

QuEChERS – 超高效液相色谱法测定 食用油中5种抗氧化剂

李 亚¹, 梁剑锋¹, 柯立坚², 钟水桥², 蒋德利²

(1. 梧州学院 食品与制药工程学院, 广西 梧州 543002; 2. 梧州市食品药品检验所, 广西 梧州 543002)

摘要:为快速准确测定食用油中抗氧化剂含量,通过 QuEChERS – 超高效液相色谱法建立同时测定食用油中丁基羟基茴香醚(BHA)、特丁基对苯二酚(TBHQ)、二丁基羟基甲苯(BHT)、没食子酸丙酯(PG)、没食子酸辛酯(OG)5种常见抗氧化剂含量的方法。样品先采用甲醇溶解提取,提取液经冷冻离心、净化剂净化分离后上机检测,超高效液相色谱仪以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,采用外标法定量。结果表明:5种抗氧化剂在1.0~100.0 mg/L范围内线性关系良好,检出限均不大于1.6 mg/kg,加标回收率在85.78%~100.85%之间,RSD在2.40%~6.01%之间。综上,该方法具有操作简单、重现性好、灵敏度高等特点,适合动植物油脂中5种常用抗氧化剂含量的检测与分析。

关键词:QuEChERS;超高效液相色谱;食用油;抗氧化剂

中图分类号:TS225;TQ646

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2023)01-0115-05

Determination of five antioxidants in edible oil by QuEChERS – ultra high performance liquid chromatography

LI Ya¹, LIANG Jianfeng¹, KE Lijian², ZHONG Shuiqiao², JIANG Deli²

(1. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Wuzhou University, Wuzhou 543002, Guangxi, China;

2. Wuzhou Food and Drug Inspection Institute, Wuzhou 543002, Guangxi, China)

Abstract: In order to quickly and accurately determine the antioxidants in edible oil, a method for simultaneous determination of butylhydroanisole (BHA), tertiary butylhydroquinone (TBHQ), dibutylhydrotoluene (BHT), propyl gallate (PG) and octyl gallate (OG) in edible oil was established by QuEChERS – ultra high performance liquid chromatography. The sample was dissolved and extracted with methanol, and the extract was tested on the machine after freezing centrifugation and purification and separation with detergent. The ultra high performance liquid chromatography used acetonitrile – water as the mobile phase for gradient elution, and the external standard method was used for quantification. The results showed that the linear relationship of the five antioxidants was good in the range of 1.0 – 100.0 mg/L, the detection limits were not more than 1.6 mg/kg, the spiked recovery rate was 85.78% – 100.85%, and the RSD was 2.40% – 6.01%. In conclusion, this method has the characteristics of simple operation, good reproducibility and high sensitivity, and is suitable for the detection and analysis of common antioxidants in animal and vegetable oils.

Key words: QuEChERS; ultra high performance liquid chromatography; edible oil; antioxidant

收稿日期:2021-10-21;修回日期:2022-08-19

基金项目:广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目(2021KY0681)

作者简介:李 亚(1983),女,高级工程师,硕士,研究方向为食品质量安全与检测(E-mail)23170570@qq.com。

通信作者:梁剑锋,高级工程师(E-mail)ljf117117@163.com。

动植物油脂由于含有大量不饱和脂肪酸,在储存过程中接触到氧气等氧化剂时,易发生酸败而产生难闻的哈喇味。此外,油脂酸败还会引起酸值、过氧化值等食品安全指标超标^[1-3]。消费者食用酸败变质的动植物油脂,可能会产生不良生理反应甚至引起食物中毒^[4-6]。食用油生产企业为确保产品货

架期,通常在产品中添加一定量的抗氧化剂。目前,市售食用油中常用抗氧化剂有丁基羟基茴香醚(BHA)、特丁基对苯二酚(TBHQ)、二丁基羟基甲苯(BHT)、没食子酸丙酯(PG)及没食子酸辛酯(OG)等^[7-10]。抗氧化剂作为食品添加剂添加到食用植物油中,其最大使用量需遵循 GB 2760—2014 中的规定,如 BHA、TBHQ、BHT 在食用油中最大使用量为 0.2 g/kg,PG 在食用油中最大使用量为 0.1 g/kg。食用油中超量、超范围使用抗氧化剂会给消费者身体健康带来一定的安全风险,因此建立快速、高效、准确的食用油中抗氧化剂含量的检测方法,对于保证食用油品质具有现实意义。

