

含油固体食品中 9 种抗氧化剂检测方法优化

叶湖¹, 李晓芹¹, 方志娟¹, 金萍², 钟晓红¹

(1. 苏州市食品检验检测中心, 江苏苏州 215104; 2. 苏州市产品质量监督检验院, 江苏苏州 215104)

摘要 [目的]明确和优化国家标准 GB 5009.32—2016 中含油固体食品 9 种抗氧化剂的检测方法。[方法]样品用 1~2 倍体积石油醚浸泡 4 h 提取油脂, 滤纸过滤后, 滤液氮吹至石油醚挥发完全。浸提的油脂用乙腈直接提取, C₁₈ 固相萃取柱净化。采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 2.7 μm), 以 0.5% 乙酸溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱。[结果]9 种抗氧化剂在 18 min 内完全分离, 有效缩短分析时间, 且信号响应强度增加。在薯片样品中进行方法学验证, 20、40、100 mg/kg 3 个加标水平, 9 种抗氧化剂的回收率为 75.2%~104.7%, RSD 均小于 10% (n=6)。[结论]该方法操作简单、准确度高、检测周期短, 适用于固体食品中抗氧化剂的测定。

关键词 含油固体食品; 抗氧化剂; 检测方法; 优化

中图分类号 TS 207.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)07-0193-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.07.044



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of 9 Antioxidant Detection Methods in Oil-Containing Solid Foods

YE Hu, LI Xiao-qin, FANG Zhi-juan et al (Suzhou Food Inspection and Testing Center, Suzhou, Jiangsu 215104)

Abstract [Objective] To clarify and optimize the detection methods of 9 antioxidants in oil-containing solid foods in the national standard GB 5009.32-2016. [Method] The sample was soaked in 1-2 times the volume of petroleum ether for 4 hours to extract the oil. After filtering with filter paper, the filtrate was blown with nitrogen until the petroleum ether was completely volatilized. The leached oil was directly extracted with acetonitrile and purified by C₁₈ solid phase extraction column. An Agilent Poroshell 120 SB-Aq column (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm) was used for gradient elution with 0.5% acetic acid solution-acetonitrile as the mobile phase. [Result] The 9 antioxidants were completely separated within 18 minutes, which effectively shortened the analysis time and increased the signal response intensity. Method validation was carried out in potato chips samples, with three spiked levels of 20 mg/kg, 40 mg/kg and 100 mg/kg, the recoveries of 9 antioxidants were 75.2%-104.7%, RSD were less than 10% (n=6). [Conclusion] The method has the advantages of simple operation, high accuracy and short detection period, and is suitable for the determination of antioxidants in solid food.

Key words Oil-containing solid foods; Antioxidants; Detection method; Optimization

食用油、焙烤食品、油炸面食品、熟制的坚果与籽类等含不饱和脂肪酸的食品, 容易受空气、温度、光照等因素的影响发生氧化酸败, 产生酮类、醛类和酸类物质, 出现异味, 导致营养价值降低甚至对健康产生危害^[1-2]。加入抗坏血酸棕榈酸酯或酚类抗氧化剂等可以抑制油脂氧化, 延缓酸败, 增加货架期^[3]。抗氧化剂如特丁基对苯二酚(TBHQ)、丁基羟基茴香醚(BHA)、没食子酸丙酯(PG), 过量摄入可能对人体造成健康风险, 如肾损伤、致突变、致癌等^[4-5], 生产过程中要避免出现使用过量的问题。

GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[6]对抗氧化剂的使用进行了明确规定, 对于部分坚果与籽类、糕点、油炸面制品、膨化食品等抗氧化剂的使用限量“以油脂中的含量计”^[7]。目前, 检测食品中抗氧化剂需根据 GB 5009.32—2016《食品安全国家标准 食品中 9 种抗氧化剂的测定》^[8]。在实际应用过程中, 发现该标准的前处理方法为固体食品直接称样后提取净化, 并未有“以油脂中的含量计”相关的例如“油脂提取”的步骤^[9], 与判断标准(GB 2760—2014)不一致。其余还存在二丁基羟基甲苯(BHT)回收率不高、检验效率偏低等问题^[10-11]。含油固体食品在日常消费中占很大部分, 因此很有必要建立一套快速、准确的抗

氧化剂含量的检测方法^[12]。该研究从实际应用角度, 对含油固体食品中 9 种抗氧化剂检测方法进行进一步明确和优化, 为相关实验室人员提供参考。

1 材料与方法**1.1 试验材料**

1.1.1 仪器。UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(沃特世); N-EVAP 型氮吹仪(Organomation); Allegra X-30R 高速冷冻离心机(贝克曼); RiOs 超纯水仪(密理博)。

