

HPTLC - DPPH 显色 - 像素分析快速测定酚类 抗氧化剂:以食用油和烘焙食品中 TBHQ 为例

卫晓¹, 席兴军², 李慧³, 王小三¹, 黄丹菲⁴, 徐学明¹, 陈启飞¹, 黄晓倩¹, 陈益胜¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 中国标准化研究院, 北京 100191; 3. 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; 4. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

摘要:目前, 酚类抗氧化剂 TBHQ 的常用检测方法存在前处理烦琐、耗时长、单次只能测定一个样品的问题, 因此亟需建立一种高通量、快速准确的检测方法。为此, 将高效薄层色谱(HPTLC)分离与 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)还原变色反应、图像像素定量分析相结合, 建立了一种快速筛检酚类抗氧化剂 TBHQ 的方法。在此基础上, 以食用油、面包和蛋糕为代表性样品, 验证所建方法的实际应用性能。结果显示: 所建方法检测 TBHQ 的检测限为 70 ng/zone (35 mg/kg), 定量限为 140 ng/zone (70 mg/kg), 定量限低于 GB 2760—2014 规定的使用限量(200 mg/kg); 通过对比分析, 样品提取物中共存的背景基质对目标物定量的干扰可以忽略, 证明了该方法具有良好的选择性; 目标物在 150~550 ng/zone 范围内表现出良好的线性($R^2=0.9892$); 多次平行($n=3$)测试和国标规定使用限量水平附近的加标回收率测试结果证明了该方法具有较好的精密度和准确度。综上, 该方法具有基质耐受性强、定量准确、简便可靠且分析通量大等优点, 特别适合粮油食品中各种抗氧化剂的快速定量筛查, 具有凝炼成为相关领域国家标准的潜力和价值。

关键词: HPTLC; DPPH; TBHQ; 粮油食品

中图分类号: TS207; O657

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)03-0105-06

HPTLC - DPPH colorimetric - bioautographic image quantification of phenolic antioxidant: taking TBHQ in edible oil and baking foods as an example

WEI Xiao¹, XI Xingjun², LI Hui³, WANG Xiaosan¹, HUANG Danfei⁴,
XU Xueming¹, CHEN Qifei¹, HUANG Xiaoqian¹, CHEN Yisheng¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. China National Institute of Standardization, Beijing 100191, China; 3. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; 4. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: At present, the common detection methods of phenolic antioxidant TBHQ have the problems of cumbersome pretreatment, long time-consuming and can only determine one sample at a time. Therefore, it is urgent to establish a high-throughput, fast and accurate detection method. A rapid method for screening phenolic antioxidant TBHQ was established by combining high performance thin

layer chromatography (HPTLC) separation with reduction discoloration reaction of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and quantitative analysis of image pixels. On this basis, edible oil, bread and cake were taken as representative samples to verify the practical application performance of the proposed method. The results showed that the detection limit of the established

收稿日期: 2021-04-12; 修回日期: 2021-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(21804058); 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室开放基金项目(SKLF-KF-202001)

作者简介: 卫晓(1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全(E-mail) a6190111085@163.com。

通信作者: 陈益胜, 副教授, 博士(E-mail) yschen@yeah.net; 席兴军, 研究员, 博士(E-mail) xixj@cnis.ac.cn。

method to detect TBHQ was 70 ng/zone (35 mg/kg), the limit of quantification was 140 ng/zone (70 mg/kg), and the limit of quantification was lower than the limit of use (200 mg/kg) specified in GB 2760-2014. Through comparative analysis, the interference of the background matrix coexisting in the sample extract on the target quantity could be ignored, which proved that the method had good selectivity. The target showed good linearity in the range of 150-550 ng/zone ($R^2 = 0.9892$). Secondly, several parallel tests ($n = 3$) and the test results of spiked recovery near the specified limit level of national standard proved that the method had good precision and accuracy. In summary, this method has the advantages of strong matrix tolerance, accurate quantification, simplicity and reliability, and large analytical flux. Therefore, it is particularly suitable for rapid quantitative screening of various antioxidant additives in cereal and oil food, and has the potential and value of becoming a national standard in related fields.