目前食用油中抗氧化剂含量检测常用方法有气相色谱法(GC)^[11]、超高效液相色谱法(UPLC)^[12]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[13]、超高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[14]等,样品前处理方法通常使用 GB 5009.32—2016 中的方法,即样品首先经过正己烷、乙腈等有机溶剂提取,提取液再经 C18 固相萃取柱净化后上机检测,或者样品经有机溶剂稀释后直接用凝胶色谱仪净化后上机检测。上述样品前处理方法存在操作复杂、耗时较长、检测成本高等缺点,不适合大批量样品检测时采用。

QuEChERS(quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)是一种样品快速前处理技术,具有快速、高效、经济、准确等特点^[15-18],已广泛应用在食品及农产品农药残留、真菌毒素残留检测中^[19-20],但在食用动植物油抗氧化剂含量检测中的应用报道较少。本文对 QuEChERS 的样品前处理方法进行研究,并结合超高效液相色谱仪检测食用油中 BHA、TBHQ、BHT、PG、OG 5 种抗氧化剂含量,旨在为食用油常用抗氧化剂含量的检测提供新方法。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

当地市场上购买的花生油、大豆油、调和油、玉米油、猪油共 13 份油样;空白花生油、猪油(不含抗氧化剂)。

PG(纯度 99.9%)、TBHQ(纯度 99.8%)、BHA(纯度 99.8%)、OG(纯度 99.8%)、BHT(纯度 99.9%)标准品,Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;甲醇(色谱纯),美国 BCL 公司;乙腈(色谱纯),美国霍尼韦尔公司;正己烷、二甲甲烷(分析纯),广东西陇化工公司;多壁碳纳米管(HC-C18)净化剂(40~

63 μm)、乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)吸附剂,上海安谱公司;C18 固相萃取柱(200 mg/12 mL),杭州微米派科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器和 Chromeleon Dionex 软件);X-30 高速冷冻离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;Multi Reax 涡旋混合器,德国海道夫公司;Million Q 超纯水器,美国默克公司;CPA225D 十万分之一电子天平,德国赛多利斯公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理

取 2.00 g 油样于 25 mL 塑料离心管中,加入 10.00 mL 甲醇(提取溶剂)混匀,将离心管放入涡旋混合器上振摇 5 min,再放入冷冻离心机离心分离 3 min(4℃,4 000 r/min),取出离心管置于-18℃冰箱冷冻过夜;然后取出置于室温,精密吸取 1.50 mL 上清液,置于预先装有净化剂包(25 mg HC-C18+180 mg PSA)的 2 mL 塑料离心管内,摇匀后放入涡旋混合器振摇 3 min,静置 5 min,待溶液分层后取上清液过滤上机检测。

1.2.2 标准使用液的配制

分别准确称取 0.10 g BHA、TBHQ、BHT、PG、OG 标准品,用乙腈溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶中,配制成 1 000 mg/L 混合标准储备液。临用前取适量体积的混合标准储备液用乙腈分别稀释成 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 mg/L 混合标准使用液。

1.2.3 超高效液相色谱条件

流动相梯度洗脱程序见表 1;流速 0.30 mL/min;Synchronis AQ-C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);柱温 40℃;进样量 3.0 μL;检测波长 280 nm。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A 相(水)/%	B 相(乙腈)/%
0.00	65	35
1.50	65	35
2.50	10	90
5.00	10	90
5.01	30	70
7.00	65	35

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

BHA、TBHQ、BHT、PG、OG 5 种抗氧化剂为极性

物质,根据相似相溶原理,其易溶于极性有机溶剂。本试验在空白花生油和猪油样品中,分别添加以上5种混合抗氧化剂(抗氧化剂经乙腈饱和的正己烷溶解后加入动植物油中)各20 mg/kg,考察甲醇、乙腈、二氯甲烷3种有机溶剂对加标样品的提取效果(以加标回收率为考察指标),试验除提取溶剂不同外,其余操作步骤按照1.2.1前处理方法和1.2.3色谱条件进行检测,结果见表2。

表2 提取溶剂对抗氧化剂加标回收率的影响($n=6$)

样品	抗氧化剂	加标回收率/%		
		甲醇	乙腈	二氯甲烷
花生油	BHA	89.82	86.22	81.89
	TBHQ	92.79	86.40	86.71
	BHT	93.77	84.37	85.04
	PG	88.81	83.17	88.29
	OG	89.83	90.02	85.33
猪油	BHA	88.69	87.02	84.89
	TBHQ	91.35	85.29	80.13
	BHT	90.56	86.88	84.93
	PG	87.09	81.62	86.01
	OG	88.41	87.69	81.78