1.1.2 试材。试验用到的样品购自当地超市。乙腈(色谱级, 默克), 甲醇(分析纯, 国药), 30~60 °C 石油醚(分析纯, 国药); 乙酸(色谱级, TCI)。C₁₈ 固相萃取柱, 2 g/12 mL(艾杰尔)。9 种抗氧化剂标准物质混合标准溶液: 没食子酸丙酯(PG, CAS121-79-9)、2,4,5-三羟基苯丁酮(THBP, CAS1421-63-2)、叔丁基对苯二酚(TBHQ, CAS1948-33-0)、去甲二氢愈创木酸(NDGA, CAS500-38-9)、叔丁基对羟基茴香醚(BHA, CAS25013-16-5)、2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚(Ionox-100, CAS88-26-6)、没食子酸辛酯(OG, CAS1034-01-1)、2,6-二叔丁基对甲基苯酚(BHT, CAS128-37-0)、没食子酸十二酯(DG, CAS1166-52-5), 均为 1 000 μg/mL, 均购自阿尔塔科技公司, 4 °C 避光保存。

1.2 试验方法**1.2.1 标准溶液配制。**

(1) 9 种抗氧化剂混合标准中间液。分别准确移取适量标准溶液, 用乙腈定容, 配制成 100 μg/mL 混合标准储备液,

基金项目 苏州市科技计划项目(SS202121); 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ21125028)。**作者简介** 叶湖(1967—), 男, 江苏苏州人, 高级工程师, 从事食品检验与质量控制研究。**收稿日期** 2022-09-23

棕色储液瓶存储,4℃保存。

(2)9种抗氧化剂系列标准工作液。混合标准中间液用乙腈稀释得到2、5、10、50、100 μg/mL的校准曲线溶液,临用现配。

1.2.2 油脂浸提。样品粉碎后依据含油量取适量置于广口瓶中,加入1~2倍体积30~60℃石油醚,充分混合后静置浸提4 h,取石油醚层滤纸过滤,在40℃以下的水浴中氮吹至石油醚挥发完全,残留油脂即为待测试样。

1.2.3 提取、净化。加入5 mL乙腈,涡旋1 min充分混匀,8 000 r/min离心3 min,收集乙腈层于试管中,再重复使用5 mL乙腈提取,合并2次提取液。用5 mL甲醇活化C₁₈固相萃取柱,再以5 mL乙腈平衡,弃去流出液。将所有提取液倒入柱中,弃去流出液,再以5 mL乙腈+甲醇的混合溶液(体积比2:1)洗脱,收集所有洗脱液于试管中,40℃下氮吹至干,加1 mL乙腈定容,过0.22 μm有机系滤膜,供液相色谱测定。

1.2.4 色谱条件。色谱柱为Agilent Poroshell 120 SB-Aq,100 mm×3.0 mm,2.7 μm(安捷伦)。柱温30℃,进样体积5 μL,流速0.4 mL/min。流动相为0.5%乙酸水(A)、乙腈(B);梯度洗脱:0 min 10%B,9 min 75%B,10 min 95%B,13 min 95%B,14 min 10%B,18 min 10%B,共18 min。

2 结果与分析

2.1 液相条件优化 该研究拟在缩短分析时间的前提下,保证良好峰分离度,需选择柱效更高的色谱柱。通过比较XBridge C₁₈(3.5 μm,2.1 mm×100 mm)、Poroshell 120 SB-Aq(2.7 μm,3.0 mm×100 mm)和Poroshell 120 SB-C₁₈(2.7 μm,3.0 mm×100 mm)发现,当采用0.5%甲酸-甲醇作为流动相时,SB-Aq能够在更短的保留时间获得9种抗氧化剂良好分离。

一般情况下,乙腈具有更强的洗脱性能。将流动相甲醇更换为乙腈后,SB-Aq仍能获得良好的分离度和峰型,且产生的柱压较低。将0.5%甲酸更换为0.1%甲酸时,PG的峰型明显变差,更换为0.5%乙酸后,整体响应变强且分离度良好,能有效区分杂质峰。因此,最终采用0.5%乙酸-乙腈作

为流动相。此外,因色谱柱粒径小且采用梯度洗脱,为获得良好峰型进样量不宜超过5 μL。所得色谱图见图1。

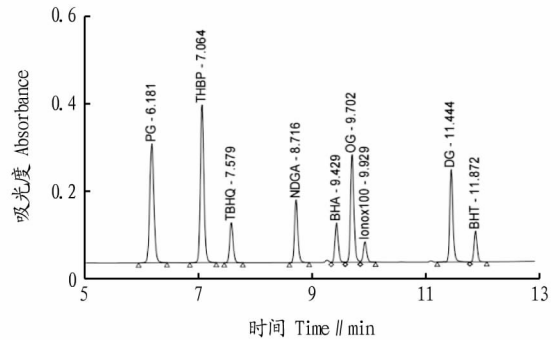


图1 9种抗氧化剂(10 μg/mL)高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of 9 antioxidants (10 μg/mL)