Key words: HPTLC; DPPH; TBHQ; cereal and oil food

自由基链式反应引起的油脂氧化是造成食用油以及面包、蛋糕等富油脂食品在加工储藏过程中品质劣变的主要原因之一,其除了对感官产生严重负面影响的酸败气味外,氧化过程中产生的副产物(如醛和酮)具有潜在的致癌和致畸变毒性,对人体健康危害极大。为了抑制油脂氧化,延长货架期,通常会向油脂和食品配料中添加一定量的抗氧化剂。值得注意的是,大量毒理学研究结果表明过量的酚类抗氧化剂可能对人体健康有严重的负面作用。例如:Schilderman 等^[1]研究发现,丁基羟基茴香醚(BHA)及其醌代谢产物在人体细胞内代谢过程中产生的氧化应激可能是 BHA 毒性和致癌性所必需的遗传和细胞损伤的原因;高剂量叔丁基对苯二酚(TBHQ)会导致实验动物产生胃肿瘤前兆和 DNA 损伤^[2-3];高浓度的 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)可作为动物组织中肿瘤的诱发剂或促进剂,并且具有一定的致癌性^[4]。在现有毒理学研究数据的基础上,欧盟食品安全部发布了一系列法规(Directive 95/2/EC, 94/35/EC 以及 2006/52/EC)限制酚类抗氧化剂的滥用,我国 GB 2760-2014 也对酚类抗氧化剂的使用限量(≤ 200 mg/kg)和应用范围有严格的规定。

目前,酚类抗氧化剂的测定方法有很多,其中最常用的是高效液相色谱^[5-6]、气相色谱^[7-8]等柱色谱法,尽管这些方法灵敏度和准确度高,但对样品前处理要求较高,并且测定时间长,单次只能测定单一样品,无法实现大量样品的快速筛检。相反,仪器化的高效薄层色谱法(High performance thin layer chromatography, HPTLC)具有前处理简单、高通量、兼容性好、快速准确的特点,是一种理想的替代方法。此外,HPTLC-DPPH 联用法是酚类抗氧化剂

检测中极有潜力的一种简便的分析方法。Rocamora 等^[9]通过 HPTLC 联合微量化学(DPPH、对茴香醛和氯化铁)衍生化或生物化学(α -淀粉酶、乙酰胆碱酯酶)衍生化快速评估了成分高度复杂的几种植物精油的抗氧化活性、多酚含量和 AChE 抑制活性。Ibrahim 等^[10]将 HPTLC 色谱板用 Folin-Ciocalteu 试剂衍生后联用 DPPH 分析法成功应用于测定苜蓿种子萌发 11 d 期间多酚含量与自由基清除能力的相关性,并通过比较 3 种不同的图像分析软件确定采用 Image J 软件进行图像的定量分析,其在精密性、准确度和灵敏度方面有着较明显的优势。

在前期的研究中,我们曾提出了以 HPTLC 为平台,结合光密度扫描仪对 DPPH 显色结果进行扫描定量分析的方法^[11-12],并将其纳入国家标准(计划号:20205075-T-424)中。不过这一方法在实际应用中遇到了仪器(光密度扫描仪)价格昂贵和通用性差的问题。使用数码相机对 HPTLC 结果进行数字化成像是其他色谱工具所不具备的独特优势,这一分析方法不仅为分析者提供了关于色谱分离结果最直观的视觉印象,也使得基于像素灰度分析定量替代昂贵的光密度扫描仪成为可能。目前,很多专业的图像分析软件不断被应用到这一领域,其中 Image J 是一个基于 java 的公共的专业图像处理软件,该软件不仅可以免费使用,并且操作简便、功能齐全、兼容性强、可编程,因此是用于 HPTLC 图像像素分析的理想工具。

本文创新性地建立了高效准确检测食用油、烘焙食品中抗氧化剂 TBHQ 的方法,解决了酚类抗氧化剂常规检测方法存在的问题,并且使用图像数字化处理软件 Image J 代替衍生硅胶板常用的 HPTLC

