

高效液相色谱法测定食用植物油中 TBHQ、BHA、BHT 含量

续颖, 刘雪莹, 伍莹, 麦亨, 黄秋娜, 何聪容 (广东美味鲜调味食品有限公司, 广东中山 528437)

摘要 [目的] 建立食用植物油中 3 种抗氧化剂含量的测定方法。[方法] 利用甲醇溶解提取与离心相结合的技术进行脱脂处理, 采用反相高效液相色谱法同时测定食用植物油中特丁基对苯二酚(TBHQ)、丁基羟基茴香醚(BHA)和二丁基羟基甲苯(BHT)含量。[结果] TBHQ、BHA、BHT 浓度在 1~10 mg/L 时线性关系良好, 相关系数分别为 0.999 92、0.999 95、0.999 93; 检出限分别为 0.54、0.48、0.48 mg/kg, 回收率为 73.7%~97.3%。[结论] 该方法准确、灵敏, 适用于各类植物油的 TBHQ、BHA、BHT 含量分析。

关键词 食用植物油; 特丁基对苯二酚; 丁基羟基茴香醚; 二丁基羟基甲苯; 脱脂处理; 高效液相色谱法

中图分类号 TS225.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)18-0089-02

Determination of TBHQ, BHA, BHT in Edible Vegetable Oil by High Liquid Performance Chromatography

XU Ying, LIU Xue-ying, WU Ying et al (Guangdong Meiweixian Flavouring Foods Co., Ltd., Zhongshan, Guangdong 528437)

Abstract [Objective] To establish a method for determination of 3 antioxidants content in edible vegetable oil. [Method] The content of TBHQ, BHA, BHT in edible vegetable oil was determined by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC), using the technology of methanol extraction and centrifugation to conduct degreasing. [Result] Experimental results showed that the experiment of TBHQ, BHA, BHT had a good liner relationship in concentration range of 1-10 mg/L, the correlation coefficient of linear curve were 0.999 92, 0.999 95, 0.999 93; the limits of detection were 0.54, 0.48, 0.48 mg/kg; the recovery of 3 antioxidants ranged from 73.7% to 97.3%. [Conclusion] The method was proved to be highly efficient, robust and sensitive, and was suitable for the analysis of TBHQ, BHA, BHT in edible vegetable oil.

Key words Edible vegetable oil; TBHQ; BHA; BHT; Degreasing treatment; High liquid performance chromatography

食用植物油是人们日常生活必需食品之一, 近年来频频发生的食品安全事件中不乏与食用油有关的事件, 抗氧化剂等安全性指标超出限量标准的情况会对人们身体健康造成不可逆转的伤害, 加剧了消费者对食品安全的信任危机。

特丁基对苯二酚(TBHQ)、丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)3 类合成酚类抗氧化剂作为食品添加剂, 能起到防止或延缓油脂氧化, 提高油脂的稳定性和延长贮存期的作用, 在食用植物油生产环节中常被单独或混合使用。然而过量食用含抗氧化剂的食物, 对人体肝、脾、肾等器官均有不利的影响, 因此各国对食用抗氧化剂都有严格的使用限量规定。在我国食品添加剂使用卫生标准 GB2760 中, 对 3 种抗氧化剂在油及食用油脂食品中使用限量规定均 ≤ 0.2 g/kg。食用植物油 TBHQ、BHA、BHT 在现行 GB/T 23373 介绍的检测方法中, 样品经有机溶剂提取, 并用价格昂贵的凝胶渗透色谱净化系统进行样品脱脂预处理, 应用高效液相色谱法进行检测。凝胶渗透色谱净化系统价格昂贵、前处理繁琐、时间长, 笔者采用甲醇溶解提取与离心相结合技术进行脱脂处理优化, 采用液相色谱法检测食用植物油中 TBHQ、BHA、BHT 3 类抗氧化剂的含量, 重点考察了方法的检出限、线性范围、重复性、回收率等重要的色谱方法学参数。

1 材料与方

1.1 材料 供试花生油样品, 市售。主要仪器: Agilent 1260 液相色谱仪(配紫外检测器); Sartorius BSA124S 电子天平; 森田 TD5A 离心机; Vortex XH-B 漩涡混匀器。主要试剂: 甲醇(色谱纯); 试验用水为一级水; TBHQ、BHA、BHT 标准品(Dr. Ehrenstorfer)。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 标准储备液。 分别称取 3 种抗氧化剂标准品各 50.0 mg, 用甲醇定容至 50 mL, 浓度为 1 mg/mL。