由表2可知,使用甲醇、乙腈、二氯甲烷作为提取溶剂时,5种抗氧化剂加标回收率分别为87.09%~93.77%、81.62%~90.02%、80.13%~88.29%,可见采用甲醇为提取溶剂时加标回收率最高,所以选择甲醇作为油样中5种抗氧化剂的提取溶剂。

2.2 净化剂用量的确定

油样中抗氧化剂经甲醇提取后,提取液中有色素、蛋白质、胶质等油脂共萃杂质,需进一步去除以确保检测结果的准确性。本试验采用HC-C18和PSA 2种净化剂对提取液进行盐析、吸附以去除共萃杂质,考察2种净化剂用量对抗氧化剂加标回收率的影响(样品为空白花生油,5种抗氧化剂加标水平均为20 mg/kg),试验除净化剂不同外,其余操作步骤按照1.2.1前处理方法和1.2.3色谱条件进行检测,结果见表3。

由表3可知:当HC-C18用量在25 mg时,5种抗氧化剂加标回收率在89.85%~94.21%之间,加标回收率为各HC-C18用量中最高水平;当PSA用量在180 mg时,5种抗氧化剂加标回收率为88.70%~93.72%,加标回收率为各PSA用量中最高水平。综上所述,确定净化剂最佳组成为25 mg HC-C18和180 mg PSA。

表3 净化剂用量对5种抗氧化剂加标回收率的影响($n=6$)

净化剂种类	净化剂用量/mg	加标回收率/%				
		BHA	TBHQ	BHT	PG	OG
HC-C18	15	79.78	81.23	83.96	77.30	82.77
	20	85.84	84.71	88.03	85.14	86.45
	25	90.02	91.88	94.21	89.85	90.31
	30	87.11	85.34	86.72	87.93	89.09
	35	81.39	78.92	81.49	85.02	84.85
PSA	160	81.72	83.27	85.98	80.77	78.56
	170	84.49	87.92	90.29	85.80	82.39
	180	89.09	92.14	93.72	90.12	88.70
	190	89.55	85.33	88.96	88.76	89.89
	200	84.87	79.99	80.72	82.62	81.78

2.3 流动相的选择

本试验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙酸溶液作为流动相对5种抗氧化剂分离效果的影响,试验中除了液相色谱流动相不同外,其余操作步骤按照1.2.1前处理方法和1.2.3色谱条件进行检测(空白花生油中5种抗氧化剂添加水平均为20 mg/kg)。结果表明,以乙腈-水为流动相,5种抗氧化剂分离度最好,其色谱图见图1。

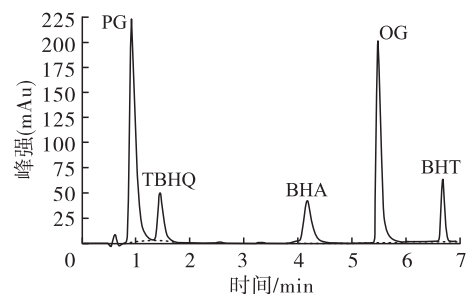


图1 乙腈-水为流动相时加标油样色谱图

2.4 方法线性关系和检出限

将按1.2.2方法配制的5种抗氧化剂混合标准使用液按照1.2.3色谱条件进行检测,以抗氧化剂质量浓度(x)为横坐标,以其响应峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,以3倍信噪比(S/N)计算检出限(LOD),结果见表4。

由表4可知,5种抗氧化剂在1.0~100.0 mg/L质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系,线性相关系数在0.9984~0.9996之间,方法检出限均不大于1.6 mg/kg,且低于GB 5009.32—2016中相应抗氧化剂的检出限。

表4 5种抗氧化剂线性回归方程、线性范围和检出限

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	$y = 0.0076x + 0.0386$	0.9996	1.0 ~ 100.0	1.5
TBHQ	$y = 0.0189x + 0.0415$	0.9990	1.0 ~ 100.0	1.6
BHT	$y = 0.0140x + 0.0232$	0.9991	1.0 ~ 100.0	1.5
PG	$y = 0.1054x - 0.0359$	0.9984	1.0 ~ 100.0	1.6
OG	$y = 0.0131x + 0.1048$	0.9992	1.0 ~ 100.0	1.5

2.5 方法加标回收率与精密度

通过在动植物油中分别添加3个水平的抗氧化剂标准品,按1.2.1方法处理样品和1.2.3色谱条件进行检测,计算加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表5。

表5 动植物油脂样品添加抗氧化剂加标回收率($n=6$)