定量搭配仪器光密度扫描仪,达到显著的经济节约目的,为粮油食品中各种抗氧化剂的快速定量筛查提供了方法依据,可推动相关快速筛检领域的发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

TBHQ 标准品(纯度 >99%,分析纯),中国上海阿拉丁公司;TLCF254 硅胶板(分析型,序列号 HX61210829,规格 10 cm × 20 cm),德国 Merck 公司;面包、蛋糕(经实验测试确定未添加 TBHQ),江南大学忆江南糕点房;稻米油、大豆油(经实验测定确定未添加 TBHQ),江南大学国家工程实验室提供。

1.1.2 仪器与设备

MB104E 型电子天平,瑞士 Mettler - Toledo 公司;ChromaSpray I 型点样仪,自制;ADC - 2 型全自动 HPTLC 展开仪、TLC - scanner 3 薄层色谱扫描仪,瑞士 CAMAG 公司;DD70 型 HPTLC 成像仪,德国 Biostep 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

精确称取(10.0 ± 0.1) mg TBHQ 标准品,溶于甲醇并定容至 10 mL,得到 1 mg/mL TBHQ 标准储备液,置于棕色容量瓶中,在 4 °C 冰箱中恒温避光保藏,保质期 1 周。准确吸取 1 mL TBHQ 标准储备液,与 9 mL 甲醇混合,得到 0.1 mg/mL TBHQ 标准溶液,需用现配。

1.2.2 样品的制备

称取 1 g 面包或蛋糕样品,与 5 mL 乙醇混合,将混合物在涡旋混匀器上振荡 1 min,然后以 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,用注射器过 0.45 μm 纤维素滤膜去除其中的固体微粒,备用。

1.2.3 硅胶板预洗

实验中使用的所有硅胶板,使用前均需进行预洗前处理。取 10 cm × 20 cm 的硅胶板放于 ADC - 2 型全自动 HPTLC 展开缸中,之后将 10 mL 色谱级甲醇从仪器上部两侧槽中注入展开缸,以其作为流动相进行展开预洗,展开至硅胶板顶端后取出,最后用薄层加热器在 120 °C 下干燥 20 min,降至室温后,用锡纸包装并保存于密封袋中备用。

1.2.4 TBHQ 的检测

1.2.4.1 HPTLC 分离

为了获得定量且可控的点样结果,样品溶液和标准溶液都通过薄层点样仪在 0.5 MPa 氮气(载

气)的协助下以条带状吹扫到硅胶板上。具体参数:条带宽度 6 mm,距离硅胶板底边 8 mm,进样速度 100 μL/s,预排体积 0.2 μL。第 1 个条带中心距离硅胶板左边缘 15 mm,所有条带间距通过软件自动计算得出。点样结束后,将原点区域于 50 °C 干燥 1 min 以除去残留溶剂。点有样品的硅胶板在全自动 HPTLC 展开仪中进行色谱分离。色谱分离条件:相对湿度控制时间 5 min,硅胶板预平衡时间 10 min,流动相为乙酸乙酯 - 氯仿 - 无水乙醚(体积比 1:8:1),展开距离 80 mm。待流动相前沿到达预定高度,展开过程自动停止。此后,将硅胶板取出,放在 50 °C 薄层加热器上烘烤 3 min,使得残留在硅胶板上的流动相溶剂挥发。

1.2.4.2 DPPH 还原变色反应和成像

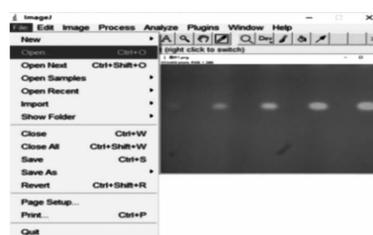
将完成色谱分离后的硅胶板通过自动浸渍装置浸入 DPPH 衍生液中,移动速度 3 mm/s,停留时间 3 s。然后将蘸有 DPPH 衍生液的硅胶板置于避光处反应 20 min。当硅胶板的红棕色背景出现明显的浅黄色抗氧化剂斑点后,使用配备佳能 EOS 700D 相机的成像系统对衍生后的硅胶板进行成像记录,相机参数设定为白光底部透射光源,自动对焦和校正。