1.2.2 标准工作液。 将标准储备液用甲醇稀释成 1、2、4、8、10 mg/L 5 个标准系列溶液。

1.3 液相色谱参考条件 色谱柱为 C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 粒度 2.7 μm); 进样量 15 μL; 流动相: 甲醇(A), 水(B)。洗脱梯度: 0~5.0 min, 流动相 A 为 30%; 5.0~21.5 min, 流动相 A 从 30% 变化为 80%; 21.5~40.0 min, 流动相 A 为 80%; 40.0~50.0 min, 流动相 A 为 30%。流速 1 mL/min; 柱温 40 °C; 紫外检测器波长 280 nm。

1.4 样品前处理 准确称取 2 g 植物油样于 10 mL 塑料离心管中, 用 10 mL 甲醇分 3 次(3+3+4) 分别在漩涡混匀器上快速混匀 1 min, 离心(2 000 r/min) 5 min, 吸取上清液合并于 10 mL 离心管中; 摇匀后经 0.22 μm 滤膜过滤, 供分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及检出限 标准样品色谱见图 1。将浓度为 1、2、4、8、10 μg/L 5 个标准系列溶液上机测定, 根据峰的积分面积绘制 5 点校正曲线。获得线性回归方程、相关系数及

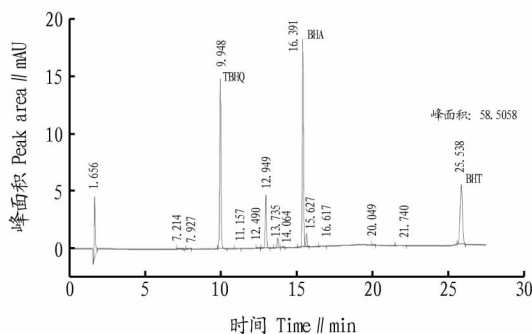


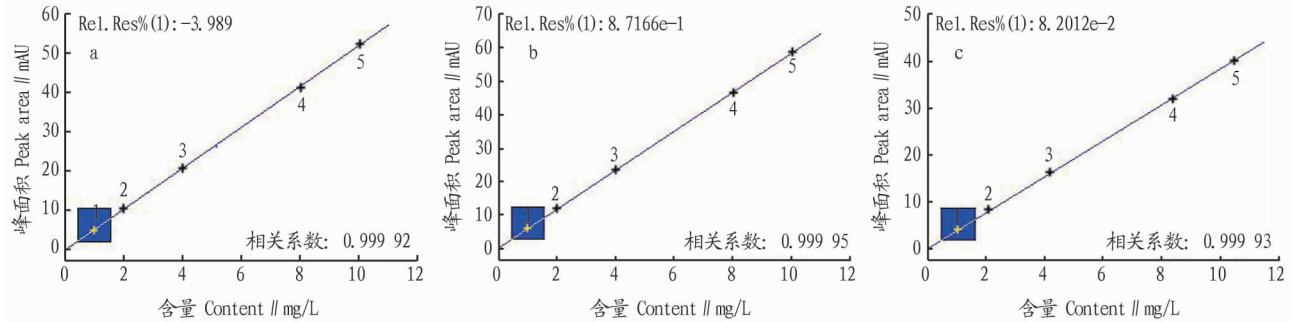
图 1 标准样品色谱

Fig. 1 Standard sample chromatography

作者简介 续颖(1983—), 女, 河北保定人, 工程师, 硕士, 从事食品检验与质量控制研究。

收稿日期 2017-04-07

检出限(S/N)结果分别如下(图2):TBHQ的线性回归方程为 $y=5.20862166x-0.1851735$,相关系数 $r^2=0.99992$,检出限为 0.54 mg/kg ;BHA的线性回归方程为 $y=5.8094629x+0.2188034$,相关系数 $r^2=0.99995$,检出限为 0.48 mg/kg ;BHT的线性回归方程为 $y=3.7995196x+0.2650061$,相关系数 $r^2=0.99993$,检出限为 0.48 mg/kg 。



注:a. TBHQ;b. BHA;c. BHT

图2 标准曲线信息

Fig. 2 Standard curve information

表1 重复性试验数据

Table 1 Repeated test data

样品 Sample	抗氧化剂 Antioxidant	测定浓度 Determined concentration// $\mu\text{g/kg}$						平均值 Mean $\mu\text{g/kg}$	RSD %
		重复1 Repetition 1	重复2 Repetition 2	重复3 Repetition 3	重复4 Repetition 4	重复5 Repetition 5	重复6 Repetition 6		
1	TBHQ	4.75	5.00	5.00	4.65	5.05	4.60	4.84	4.13
	BHA	5.10	4.75	5.00	4.90	4.70	4.75	4.87	3.29
	BHT	3.80	4.00	3.85	3.65	4.00	3.65	3.80	4.21
2	TBHQ	6.00	5.85	6.10	5.95	5.98	6.08	5.99	1.52
	BHA	6.05	6.10	5.99	5.95	5.98	6.06	6.02	0.95
	BHT	5.10	5.05	5.02	4.95	4.98	5.08	5.03	1.15