抗氧化剂	添加水平/(mg/kg)	猪油		调和油	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
BHA	10	86.78	5.77	86.85	5.22
	20	88.29	3.26	90.10	4.05
	40	93.22	2.78	93.75	3.05
TBHQ	10	87.62	6.01	88.77	3.82
	20	91.36	3.89	90.82	4.04
	40	97.59	3.05	95.64	3.87
BHT	10	89.54	4.85	89.54	4.21
	20	94.22	4.04	91.09	3.24
	40	100.85	3.56	90.52	4.35
PG	10	86.78	5.29	89.78	3.24
	20	89.19	4.27	88.12	3.57
	40	92.13	3.92	87.89	2.97
OG	10	85.78	4.71	86.74	5.12
	20	90.51	3.55	87.95	3.54
	40	94.25	3.79	89.82	2.40

由表5可知,动物油(猪油)样品中5种抗氧化剂的加标回收率为85.78%~100.85%,RSD为2.78%~6.01%,植物油(调和油)中5种抗氧化剂的加标回收率在86.74%~95.64%之间,RSD为2.40%~5.22%。可见,该方法具有加标回收率好、准确度高特点。

2.6 实际样品检测

采用本文试验方法对当地市场随机购买的13份样品进行5种抗氧化剂含量的检测,结果见表6。

由表6可知,13份样品中,有5份样品检出1种抗氧化剂,有1份猪油检出2种抗氧化剂,其中TBHQ、BHA、BHT检出率较高。据了解,一些采用

充氮包装的样品未添加抗氧化剂。

表6 实际样品的抗氧化剂含量测定结果($n=3$) mg/kg

样品	BHA	TBHQ	BHT	PG	OG
花生油1					
花生油2		3.45			
花生油3					5.15
调和油1			10.00		
调和油2					
调和油3					
大豆油1	8.26				
大豆油2					
大豆油3					
玉米油1		8.85			
玉米油2					
猪油1	5.59		4.85		
猪油2					

注:空白表示未检出

对于检出抗氧化剂的6份样品和1份未检出抗氧化剂的样品,采用GB 5009.32—2016第一法高效液相色谱法(采用固相萃取柱净化)进行检测,并与本文试验方法结果进行比较,结果见表7。

表7 国标方法与本文试验方法检测结果比较($n=3$)

样品	检测项目	国标方法		本文试验方法	
		测定结果/(mg/kg)	RSD/%	测定结果/(mg/kg)	RSD/%
花生油1	TBHQ、BHA、BHT、PG	未检出		未检出	
花生油2	TBHQ	3.63	5.76	3.45	4.98
花生油3	OG	4.87	5.23	5.15	4.42
调和油1	BHT	10.62	3.78	10.00	2.92
大豆油1	BHA	8.82	3.05	8.26	3.74
玉米油1	TBHQ	9.29	4.82	8.85	4.33
猪油1	BHA	5.94	5.09	5.59	4.67
猪油1	BHT	5.13	4.19	4.85	3.63

由表7可知,本文试验方法在测定结果和RSD指标上与GB 5009.32—2016第一法的相近,说明本文试验方法具有一定适用性。

3 结论

本文通过QuEChERS-超高效液相色谱法建立同时测定食用油中BHA、TBHQ、BHT、PG和OG 5种常用抗氧化剂的方法。样品用甲醇溶解、提取后,提取液经冷冻离心,取上清液经净化剂净化后,进入

高效液相色谱仪检测。该方法具有操作简单、高效快速、分离效果好、检测成本低、结果可靠、对环境友好等特点,可以满足食用油中5种常用抗氧化剂含量检测的需求。使用该方法对随机购买的13份食用油进行抗氧化剂检测发现,5份样品检出1种抗氧化剂,1份猪油样品检出2种抗氧化剂,其中TBHQ、BHA、BHT检出率较高。

参考文献:

