在步骤烦琐、耗费试剂多、检测时间长等缺点, 样品量大时难以满足工作需要。因此部分研究者^[8]对该法不断进行改进, 改进方向主要是在油样预处理程序方面, 进一步提高了食品检测灵敏度及质量, 但操作比较复杂。

本研究拟对 GB/T 23373—2009《食品中抗氧化剂丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)与特丁基对苯二酚(TBHQ)的测定》的气相色谱法进行改进, 旨在建立一种简便、快捷、准确的含油脂食品中抗氧化剂的检测方法。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

甲醇: 色谱纯, 北京迪玛欧泰科技发展有限公司;

标准品 BHA (MANHAGE, 批号: 160622, 含量: 99.4%)、BHT (MANHAGE, 批号: 160713, 含量: 100.0%)、TBHQ (Stanford Analytical Chemicals 批号: AP160718-12 含量: 99.32%); 郑州富太化工产品有限公司。

1.2 试验设备与仪器

气相色谱仪: 安捷伦 7890B 型, 联和层析贸易(上海)有

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究项目(编号: 15A180035)

作者简介: 王萍(1982—), 女, 河南科技大学讲师, 博士。

E-mail: weizhiguo97@163.com

收稿日期: 2018-09-13

限公司；

色谱柱：安捷伦 HP-5MS 毛细管柱，规格为 $30\text{ m} \times 0.32\text{ }\mu\text{m} \times 0.25\text{ mm}$ ，上海楚定分析仪器有限公司；

超声波清洗器：SYV-22-600DTD 型，郑州生元仪器有限公司；

离心机：TDZ5-WS 型，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；

漩涡混合器：SK-1 型，常州丹瑞实验仪器设备有限公司；

旋转蒸发器：RE-5299 型，上海羌强仪器设备有限公司；

氮吹仪：NV24A-II 型，天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件 试验期间需要对色谱条件进行良好的控制，主要包括以下几个要素：① 柱温：以 $80\sim 250\text{ }^\circ\text{C}$ 为宜，以 $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 起始，逐渐加快升温速率，20 min 达到 $250\text{ }^\circ\text{C}$ ；② 汽化室保持适宜的温度为 $230\text{ }^\circ\text{C}$ ；③ 检测器温度设置为 $250\text{ }^\circ\text{C}$ ；④ 对柱前压进行合理控制，以 $1\text{ }260\text{ Ps}$ 为宜；⑤ 分流比控制在 $5:1$ ；⑥ 设置进样量 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ ；⑦ 氮气吹入速率以 $30\text{ mL}/\text{min}$ 为宜，氢气速率以 $40\text{ mL}/\text{min}$ 为宜；⑧ 空气速率为 $300\text{ mL}/\text{min}$ 。

1.3.2 标准溶液配制 分别精密称取 0.05 g BHA、BHT、TBHQ，置于 50 mL 容量瓶中，采用甲醇溶解混合物，经过定容处理后，充分摇匀，混合标准储备液配置浓度以 $1.0\text{ mg}/\text{mL}$ 为宜。然后分别吸取 $0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00\text{ mL}$ 储备液，分别置于 10 mL 容量瓶中，采用甲醇定容，充分摇匀。

1.3.3 前处理操作 针对含油脂加工食品样品，则对其中最具有代表性的样品进行称取，以 10 g 为宜，置于 100 mL 具塞三角瓶中，在其中加入 $30\sim 50\text{ mL}$ 甲醇，经过 30 min 超声提取，采用快速滤过纸进行过滤处理，并置于 150 mL 烧瓶中。采用适量甲醇对残渣进行洗涤，反复 $2\sim 3$ 次，合并滤液置于烧瓶。在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行水浴，经过减压浓缩成为 $1\sim 2\text{ mL}$ 。置于 10 mL 刻度离心管，用甲醇洗涤 3 次烧瓶，甲醇每次用量 $2\sim 3\text{ mL}$ ，然后再次合并洗涤液置于 10 mL 刻度离心管，将温度设置为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ ，氮吹直至 5.0 mL ，选择 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤，留作气相色谱分析。

