

# 液相色谱法检测食用油中9种抗氧化剂的优化

陆秀青, 韦云莹, 农子明\*, 马炜焯

(广西壮族自治区粮油质量检验中心, 南宁 530031)

**摘要:** **目的** 明确和优化油类样品9种抗氧化剂的检测方法。**方法** 油类样品用3 mL乙腈饱和的正己烷溶液溶解后, 用3 mL含AP的正己烷饱和的乙腈重复提取5次, 合并5次提取液。用C18固相萃取柱净化, 全部提取液和洗脱液一起收集浓缩至0.2 mL, 最后用乙腈定容至2 mL。**结果** 9种抗氧化剂在1.0~60.0  $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.99; 回收率91.2%~108.8%之间, 相对标准偏差(RSD)为0.6%~10.0%; 检出限在0.2~2.0 mg/kg范围, 定量限在0.6~6.0 mg/kg范围。**结论** 本方法通过优化提取次数、净化方法和洗脱体积, 9种抗氧化剂的回收率均有显著提高, 其中提取次数对BHT、DG的回收率影响较大。

**关键词:** 食用油; 抗氧化剂; 优化; 提取次数; C18固相萃取柱

## Optimization of liquid chromatography for the determination of nine antioxidants in edible oils

LU Xiu-Qing, WEI Yun-Ying, NONG Zi-Ming\*, MA Wei-Ye

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Grain and Oil Quality Inspection Center, Nanning 530031, China)

**ABSTRACT: Objective** Clarify and optimize the detection methods for 9 antioxidants in oil samples. **Methods** After dissolving the oil sample in 3 mL of n-hexane solution saturated with acetonitrile, repeat the extraction 5 times with 3 mL of n-hexane saturated acetonitrile containing AP, and merge the 5 extraction solutions. Purify with a C18 solid-phase extraction column, collect and concentrate all extraction and eluent together to 0.2 mL, and finally make up to 2 mL with acetonitrile. **Results** 9 antioxidants linear relationship is good within the range of 1.0 to 60.0  $\mu\text{g/mL}$ , and the correlation coefficients are all greater than 0.99; the recovery rate ranges from 91.2% to 108.8%, with a relative standard deviation (RSD) of 0.6% to 10.0%; the detection limit is within the range of 0.2~2.0 mg/kg, and the quantitative limit is within the range of 0.6~6.0 mg/kg. **Conclusion** This method optimizes the extraction frequency, purification method, and elution volume, and significantly improves the recovery rates of 9 antioxidants. The extraction frequency has a significant impact on the recovery rate of BHT and DG.

**KEY WORDS:** edible oil; antioxidant; optimization; extraction frequency; C18 solid-phase extraction column

## 0 引言

食用油是人类日常饮食中不可或缺的重要营养源之一。然而, 在食用油的生产、储存和使用过程中会自发地发生氧化反

应, 生成低级脂肪酸、醛和酮等化合物, 产生恶劣的酸臭味, 严重影响了食用油的品质与安全性<sup>[1]</sup>。为了延长食用油的保质期, 食用油生产商普遍添加一些抗氧化剂用以延缓氧化酸败的进程<sup>[2]</sup>。按来源不同, 抗氧化剂可分为人工合成抗氧化剂(如

\*通信作者: 农子明, 工程师, 研究方向为粮油质量分析。E-mail: 347998976@qq.com

\*Corresponding author: NONG Zi-Ming, Engineer, Guangxi Zhuang Autonomous Region Grain and Oil Quality Inspection Center, Nanning 530031, China. E-mail: 347998976@qq.com