- [1] 黄璐瑶,梁鹏. 食用油脂氧化的控制措施研究进展[J]. 食品安全导刊,2017(21):31.
- [2] 陈芳,陈伟娜,胡小松. 基于油脂氧化的食品加工伴生危害物形成研究进展[J]. 中国食品学报,2015,15(12):9-15.
- [3] 郑翠翠,刘军,邹宇晓,等. 油脂加工过程中氧化稳定性的研究进展[J]. 中国油脂,2014,39(7):53-57.
- [4] 徐洪宇. 植物油脂氧化及其氧化稳定性的研究[J]. 食品安全导刊,2021(33):177-179.
- [5] 吕芳,林祥娜,朱靖雯,等. 煎炸油脂质变预防及其危害控制研究进展[J]. 工业微生物,2020,50(1):56-62.
- [6] 郭全喜. 食品加工中油脂氧化危害研究[J]. 中国食品,2018(21):152.
- [7] 曾裕,尹浩,苏沛,等. TBHQ对3种食用油保质期内品质变化的影响[J]. 中国食物与营养,2020,26(4):38-41.
- [8] 于立芹,张华南,徐如冰,等. 特丁基对苯二酚与迷迭香提取物对亚麻籽油贮藏稳定性的影响[J]. 食品工业科技,2020,41(5):257-261.
- [9] 李娜. 不同抗氧化剂对油脂抗氧化性能的影响研究[J]. 安徽农学通报,2018,24(11):107-110.
- [10] 孟繁磊,蔡玉红,张国辉,等. UPLC测定食用油中10种抗氧化剂[J]. 中国油脂,2018,43(2):134-137.
- [11] 李福敏,邵林. 气相色谱法同时检测食用植物油中BHA、BHT、TBHQ[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2018,27(3):181-184.
- [12] 续颖,刘雪莹,伍莹,等. 高效液相色谱法测定食用植物油中TBHQ、BHA、BHT含量[J]. 安徽农业科学,2017,45(18):89-90,117.
- [13] 景赞,刘超,胡丹,等. QuEChERS-三重四级杆气质法测定花椒油中抗氧化剂[J]. 中国调味品,2018,43(8):173-176.
- [14] 谢强胜,张媛媛,李启艳,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼油软胶囊中的合成抗氧化剂[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(7):2846-2851.
- [15] 吴基任,潘望,谭高好,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定花生及土榨花生油中9种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(10):3927-3935.
- [16] 连英杰,林升航,曾琪,等. 多壁碳纳米管/N-丙基乙二胺混合吸附-超高效液相色谱-串联质谱法测定普洱茶中3种手性杀菌剂农药残留[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(6):1702-1708.
- [17] 蒋湘,吴毅,黄燕红,等. 多壁碳纳米管净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中44种药物残留[J]. 食品工业科技,2020,41(10):230-237.
- [18] HE Z, WANG L, PENG Y, et al. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method[J]. Food Chem,2015,169:372-380.
- [19] 梁剑锋,李亚,梁燕妮,等. QuEChERS萃取-UPLC-MS/MS测定花生酱中黄曲霉毒素B₁方法的研究[J]. 中国调味品,2020,45(5):182-185,190.
- [20] HUANG Y S, SHI T, LUO X, et al. Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2019, 275: 255-264.
- (上接第114页)
- [10] HU Q R, CAO P, CAO Z X, et al. Rapid screening and confirmation of 20 mycotoxins in grain products by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(11):1241-1248.
- [11] SAI N, JIN R, BU R, et al. Rapid determination of 6 kinds of aconite alkaloids in rat plasma by HPLC-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. China Pharm, 2018, 29(6):761-765.
- [12] 赵孔祥,柴铭骏,宋旭,等. 液相色谱-四极杆-静电轨道阱高分辨质谱法测定保健食品中降压类药物[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(11):3481-3487.
- [13] 罗松彪,张秀荣,汪强,等. 新时代我国芝麻产业发展探析[J]. 安徽农学通报,2019,25(Z1):47-49,61.
- [14] 许国栋,张雯丽. 世界芝麻生产、贸易结构变化趋势分析[J]. 世界农业,2018(10):131-137.
- [15] 张森,何莲,贾洪锋. 不同加工方式对芝麻酱感官品质的影响研究[J]. 中国调味品,2019(7):107-111.
- [16] 刘鑫,李睿,徐漪沙,等. 不同加工处理方式对芝麻油风味的影响研究[J]. 保鲜与加工,2020,20(6):148-156.
- [17] 王有菲. 不同原料芝麻油挥发性风味成分的研究[J]. 粮食与食品工业,2017,24(2):24-27,31.
- [18] 冀亚飞,杨金月,刘宏伟,等. 香兰素新合成工艺路线的绿色化学原理解析[J]. 化工高等教育,2021,38(2):126-131.
- [19] 杨文文,吴秋林,唐鸿志,等. “香料皇后”:天然香兰素生物合成的研究进展[J]. 微生物学通报,2013,40(6):1087-1095.
- [20] 张建斌. 香兰素制备技术研究进展及前景展望[J]. 广东化工,2018,45(12):163-166.
- [21] 左青,左晖. 浓香型油脂的生产及关键技术讨论[J]. 中国油脂,2019,44(11):152-157.