1.2.4.3 光密度扫描定量分析

拍照成像后,使用薄层色谱扫描仪进行光密度扫描定量,扫描参数设置如下:吸光模式,氙灯和钨灯,激发波长 252 nm,光栅 3.00 mm × 0.30 mm (Micro),扫描速度 20 mm/s,分辨率 100 μm/step。数据采集和处理均使用 Wincats 软件(1.4.4 版)。

1.2.4.4 Image J 图像分析软件定量

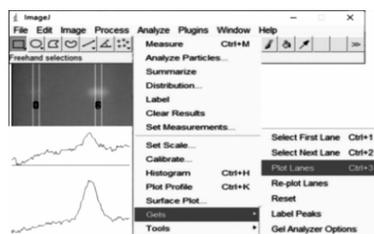
拍照成像后,用 Image J 软件打开所得图像,将所需的轨道由“矩形”选择工具勾画出来。轨道宽度应进行调整,以保持均匀的带厚度。通过使用“Analyze”下拉菜单,然后选择“Gels”,最后选择“Plot lanes”选项来生成斑点线条轮廓图。使用“Straight line”选择工具绘制所需峰的基线。为每个峰定义封闭区域后,使用“Wand tool”测量峰面积。Image J 数字化图片处理流程如图 1 所示。计算出峰面积与 TBHQ 浓度之间的线性关系式,进一步计算出样品中 TBHQ 的含量。



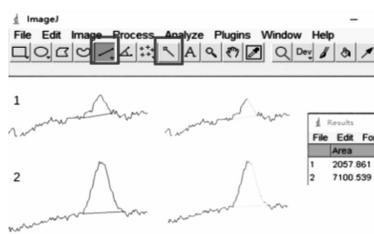
(a)



(b)



(c)



(d)

注:(a)File - Open 扫描图导入软件;(b)Analyze - Gels - Select first lane(Select first lane)界定目标区域(2、3、4、5);(c)Analyze - Gels - Plot lanes 生成斑点线条轮廓图;(d)Straight line 选择工具绘制基线,Wand tool 测量峰面积。

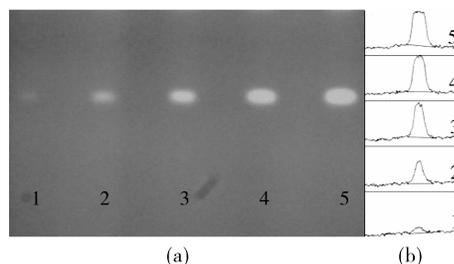
图1 Image J 数字化图片处理流程

2 结果与讨论

2.1 HPTLC 分离条件的优化

在 HPTLC 分离中,对硅胶板分离效果评估的方法一般是目测检视法。本研究采用 ADC-2 型全自动 HPTLC 展开仪进行薄层色谱展开,全自动化的预饱和硅胶板平衡有效避免了“边缘效应”问题。按

1.2.4 方法,使用不同流动相进行 HPTLC 分离条件优化。结果表明,在流动相为乙酸乙酯-氯仿-无水乙醚(体积比 1:8:1)时, TBHQ 的比移值(R_f)为 0.61,同一轨道上的目标物质与干扰杂质能够实现良好的分离。因此,选择乙酸乙酯-氯仿-无水乙醚(体积比 1:8:1)为流动相。图 2 为在最优化流动相条件下,按 1.2.4 方法将 0.1 mg/mL TBHQ 标准溶液依次点样 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5 μL ,得到的 TBHQ 标准溶液薄层展开图及 Image J 生成的峰图。图 2 中 1~5 斑点分别对应 TBHQ 标准溶液 1.5、2.5、3.5、4.5、5.5 μL 的点样量。由图 2 可见, TBHQ 标准溶液经 HPTLC 分离后,再用 DPPH 浸渍, DPPH 均匀分布于整块薄层板上,含有 TBHQ 的区域(图 2 中间变色区域)由浅紫色变为浅黄色,而其他区域则保持浅紫色不变。