TBHQ、BHA、BHT 和 PG 等) 和天然抗氧化剂(如茶多酚、维生素 E、维生素 C 等)。人工合成抗氧化剂因其抗氧化效果好且成本较低, 被广泛使用<sup>[3]</sup>, 这些化合物都含有酚羟基(-OH)或者氨基(-NH<sub>2</sub>)等能够捕获自由基的官能团。例如 BHA 和 BHT 分子中都含有两个叔丁基取代的酚羟基, 能够有效捕获过氧自由基, 阻止油脂的氧化反应。TBHQ 分子中含有一个酚羟基和一个酰胺基团, 具有良好的溶解性和热稳定性。PG 分子中含有两个酚羟基, 具有较强的抗氧化活性<sup>[4]</sup>。然而, 过量摄入抗氧化剂可能会对人体健康造成风险, 如肾损伤、致癌等<sup>[5-6]</sup>。

目前, 测定抗氧化剂的主要方法有: 比色法、薄层色谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱法。比色法适用范围有限, 检出限较高, 较少用于精确测定; 薄层色谱法可在较短时间内处理大批量样品, 一般用于粗略定量; 气相色谱法和气相色谱-质谱联用法检出限较低, 但前处理过程繁琐。液相色谱法前处理较简单, 适用范围广, 检出限低, 因此仍是现今主要的检测方法。本研究在目标物提取时添加 AP(抗坏血酸棕榈酸酯)<sup>[7]</sup>, 降低抗氧化剂在提取和浓缩过程中被氧化的程度, 以及优化液相色谱法前处理提取次数、净化方法和洗脱次数这三个关键因素, 降低了检出限, 成功提高了 9 种抗氧化剂的回收率。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

日常检测到中收集的不含 9 种抗氧化剂的花生油、菜籽油。

#### 1.1.1 实验试剂和耗材

乙腈(色谱纯, 美国 Fisher); 正己烷(色谱纯, 美国 Fisher); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher); Cleanert S C18-N-SPE 固相萃取柱(2000 mg/12 mL, 天津博纳艾杰尔); 孔径 0.22 μm 有机系滤膜。

9 抗氧化剂混标(上海安谱), 1000 μg/mL, 没食子酸丙酯(PG)、2,4,5-三羟基苯丁(THBP)、叔丁基对苯二酚(TBHQ)、去甲二氢愈创木酸(NDGA)、叔丁基对羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚(Ionox-100)、没食子酸辛酯(OG)、2,6-二叔丁基对甲基苯(BHT)、没食子酸十二酯(DG)。

#### 1.1.2 主要实验仪器和用具

1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦), DMT-2500 多管涡旋混合仪(杭州米欧仪器有限公司), N-EVAP 24-RT 氮吹仪(美国 Organomation 公司), Mutifuge X1R 离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

50 mL 离心管, 玻璃滴管, 1.5 mL 样品瓶, 10 mL 容量瓶。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 标准溶液的配制

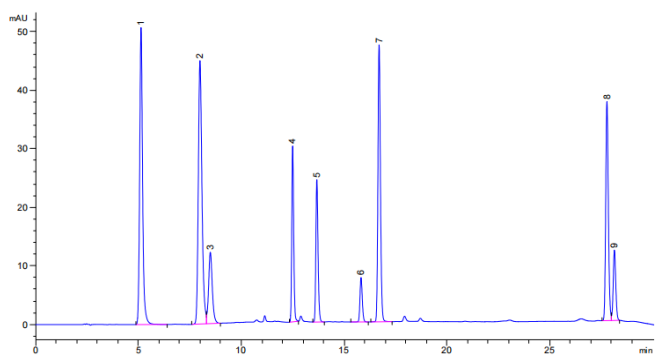
100 μg/mL 9 种抗氧化剂标准储备液: 准确吸取 1 mL 质量

浓度为 1000 μg/mL 的 9 种抗氧化剂标准品于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 摇匀, -18°C 避光保存。

10 μg/mL 9 种抗氧化剂标准中间储备液: 准确吸取 1 mL 质量浓度为 100 μg/mL 的 9 种抗氧化剂标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 摇匀, -18°C 避光保存。

1 μg/mL 9 种抗氧化剂标准中间储备液: 准确吸取 1 mL 质量浓度为 10 μg/mL 的 9 种抗氧化剂标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 摇匀, -18°C 避光保存。