2.2 提取溶剂优化 根据质控样回收结果,发现采用GB 5009.32—2016方法,虽通过3次重复提取,部分样品BHT仍难以获得满意的回收率,回收率在20%~50%,难以准确定量。乙腈饱和的正己烷溶液、正己烷饱和的乙腈溶液进行提取是影响回收率的关键步骤。商军等^[13]在测定饲料中5种合成类抗氧化剂含量时,采用乙腈辅助超声提取,得到的回收率均在70%以上。该研究在采用乙腈重复提取2次后,BHT回收率提高至70%以上,TBHQ回收率约85%,能够满足方法学要求。

2.3 浸提时间优化 标准方法对固体类样品要求是称取1 g样品,但在实际的应用中,是要以油脂中的含量计算的。虽然可以结合营养标签予以换算,但在提取油脂后再进行检测更符合数据的独立性、真实性要求^[7]。实际操作中可根据标签脂肪含量推算浸提所需样品量。

浸提时间影响试验效率。该研究比较了浸提2、4、8和16 h后提取获得的油脂量和对TBHQ结果的影响。结果发现(图2),在试验时间内浸提时间越长,提取到的油脂量越多,但对TBHQ的检出值无明显影响。考虑到检验效率,选择浸提4 h。

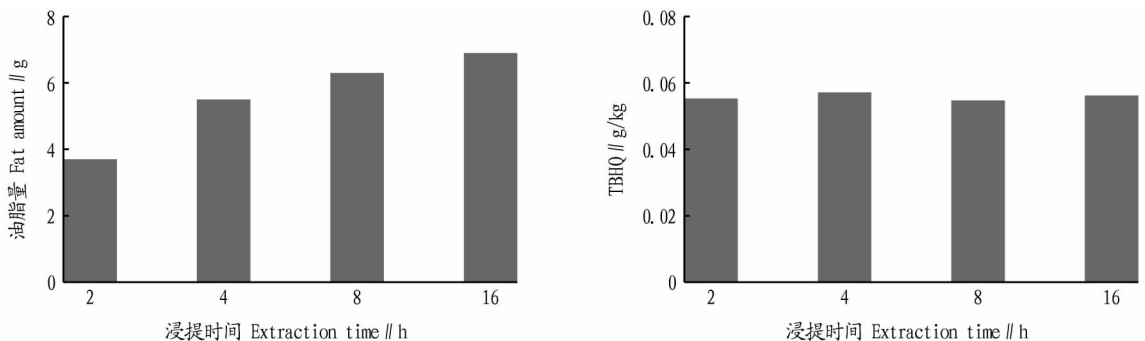


图2 不同浸提时间提取获得的油脂量和对TBHQ结果的影响

Fig. 2 The amount of fat obtained by different extraction time and its influence on the results of TBHQ

2.4 方法学验证 按照“1.2.4”色谱条件对9种抗氧化剂系列标准工作液进行测定,以抗氧化剂的浓度作为横坐标、响应值作为纵坐标绘制标准曲线,获得的标准曲线见表1。

结果表明,9种抗氧化剂在2~100 μg/mL线性关系良好($R^2 > 0.99$)。

分别在阴性薯片样品中加入20、40和100 mg/kg 3个水

平的抗氧化剂混合标准溶液,每个水平重复 6 次,按试验方法进行测定,其回收率和 RSD 结果见表 2。结果表明,9 种抗氧化剂的回收率为 75.2%~104.7%,RSD 均小于 10%,满足方法测定要求。

3 结论与讨论

该研究通过优化流动相、色谱柱,缩短了 9 种抗氧化剂的分析时间至 18 min。在 18 min 内,9 种抗氧化剂有效分离,峰型良好,响应强度增加。明确了固体含油食品的油脂浸提步骤,加入 1~2 倍体积的石油醚提取 4 h 后氮吹至溶剂挥发完全。采用乙腈提取抗氧化剂,可明显提高 BHT 的回收率。经薯片样品进行方法学验证,9 种抗氧化剂的回收率为 75.2%~104.7%,RSD 均小于 10%,满足方法测定要求。