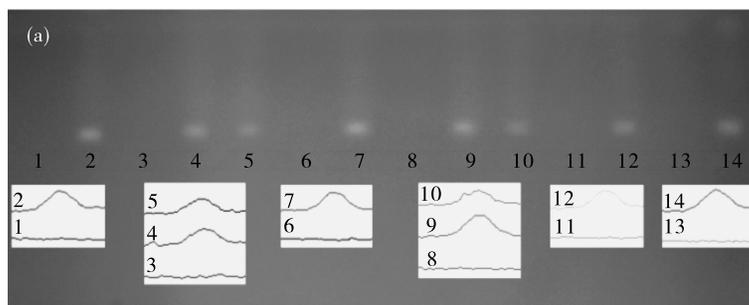


注:1~5 TBHQ 浓度分别为 150、250、350、450、550 ng/zone。

图2 TBHQ 标准溶液薄层展开图(a)及 Image J 生成的峰图(b)

2.2 定性分析

采用目测检视法进行定性分析。目测检视法可以获得关于 HPTLC 分离效果和目标物浓度范围最为直观的印象,是最有效的评估方法。不同样品薄层展开图及光密度扫描峰图如图 3 所示。



注:1. 面包样品 1; 2. 面包样品 1 + TBHQ 标准溶液; 3. 面包样品 2; 4. 面包样品 2 + TBHQ 标准溶液; 5. TBHQ 标准溶液(0.1 mg/mL); 6. 蛋糕样品 1; 7. 蛋糕样品 1 + TBHQ 标准溶液; 8. 蛋糕样品 2; 9. 蛋糕样品 2 + TBHQ 标准溶液; 10. TBHQ 标准溶液(0.1 mg/mL); 11. 大豆油样品; 12. 大豆油样品 + TBHQ 标准溶液; 13. 稻米油样品; 14. 稻米油样品 + TBHQ 标准溶液。样品 + TBHQ 标准溶液为 1 g 样品,0.5 mL 的 1 mg/mL TBHQ 溶液与 4.5 mL 乙醇混合提取液。点样量 4 μL 。

图3 样品薄层色谱展开图(a)及光密度扫描峰图(曲线部分)

由图 3 可知,未添加 TBHQ 的面包、蛋糕样品中, TBHQ 位置无明显信号产生,且光密度扫描结果

显示此类位置无吸收峰,这表明样品提取物中共存的背景基质对目标物定量的干扰可以忽略,证明了该方法具有良好的选择性。TBHQ 标准溶液和混合溶液(样品 + TBHQ 标准溶液)分离后的条带位于同一水平($R_f = 0.61$),表明该水平位置为同种物质 TBHQ。这里要强调薄层色谱分离的重要性,其可以将样品或标准品的杂质部分与目标物分离,以避免假阳性现象,同时也将样品或标准品中其他类抗氧化物质与目标物分离,以避免产生协同增效作用,降低系统误差。

2.3 定量方法验证

2.3.1 方法检测限(LOD)和线性关系

根据《食品检验工作规范》(食药监科[2016]170号)第十九条要求,需要建立具有良好线性的检测方法;而在实际应用中,方法的定量限(LOQ)/LOD 和其选择性至关重要。在 150 ~ 550 ng/zone 的范围内对 TBHQ 进行曲线的绘制,将斑点 TBHQ 浓度与 Image J 测定计算的相应斑点光密度峰面积值分别作为标准曲线的横坐标和纵坐标,结果如图 4 所示。

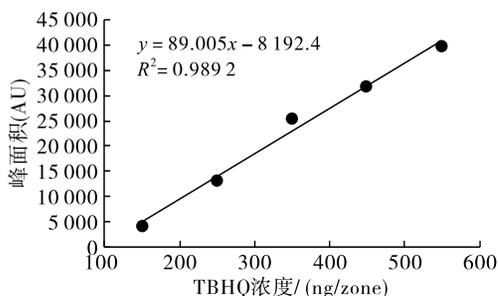


图 4 薄层板上 TBHQ 浓度与 DPPH 变色反应的信号关系曲线

由图 4 可见,对衍生结果的 Image J 软件分析检测给出了良好的线性结果, R^2 为 0.989 2。随后根据 DIN 32645 方法计算得到方法的 LOD 和 LOQ,其置信度超过 95%,计算结果 LOD 为 70 ng/zone, LOQ 为 140 ng/zone,以上样量 10 μ L 计算,LOD 为 35 mg/kg,LOQ 为 70 mg/kg。