9 种抗氧化剂标准工作液: 移取适量的 100 μg/mL 9 种抗氧化剂标准中间储备液, 配制成质量浓度为 1、2、6、10、40、60 μg/mL 标准工作系列溶液(质量浓度为 40 μg/mL 的 9 种抗氧化剂色谱图详见图 1)。



注: 1. PG; 2. THBP; 3. TBHQ; 4. NDGA; 5. BHA; 6. Ionox-100; 7. OG; 8. BHT; 9. DG

图 1 质量浓度为 40 μg/mL 的 9 种抗氧化剂色谱图

Fig.1 Chromatograms of 9 antioxidants with a mass concentration of 40 μg/mL

#### 1.2.2 样品前处理

提取: 准确称取混合均匀的试样 1 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 3 mL 乙腈饱和的正己烷溶液溶解样品, 涡旋 1 min, 静置 10 min 后用 3 mL 含 AP 的正己烷饱和的乙腈溶液涡旋提取 2 min, 3000 r/min 离心 5 min, 将乙腈层收集于另一 50 mL 离心管中, 再重复使用含 AP 的 3 mL 正己烷饱和的乙腈溶液提取 4 次, 合并 5 次提取液, 待上样净化<sup>[6]</sup>。

固相萃取柱活化: 将 C18 固相萃取小柱上端预装 2 g 无水硫酸钠, 再用 5 mL 甲醇活化柱子, 再使用 5 mL 乙腈平衡柱子, 弃去流出液。

净化: 将待净化液上柱, 并用 15 mL 乙腈: 甲醇(体积比 2:1)洗脱, 收集全部上样液和洗脱液, 在 40°C 下蒸发至 1 mL 左右, 转移至 15 mL 刻度试管中, 用少量乙腈润洗蒸瓶 3 次, 合并后 40°C 氮吹至干, 用乙腈定至 2 mL, 涡旋 30 s, 过 0.22 μm 有机膜后待测定。

#### 1.2.3 仪器条件

LC 条件: 色谱柱: ZORBAX Extend-C18 色谱柱, 柱长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温:

35°C; 检测波长: 280 nm, 进样量: 5  $\mu$ L; 柱温: 60°C 保持 1 min, 以 20°C/min 的速度升到 220°C 保持 1 min, 以 5°C/min 的速度升到 250°C 保持 1 min, 以 20°C/min 的速度升到 290°C 保持 3.5 min。

流动相: A: 0.5% 甲酸水; B: 甲醇。

洗脱梯度: 0~5 min 流动相 (A) 50%, 5~15 min: 流动相 (A) 从 50% 降至 20%, 15~20 min 流动相 (A) 20%, 20~25 min: 流动相 (A) 从 20% 降至 10%, 25~27 min: 流动相 (A) 从 10% 增至 50%, 27~30 min: 流动相 (A) 50%。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取方法的优化

准确吸取 100  $\mu$ g/mL 的 9 种抗氧化剂标准储备液 0.40 mL 于 1.00 g 菜籽油试样中进行验证实验, 理论加标量为 40 mg/kg, 结果详见表 1。

从表 1 的加标回收实验结果可以看出 9 种抗氧化剂的回收率随着提取次数的增多而增高, 在提取次数为 5 次时, 回收率已基本稳定<sup>[7-8]</sup>。

表 1 理论加标量为 40 mg/kg 的 9 种抗氧化剂的加标回收率 (%)

Table 1 The recovery rate of 9 antioxidants with a theoretical spiked amount of 40 mg/kg (%)