表 1 9 种抗氧化剂的保留时间和线性方程

Table 1 Retention times and linear equations of 9 antioxidants

| 抗氧化剂 Antioxidant | 保留时间 Retention time/min | 标准曲线 Standard curve | R^2 |
|---------------------|-------------------------------|------------------------|---------|
| PG | 6.181 | $y=33\ 057x-43\ 460$ | 0.999 5 |
| THBP | 7.064 | $y=37\ 554x-52\ 546$ | 0.999 6 |
| TBHQ | 7.579 | $y=9\ 128x-11\ 872$ | 0.999 6 |
| NDGA | 8.716 | $y=13\ 800x-19\ 032$ | 0.999 4 |
| BHA | 9.429 | $y=8\ 684x-10\ 479$ | 0.999 7 |
| OG | 9.702 | $y=24\ 143x-39\ 415$ | 0.999 4 |
| Ionox-100 | 9.929 | $y=4\ 575x-6\ 352$ | 0.999 5 |
| DG | 11.444 | $y=19\ 474x-30\ 587$ | 0.999 6 |
| BHT | 11.872 | $y=6\ 083x-6\ 917$ | 0.999 7 |

表 2 薯片样品中 9 种抗氧化剂的回收率和精密度试验 ($n=6$)

Table 2 Recovery rates and precision test of 9 antioxidants in potato chips samples

单位:%

| 抗氧化剂 Antioxidant | 20 mg/kg | | 40 mg/kg | | 100 mg/kg | |
|---------------------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| | 回收率 Recovery rate | RSD | 回收率 Recovery rate | RSD | 回收率 Recovery rate | RSD |
| PG | 91.8 | 2.12 | 93.0 | 2.47 | 93.7 | 4.15 |
| THBP | 95.6 | 2.21 | 96.5 | 2.52 | 95.6 | 4.30 |
| TBHQ | 85.4 | 3.00 | 85.5 | 2.56 | 83.3 | 4.08 |
| NDGA | 82.2 | 3.11 | 85.7 | 2.58 | 88.7 | 4.11 |
| BHA | 82.9 | 2.08 | 80.7 | 2.67 | 84.6 | 4.67 |
| OG | 104.7 | 2.62 | 102.7 | 2.31 | 98.5 | 4.66 |
| Ionox-100 | 92.2 | 2.17 | 92.8 | 2.52 | 92.9 | 4.36 |
| DG | 83.6 | 2.99 | 83.3 | 2.59 | 83.5 | 5.06 |
| BHT | 78.1 | 2.12 | 79.4 | 2.73 | 75.2 | 4.39 |

参考文献

- 常馨月,陈程莉,龚娣,等.天然抗氧化剂抑制油脂氧化的研究进展[J].中国油脂,2020,45(4):46-50.
- 邵亮亮,杜京霖,张谷平,等.高效液相色谱法同时快速测定植物油中的三种抗氧化剂[J].粮食与食品工业,2019,26(6):49-53,58.
- 崔利辉,李璐琦,胡娜.超高效液相色谱法测定食用油中 9 种抗氧化剂[J].中国食品,2021(11):84-85.
- 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.
- 辛丽娜,刘常凯,何林飞.HPLC 法同时测定月饼中 9 种抗氧化剂的研究方法[J].中国食品添加剂,2019,30(9):176-181.
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- 石金娥,王莹,王庆峰,等.油脂提取前粉碎和去壳对熟制坚果与籽类食品中抗氧化剂测定的影响[J].中国卫生检验杂志,2021,31(16):1944-1946,1970.
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中 9 种抗氧化剂的测定:GB 5009.32—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- 王雅雯.食品中油脂提取及过氧化值检测方法的优化[J].现代食品,2022,28(2):127-129.
- 钟慈平,成长玉,苏欣,等.高效液相色谱法测定食用油中抗氧化剂的国家标准方法的优化研究[J].理化检验(化学分册),2021,57(6):519-525.
- 晁桂梅.高效液相色谱法测定食用油中 9 种抗氧化剂[J].分析仪器,2020(6):28-31.
- 陈果,毛红.QuEChERS-高效液相色谱法快速检测食用油中 4 种抗氧化剂[J].食品安全质量检测学报,2018,9(21):5587-5591.
- 高军,张浩然,田恺,等.高效液相色谱法同时测定饲料中 5 种合成类抗氧化剂含量[J].中国饲料,2022(17):80-88.
- STAHN A,SCHRÖDER U.Development of a MALDI-TOF MS-based protein fingerprint database of common food fish,allowing fast and reliable identification of fraud and substitution[J].J Agr Food Chem,2017,65(34):7519-7527.
- SALLA V,MURRAY K K.Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of shrimps[J].Anal Chim Acta,2013,794:55-59.
- 刘秀明,李涛,李源栋,等.基于 NIR 分析和模式识别技术的葛根品种及产地判别[J].食品工业科技,2018,39(22):247-251.
- 郑岩,汤庆莉,吴天祥,等.GC-MS 法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J].中国酿造,2008,27(9):74-76,91.
- 孙灵霞,陈锦屏,赵改名,等.化学计量学在食品分析中的应用研究进展[J].食品工业科技,2012,33(7):444-448,452.

(上接第 192 页)