1.3.4 数据处理

(1) 检验结果线性关系和检出限：检测 5 种不同含量下 BHA、BHT 及 TBHQ 混合标准液含量，横纵坐标分别采用峰面积、浓度值表示，并绘制出标准曲线，根据色谱峰面积 Y 的数据计算出其所对应的组分含量 X ，由工作站对相关系数进行计算，并获得线性回归方程。

(2) 回收率和相对标准偏差：精密称取 2.0 g 阴性样品，

分别加入到 $0.1, 0.5\text{ mL}$ 浓度为 $1.0\text{ mg}/\text{mL}$ 的混合标准溶液中，充分混合均匀，测定方法如 1.3.3 前处理步骤，测试测量结果标准偏差。

2 结果与分析

2.1 样品及样品气相色谱图

样品及样品气相色谱图见图 1。从图 1 中可以看出，BHA、BHT 以及 TBHQ 在 HP-5 色谱柱和 DB-35 色谱柱上能够实现完全分离。

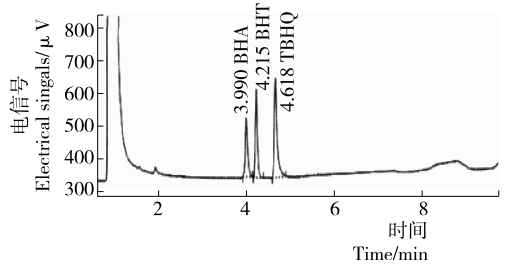


图 1 样品及样品气相色谱图

Figure 1 Gas Chromatography of Samples and Samples

2.2 检验结果线性关系和检出限

本研究所得检验结果线性关系和检出限具体见表 1。由表 1 可知，在 $0.01\sim 0.20\text{ mg}/\text{mL}$ 时，BHA、BHT 与 TBHQ 均呈现出较好的线性关系，其相关系数 r 均 > 0.999 ，检出限均 $< 0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 。若油脂样品最大称量 2.0 g ，最终定容为 5.0 mL ，能够获得 BHA 最低检出度为 $0.75\text{ mg}/\text{kg}$ 、BHT 为 $0.75\text{ mg}/\text{kg}$ 、TBHQ 为 $1.25\text{ mg}/\text{kg}$ ，其检出限均显著高于国标方法(BHA 为 $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ 、BHT 为 $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ 、TBHQ 为 $0.5\text{ mg}/\text{kg}$)^[6]。

2.3 回收率和相对标准偏差

本研究所得回收率和相对标准偏差具体如表 2 所示。由表 2 可知，气相色谱法加标回收率为 $93.6\%\sim 99.1\%$ ，以往色谱分析规定回收率为 $80\%\sim 120\%$ ，本检测方法回收率符合实验室测定要求，其标准偏差为 $1.07\%\sim 3.10\%$ ，相对标准偏差均 $< 5\%$ ，提示其具有良好的平行性。说明该检测方法精度、准确度均较好，能够用于现实食品检测。

3 结论

本研究采用气相色谱法对食品中抗氧化剂 BHA、BHT 及 TBHQ 进行检测，首先用甲醇进行提取，减少了对试剂的消耗，所用的分析时间较短。该方法具有较好的平行性，操作简单、结果准确，改进后的气相色谱法的加标回收率为 $93.6\%\sim 99.1\%$ ，回收率符合实验室测定要求(回收率为

表 1 线性关系及检出限结果

Table 1 Linear relation and the result of detection limit

抗氧化剂	线性方程	相关系数	检出限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
BHA	$Y=2.179\ 273\ 5e-006x+1.200\ 817e-006$	0.999 3	0.30
BHT	$Y=1.839\ 273\ 8e-006x-14.462\ 84e-005$	0.999 5	0.30
TBHQ	$Y=2.115\ 937\ 4e-006x+3.929\ 474e-003$	0.999 4	0.50

表 2 样品测定回收率及相对标准偏差

Table 2 Sample recoveries and relative standard deviation

抗氧化剂	实测浓度值/ (mg · mL ⁻¹)	实测含量/ mg	理论添加量/ mg	回收率/ %	RSD/ %
BHA	0.019 2	0.096 7	0.100	96.6	1.07
	0.095 3	0.479 2	0.500	95.6	1.82
BHT	0.018 6	0.094 6	0.100	94.5	2.16
	0.093 2	0.468 2	0.500	93.6	1.78
TBHQ	0.019 7	0.099 2	0.100	99.1	2.38
	0.096 5	0.484 7	0.500	96.8	3.10