2.3.2 方法精密度和准确度

将 1 g 样品与 0.5 mL TBHQ 标准溶液(0.2、0.4 mg/mL)、4.5 mL 乙醇混合提取得到 2 种加标溶液,通过测定目标物 TBHQ 的加标回收率(分别进行了 2 个水平实验,每个添加水平重复 3 次)对本方法的精密度和准确度进行验证,结果如表 1 所示。

由表 1 可见,4 种谷物烘焙样品和 2 种食用油样品中 TBHQ 的加标回收率在 93.5% ~ 114% 之间,相对标准偏差均小于 10%,这说明本方法具有良好的准确度和精密度。

表 1 方法的精密度和准确度

样品	加标水平/(mg/kg)	检测水平平均值/(mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
面包 1	100	103	103	3.8
	200	196	98	6.1
面包 2	100	99	99	4.4
	200	210	105	3.5
蛋糕 1	100	95	95	8.1
	200	187	93.5	3.2
蛋糕 2	100	100	100	6.8
	200	188	94	5.9
大豆油	100	106	106	4.1
	200	228	114	5.7
稻米油	100	98	98	2.4
	200	201	100.5	4.7

2.3.3 与国标方法的对比

根据 GB 5009.32—2016 和 GB/T 21512—2008 食品及食用植物油中 TBHQ 检测方法的 LOD 为 0.5 ~ 10 mg/kg,虽然本方法的 LOD 比国标方法高,但本方法的 LOQ 小于 GB 2760—2014 规定的使用限量(200 mg/kg),且方法精密度符合国标要求。

3 结论

本文通过图像分析软件建立了薄层硅胶板上 TBHQ 与 DPPH 变色反应的浓度与图像分析得到的峰面积值之间对应关系的标准曲线,随后使用 Image J 软件对样品色谱显色图进行精确检测。结果显示,所建方法检测限和定量限分别为 70 ng/zone (35 mg/kg)、140 ng/zone (70 mg/kg),在 150 ~ 550 ng/zone 范围内得到 R^2 为 0.989 2 的线性关系曲线,93.5% ~ 114% 的加标回收率和小于 10% 的精密度,证明了本方法具有可行性,适合粮油食品中各种抗氧化剂的快速定量筛查,具有凝炼成为相关领域国家标准的潜力和价值。

参考文献:

- [1] SCHILDERMAN P, RHIJNSBURGER E, ZWINGMANN I, et al. Induction of oxidative DNA damage and enhancement of cell proliferation in human lymphocytes in vitro by butylated hydroxyanisole [J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(3): 507–512.
- [2] ESKANDANI M, HAMISHEHKAR N, DOLATABADI J E N. Cytotoxicity and DNA damage properties of *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) food additive [J]. *Food Chem*, 2014, 153: 315–320.

(下转第 127 页)