2.2.2 回收率试验。取花生油阴性样品,分别对该花生油进行3个浓度的加标试验,每个加标浓度样品平行测定6

2.2 样品重复性及回收率

2.2.1 重复性试验。选取市售2款花生油进行测定,平行测定6次,测得样品中TBHQ、BHA、BHT的平均浓度、RSD试验数据见表1。表1中重复性试验数据表明,该方法具有良好的重现性。

次,测得回收率、RSD具体试验数据见表2。表2回收率试验数据表明,该方法具有较高的精密度和准确度。

表2 花生油加标回收率试验数据

Table 2 Test data of spiked recovery of peanut oil

加标浓度 Spiked conc- entration// mg/kg	抗氧化剂 Antioxidant	测定浓度 Determined concentration// $\mu\text{g/kg}$						平均值 Mean $\mu\text{g/kg}$	回收率 Recovery %	RSD %
		重复1 Repetition 1	重复2 Repetition 2	重复3 Repetition 3	重复4 Repetition 4	重复5 Repetition 5	重复6 Repetition 6			
2.00	TBHQ	1.88	1.95	1.86	2.00	1.94	2.05	1.95	97.3	3.67
	BHA	1.85	1.82	1.95	1.90	1.80	1.84	1.86	93.0	2.98
	BHT	1.52	1.55	1.68	1.62	1.56	1.60	1.59	79.4	3.61
5.00	TBHQ	4.88	4.86	4.90	4.80	4.82	4.75	4.84	96.7	1.15
	BHA	4.70	4.65	4.72	4.68	4.64	4.72	4.69	93.7	0.74
	BHT	3.85	3.88	3.75	3.82	3.78	3.76	3.81	76.1	1.37
8.00	TBHQ	7.68	7.60	7.78	7.85	7.62	7.82	7.73	96.6	1.37
	BHA	7.56	7.66	7.62	7.82	7.66	7.70	7.67	95.9	1.14
	BHT	6.00	5.88	5.86	5.90	5.95	5.79	5.90	73.7	1.24

3 结论

该研究通过对食用油脂苯并(α)芘、抗氧化剂含量检测方法进行优化,试验步骤简单,试剂消耗量少,检测时间大大缩短,检测成本低,并且方法重现性良好、加标回收率较高,具有较高的精密度和准确度。表明上述方法满足实验室对

使用油脂苯并(α)芘、抗氧化剂的定量分析测定。

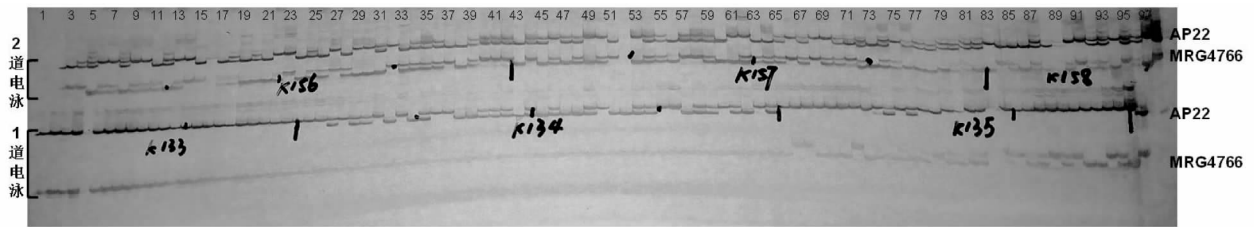
参考文献

[1] 林海宏. 高效液相色谱法快速测定食品中的四种抗氧化剂[J]. 福建轻纺, 2008(7): 10-13.

(下转第117页)

稻瘟病基因 $Pi-1$,但在 $Pi-2$ 基因型分离;K135 株系基本未导入 $Pi-2$,但在 $Pi-1$ 基因型分离;K156、K157、K158 这 3

个株系在 $Pi-1$ 、 $Pi-2$ 均基因型分离;此外,也存在纯合导入供体抗稻瘟病基因 $Pi-1$ 或/和 $Pi-2$ 的株系。



注:第 1 道电泳样品(1~96 孔)为 K133、K134、K135 这 3 个株系的 94 个单株(1~94 孔)以及 2106(95 孔)和 RBR1-2(96 孔)对照在 MRG4766 和 AP22 上的两重 PCR 产物;第 2 道电泳样品(3~98 孔)为 K156、K157、K158 这 3 株系的 94 个单株(3~96 孔)以及 2106(97 孔)和 RBR1-2(98 孔)对照在 MRG4766 和 AP22 上的两重 PCR 产物