序号	化合物	优化方法			
		提取次数 3 (次)	提取次数 4 (次)	提取次数 5 (次)	提取次数 6 (次)
1	PG	93.6	96.6	104.3	102.4
2	THBP	93.3	99.9	95.8	108.2
3	TBHQ	92.9	95.8	96.7	98.5
4	NDGA	96.0	108.2	114.7	115.6
5	BHA	91.4	92.3	97.0	98.6
6	Ionox-100	101.9	103.0	107.1	107.3
7	OG	102.1	105.3	117.1	114.1
8	BHT	91.4	92.3	97.0	98.6
9	DG	79.4	82.8	98.9	106.4

### 2.2 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限

以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 峰面积应与相应质量浓度呈良好的线性关系, 且相关系数均大于 0.99, 相关系数、方法检出限和定量限列于表 2。结果表明: 9 种抗氧化剂在 1.0~60.0  $\mu$ g/mL 范围内, 各物质线性关系良

好, 相关系数均大于 0.99, 检出限通过空白样品加标的方式, 以及显示基线噪声的分析方法, 以信噪比 3 倍为检出限, 在称样量 1.00 g, 最终定容体积 2 mL 的方法下, 花生油 9 种抗氧化剂检出限在 0.4~2.0  $\mu$ g/kg, 菜籽油 9 种抗氧化剂检出限在 0.2~1.0  $\mu$ g/kg, 定量限则以 3 倍检出限计算得出<sup>[9]</sup>。

表 2 9 种抗氧化剂的保留时间、线性回归方程、相关系数

Table 2 Retention time, linear regression equation, and correlation coefficient of 9 antioxidants

序号	化合物	保留时间 (min)	线性回归方程	相关系数 r	花生油		菜籽油	
					检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
1	PG	5.109	y=12.42534x	0.99959	0.4	1.2	0.2	0.6
2	THBP	7.963	y=13.43456x	0.99556	0.4	1.2	0.2	0.6
3	TBHQ	8.464	y=3.75304x	0.99842	0.8	2.4	0.4	1.2
4	NDGA	12.497	y=4.90455x	0.99909	0.4	1.2	0.2	0.6
5	BHA	13.674	y=4.44104x	1.00000	0.6	1.8	0.3	0.9
6	Ionox-100	15.829	y=1.48173x	0.99999	2.0	6	1.0	3
7	OG	16.707	y=9.87541x	0.99962	0.4	1.2	0.2	0.6
8	BHT	27.797	y=7.98966x	0.99945	0.8	2.4	0.4	1.2
9	DG	28.161	y=2.31516x	0.99997	0.8	2.4	0.4	1.2

### 2.3 回收率和相对标准偏差

以花生油、菜籽油空白样品为试样, 向试样中加入不同体积 9 种抗氧化剂标准物质, 得到质量浓度为 20、40 和 80 mg/kg

不同梯度的加标试样, 按照 1.2.2 的步骤, 每个加标浓度水平测定 3 次。实验结果表明该方法具有较好的准确度和精密度, 满足开展分析实验的要求, 结果详见表 3<sup>[10]</sup>。

表3 9种抗氧化剂的加标回收率、相对标准偏差(n=3)  
Table 3 Recovery rates and relative standard deviation of 9 antioxidants (n=3)

序号	化合物名称	油脂种类	加标量					
			20 mg/kg		40 mg/kg		80 mg/kg	
			平均回收率 (%)	平均相对标准偏差 (%)	平均回收率 (%)	平均相对标准偏差 (%)	平均回收率 (%)	平均相对标准偏差 (%)
1	PG	花生油	95.1	8.0	99.5	5.8	103.0	2.3
		菜籽油	96.6	1.3	102.0	1.9	102.6	7.6
2	THBP	花生油	95.9	3.9	104.4	8.2	93.2	3.1
		菜籽油	92.9	0.6	96.5	1.7	105.7	8.0
3	TBHQ	花生油	97.2	5.9	95.0	6.6	105.3	2.4
		菜籽油	93.2	2.0	95.3	2.4	97.2	9.4
4	NDGA	花生油	103.8	5.4	99.1	9.7	102.0	6.9
		菜籽油	105.1	5.2	105.7	0.7	104.5	8.7
5	BHA	花生油	94.6	6.9	94.0	6.7	98.2	1.0
		菜籽油	98.0	0.9	98.9	0.7	97.2	8.9
6	IonoX-100	花生油	96.1	3.7	101.7	5.3	105.9	1.0
		菜籽油	107.6	2.0	108.8	0.7	104.2	9.0
7	OG	花生油	102.8	2.9	100.9	10.0	105.0	2.0
		菜籽油	102.6	8.2	107.3	1.6	106.6	8.8
8	BHT	花生油	93.6	8.9	91.2	5.2	96.8	2.2
		菜籽油	98.0	0.9	98.9	0.7	97.2	8.9
9	DG	花生油	98.2	6.7	94.5	5.1	94.5	1.1
		菜籽油	104.3	3.7	95.0	1.0	93.0	9.1