80%~120%^[9]);其标准偏差为 1.07%~3.10%,相对标准偏差均<5%,提示具有良好的平行性;所得相对标准偏差均在 5%以下,且线性关系分析显示在 0.01~0.20 mg/mL 范围内相关系数均>0.999,说明该方法可满足实验室检测食品中抗氧化剂 BHA、BHT 及 TBHQ 的要求。总之,在食品中 BHA、BHT、TBHQ 指标检测中,气相色谱法具有重要应用价值,同时操作简单、回收率高,值得推广。

参考文献

- [1] 王朝杰,李倩,杨天明.气相色谱法测定食品中叔丁基对苯二酚定量方法的探讨[J].浙江农业科学,2017,58(11):2 026-2 028,2 033.
- [2] 王澍,周玮婧,江小明.气相色谱法检测食品中的抗氧化剂 BHA、BHT 和 TBHQ 及不确定度评定[J].粮食与油脂,2017,30(10):90-92.
- [3] 邹哲祥,李耀平,林艳,等.气相色谱法测定食品包装材料中五种抗氧化剂迁移量[J].分析试验室,2017,36(9):1 067-1 070.
- [4] 李东旭.凝胶渗透色谱-气相色谱法测定食品中 BHA、BHT[J].

食品研究与开发,2016,37(15):186-189.

- [5] 张勋,刘韬,吴连鹏,等.高效液相色谱-串联质谱法测定多种食品中 7 种酚类抗氧化剂和对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J].食品与发酵工业,2016,42(11):206-211.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 23373-2009 食品中抗氧化剂丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基对甲酚(BHT)与特丁基对苯二酚(TBHQ)的测定[S].北京:中国标准出版社,2009:12-13.
- [7] TRINDADE G, APARECIDO M, CARAMI T, et al. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes[J]. Fuel, 2013, 105(1):306-313.
- [8] 林春晓,付斌,叶泽群,等.气相色谱法测定食用油脂中 BHA、BHT 样品前处理方法研究[J].中国热带医学,2005,5(4):812-814.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局. 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].北京:中国标准出版社,2003:5.

(上接第 63 页)

- [6] IKEDA T, TAMATE N, YAMAGUCHI K, et al. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(5):2 793-2 795.
- [7] TKACIKOVA L, TESHAYE A. Detection of the genes for Staphylococcus aureus enterotoxin by PCR[J]. Acta Veterinaria Brno, 2003, 72(4):627-630.
- [8] NOVICK R P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of Staphylococcus aureus[J]. Plasmid, 2003, 49(2):93.
- [9] CHIANG Yu-cheng, FAN Chih-ming, LIAO Wan-wen, et al. Real-time PCR detection of Staphylococcus aureus in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene htrA sequence[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(12):2 855.
- [10] HENNEKINNE J A, BUYSER M L D, DRAGACCI S. Staphylococcus aureus, and its food poisoning toxins; characterization and outbreak investigation[J]. Fems Microbiology Reviews, 2012, 36(4):815-836.
- [11] ZELADA-GUILLÉN G A, BLONDEAU P, RIU J, et al.

Label-free detection of Staphylococcus aureus, in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 31(1):226-232.

- [12] PANG Peng-fei, ZHANG Yan-li, GE Shu-tian, et al. Determination of glucose using bienzyme layered assembly magnetoelastic sensing device[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 136(2):310-314.
- [13] XIE Hong, CHAI Y, HORIKAWA S, et al. A pulsed wave excitation system to characterize micron-scale magnetoelastic biosensors[J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2014, 205:143-149.
- [14] LIN Hai-lan, LU Qing-zhu, GE Shu-tian, et al. Detection of pathogen Escherichia coli O₁₅₇:H₇ with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosanmodified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 147(1):343-349.
- [15] KARUPPUSWAMI S, ARANGALI H, CHAHAL P. A Hybrid Electrical-Mechanical Wireless Magnetoelastic Sensor for Liquid Sample Measurements[C]// IEEE, Electronic Components and Technology Conference. [S. l.]: IEEE, 2016:2 535-2 540.