Note: Samples in line 1 (channel 1 to 96) were 94 plants of three lines (K133, K134 and K135), 2106 control (channel 95) and RBR1-2 control (channel 96); samples in line 2 (channel 3 to 98) were 94 plants of the other three lines (K156, K157 and K158), 2106 control (channel 97) and RBR1-2 control (channel 98)

图 4 BC3F3 世代 6 个株系在 MRG4766 和 AP22 上的电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis results of 6 BC3F3 lines on MRG4766 and AP22

3 结论与讨论

常规的 SSR 分子标记检测程序中, DNA 提取通常采用简易 CTAB 法或 SDS 法,过程复杂,费时费力,即使采用磁珠法或柱式法等试剂盒法提取 DNA,也同样需要提前进行样品研磨,成本相对较高,而效率较低;此外,一般的单重 PCR 和单道聚丙烯酰胺凝胶电泳或琼脂糖电泳,检测大样本多位点的效率也很低。因此,对于大的育种群体而言,采用常规 SSR 分子标记检测技术,其标记基因型的检测耗时长,成本也相对较高,因而难以大范围、规模化地运用于商业化的育种程序中,尤其难以推广应用于国内中小种子企业的育种科研中。

该文研究了育种群体田间叶片快速 DNA 提取技术,以及抗稻瘟病基因 $Pi-1$ 和 $Pi-2$ 连锁标记 MRG4766 和 AP22 的两重 PCR 及两道聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,结果表明,采用该技术体系提高了检测效率、降低了成本,且检测结果准确可靠,能在水稻抗稻瘟病分子标记辅助育种过程中,对抗稻瘟病双基因 $Pi-1$ 和 $Pi-2$ 进行准确、稳定、快捷、规模化的检测。应用该技术体系,经过 3 年的分子标记辅助回交育种,成功改良了合肥丰乐种业股份有限公司不育系广占 63S 和恢复系 R2106 的稻瘟病抗性,且不需要每个世代均进行稻瘟病

抗性鉴定,从而加快了该公司抗稻瘟病育种进程,并显著降低了成本。总之,该技术体系为促进、推广 SSR 分子标记辅助选择技术在企业育种科研上的应用提供了一个新方法。

参考文献

- [1] 赵二生,王洪昊,张波. 水稻稻瘟病抗病性育种研究进展[J]. 农业科技通讯,2012(8):18-20.
- [2] 何秀英,廖耀平,陈钊明,等. 水稻稻瘟病抗病育种研究进展与展望[J]. 广东农业科学,2011,38(1):30-33.
- [3] 佚名. 日本抗稻瘟病育种[J]. 上海农业科技,1978(S3):46-51.
- [4] 伍尚忠,朱小源,刘斌,等. 籼稻品种三黄占 2 号的稻瘟病持久抗性评价与遗传分析[J]. 中国农业科学,2004,37(4):528-534.
- [5] 郭震华,刘传雪,张兰民,等. 分子标记辅助选择在水稻抗稻瘟病育种中的研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2013(2):135-139.
- [6] YU Z H, MACKILL D J, BONMAN J M, et al. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93(5):859-863.
- [7] YU Z H, MACKILL D J, BONMAN J M, et al. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 1991, 81(4):471-476.
- [8] LIU S P, LI X, WANG Z Y et al. Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan 97 by molecular marker-aided selection[J]. Acta Bot Sin, 2003, 45(11):1346-1350.
- [9] 陈志伟,官华忠,吴为人,等. 稻瘟病抗性基因 $Pi-1$ 连锁 SSR 标记的筛选和应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2005,34(1):74-77.
- [10] WU J H, JIANG J S, CHEN H L, et al. Fine mapping of rice blast resistance gene $Pi-2(t)$ [J]. Acta Agron Sin, 2002, 28(4):505-509.

(上接第 90 页)

- [2] 刘年丰,涂一名,夏虹,等. 高效液相色谱法测定油脂中抗氧化剂 BHA、TBHQ[J]. 分析科学学报,2003,19(6):549-551.
- [3] 陈毓芳,奚星林,李宪华,等. 高效液相色谱法同时测定食用油脂中叔丁基对苯二酚和叔丁基对羟基茴香醚[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(7):1163-1164.

- [4] 国家食品质量监督检验中心. 食品中抗氧化剂丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)的测定: GB/T 23373—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [5] 吴永宁. 现代食品安全科学[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [6] 宋怀恩,闻韧. 抗氧化剂筛选方法的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2003,13(2):119-124.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。