- 的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 25-29, 35.
- [3] KAUN P J, BAHSOON J Z, KAUN J B, et al. Nutraceutical importance of sesame seed and oil: a review of the contribution of their lignans[J]. *SL J Biomed Res*, 2010, 2(1): 4-16.
- [4] LYON C K. Sesame: current knowledge of composition and use[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1972, 49(4): 245-249.
- [5] 魏艳静, 卞红磊. 芝麻素生物学活性研究进展[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(8): 1009-1010.
- [6] 冯志勇, 谷克仁. 芝麻中木脂素的组成、结构及其生理功能[J]. 中国油脂, 2004, 29(7): 56-59.
- [7] 葛树丰, 高红, 杨光, 等. 芝麻素类型木脂素类似物的研究 I. 2-芳基四氢呋喃的合成[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1991(2): 140-145.
- [8] 任媛媛, 李书国, 骆亚薇, 等. 超声波辅助响应面法提取芝麻中芝麻素与芝麻素的结晶[J]. 食品科技, 2016, 41(12): 208-212.
- [9] 张佰清, 林子木, 朴海燕. 超声波辅助提取芝麻中芝麻素的工艺条件研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(2): 223-226.
- [10] 何晓梅, 朱珣. 芝麻油中芝麻素提取与纯化工艺研究[J]. 皖西学院学报, 2012, 28(5): 9-11, 15.
- [11] 刘帅, 邹国华, 邓阳, 等. 略论相似相溶原理的内涵与部分应用[J]. 化学教育(中英文), 2021, 42(11): 60-64.
- [12] 朱利明. 有关相似相溶规律的讨论[J]. 大学化学, 2003(1): 44-45.
- [13] 唐涌泗. 浅析“相似相溶”原则[J]. 山东教育学院学报, 1995(2): 88-89.
- [14] 何竞旻, 王瑞侠, 黄劲松. 超声波在药用植物提取中的应用研究[J]. 池州学院学报, 2009, 23(3): 67-69.
- [15] 叶子晨, 梁佳龙, 刘雪英, 等. 高效液相色谱法测定黑白芝麻中芝麻素含量[J]. 医药导报, 2011, 30(6): 799-800.
- [16] TOSCANI G, MOUHOT C, LODS B. Relaxation rate, diffusion approximation and Fick's law for inelastic scattering Boltzmann models[J]. *Kinet Relat Mod*, 2017, 1(2): 223-248.
- [17] 陈源, 杨道富, 范丽华, 等. 响应面法优化微波提取茂谷橘橙皮总黄酮工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 13(4): 80-86.
- [18] 戴喜末, 熊子文, 罗丽萍. 响应面法优化野艾蒿多糖的超声波提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 93-97.
- (上接第 109 页)
- [3] OKUBO T, YOKOYAMA Y, KANO K, et al. Cell death induced by the phenolic antioxidant *tert*-butylhydroquinone and its metabolite *tert*-butylquinone in human monocytic leukemia U937 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(5): 679-688.
- [4] BOTTERWECK A A M, VERHAGEN H, GOLDBOHM R A, et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study[J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(7): 599-605.
- [5] FARAJMAND B, ESTEKI M, KOOHPUR E, et al. Reversed-phase single drop microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the quantification of synthetic phenolic antioxidants in edible oil samples[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(7): 1524-1531.
- [6] FARAJMAND B, KAMYABI M A, SORKHANI F Y, et al. Combination of micro liquid-liquid extraction with differential pulse voltammetry for determination of TBHQ in edible oil samples by pre-anodized glassy carbon electrode [J/OL]. *J Electroanal Chem*, 2020, 861: 113966 [2021-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113966>.
- [7] CACHO J I, CAMPILLO N, VINAS P, et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils using microvial insert large volume injection gas-chromatography[J]. *Food Chem*, 2016, 200: 249-254.
- [8] DING M, ZOU J. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils[J]. *Food Chem*, 2012, 131(3): 1051-1055.
- [9] ROCAMORA R C, RAMASAMY K, LIM S M, et al. HPTLC based approach for bioassay-guided evaluation of antidiabetic and neuroprotective effects of eight essential oils of the Lamiaceae family plants [J/OL]. *J Pharmaceut Biomed*, 2020, 178: 112909 [2021-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112909>.
- [10] IBRAHIM R S, KHAIRY A, ZAATOUT H H, et al. Digitally-optimized HPTLC coupled with image analysis for pursuing polyphenolic and antioxidant profile during alfalfa sprouting [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1099: 92-96.
- [11] 黄彩虹. 基于 HPTLC + 策略的食品筛检方法学研究 [D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2020.
- [12] 王天楠, 张煌, 陈益胜, 等. HPTLC-DPPH 法定性定量分析保健品中芦丁[J]. 食品与机械, 2019, 35(1): 92-96, 142.