### 3 结论

由于前处理固相萃取法洗脱模式有两种：一种是目标物比干扰物与吸附剂之间的亲和力更强，因而被保留，洗脱时采用对目标物亲和力更强的溶剂洗脱，另一种是干扰物比目标物与吸附剂之间的亲和力更强，则目标物被直接的洗脱。本实验在提取时加入保护剂 AP，并通过后一种洗脱原理优化提取次数为 5 次，待净化液通过 C18 固相萃取小柱净化，用 15 mL 乙腈：甲醇（体积比 2：1）洗脱、浓缩、定容后测定。结果表明，9 种抗氧化剂在 1.00~60.00  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内，曲线相关系数均大于 0.99，9 种抗氧化剂的回收率随着提取次数的增多而增高，在提取次数为 5 次时，回收率已基本稳定。在 20~80 mg/kg 加标水平下，两种油脂回收率在 91.2%~108.8% 之间，符合 GB/T 27417-2017 对检验方法回收率的要求，相对标准偏差在 0.6%~10.0% 之间，相对偏差小于等于 10%，满足方法测定要求。综上，所优化的方法可用于食用油中 9 种抗氧化剂的定量分析。

### 参考文献

- [1] 叶湖, 李晓芹, 方志娟, 等. 含油固体食品中 9 种抗氧化剂检测方法优化 [J]. 安徽农业科学, 2023, 51(07): 193-195.
- [2] 李银聪, 阚建全, 柳中. 食品抗氧化剂作用机理及天然抗氧化剂 [J]. 中国食物与营养, 2011, 17(02): 24-26.
- [3] 吕凯凯, 刘有根, 李调调, 等. 利用高效液相色谱法对饲料添加剂中 5 种抗氧化剂的测定 [J]. 浙江农业科学, 2023, 64(08):

1995-1998.

- [4] 曾伟山, 黄娜丽, 马芬丽, 等. 抗氧化剂对瓜蒌籽油的抗氧化效果研究 [J]. 现代食品, 2022, 28(23): 164-166.
- [5] 鲁昱方, 张婧菲, 王恬. 复合抗氧化剂及其对饲用油脂抗氧化协同功效的研究进展 [J]. 饲料工业, 2023, 44(10): 22-30.
- [6] 黄进, 杨国宇, 李宏基, 等. 抗氧化剂作用机制研究进展 [J]. 自然杂志, 2004, 26(02): 74-78.
- [7] 左玉, 吴俏卓, 王接昌, 等. 抗氧化剂在食品中的应用 [J]. 粮食与油脂, 2022, 35(04): 32-34, 38.
- [8] 商军, 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.
- [9] 卢珊, 伍志航, 刘海卿. 高效液相色谱法测定食用油中 7 种抗氧化剂的含量 [J]. 现代食品, 2022, 28(19): 190-194.
- [10] 赵冬吉. 食用油中 5 种合成抗氧化剂同时检测方法研究 [J]. 中国油脂, 2021, 46(02): 139-142.

### 作者简介



陆秀青, 工程师, 研究方向为粮油质量分析。

农子明, 工程师, 研究方向为粮油质量分析。