



中华人民共和国国家标准

GB 5009.32—2016

食品安全国家标准 食品中 9 种抗氧化剂的测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

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 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5009.32—2003《油脂中没食子酸丙酯(PG)的测定》和 GB/T 23373—2009《食品中抗氧化剂丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)与叔丁基对苯二酚(TBHQ)的测定》。

本标准与 GB/T 5009.32—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中 9 种抗氧化剂的测定”;
- 增加了抗氧化剂的种类;
- 增加了方法的适用范围;
- 增加了液相色谱法、气相色谱法、液相色谱串联质谱法和气相色谱质谱联用法。

食品安全国家标准

食品中 9 种抗氧化剂的测定

1 范围

本标准规定了食品中没食子酸丙酯(PG)、2,4,5-三羟基苯丁酮(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-羟基苯酚(Ionox-100)、没食子酸辛酯(OG)、2,6-二叔丁基对甲基苯酚(BHT)、没食子酸十二酯(DG) 9 种抗氧化剂的 5 种测定方法——高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法、气相色谱质谱法、气相色谱法以及比色法。

本标准液相色谱法适用于食品中 PG、THBP、TBHQ、NDGA、BHA、BHT、Ionox-100、OG、DG 的测定；液相色谱串联质谱法适用于食品中 THBP、PG、OG、NDGA、DG 的测定；气相色谱质谱法适用于食品中 BHA、BHT、TBHQ、Ionox-100 的测定；气相色谱法适用于食品中 BHA、BHT、TBHQ 的测定；比色法适用于油脂中 PG 的测定。

第一法 高效液相色谱法

2 原理

油脂样品经有机溶剂溶解后,使用凝胶渗透色谱(GPC)净化;固体类食品样品用正己烷溶解,用乙腈提取,固相萃取柱净化。高效液相色谱法测定,外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 甲酸(HCOOH)。
- 3.1.2 乙腈(CH₃CN)。
- 3.1.3 甲醇(CH₃OH)。
- 3.1.4 正己烷(C₆H₁₄):分析纯,重蒸。
- 3.1.5 乙酸乙酯(CH₃COOCH₂CH₃)。
- 3.1.6 环己烷(C₆H₁₂)。
- 3.1.7 氯化钠(NaCl):分析纯。
- 3.1.8 无水硫酸钠(Na₂SO₄):分析纯,650 °C灼烧 4 h,贮存于干燥器中,冷却后备用。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙腈饱和的正己烷溶液:正己烷中加入乙腈至饱和。
- 3.2.2 正己烷饱和的乙腈溶液:乙腈中加入正己烷至饱和。

3.2.3 乙酸乙酯和环己烷混合溶液(1+1):取 50 mL 乙酸乙酯和 50 mL 环己烷混匀。

3.2.4 乙腈和甲醇混合溶液(2+1):取 100 mL 乙腈和 50 mL 甲醇混合。

3.2.5 饱和氯化钠溶液:水中加入氯化钠至饱和。

3.2.6 甲酸溶液(0.1+99.9):取 0.1 mL 甲酸移入 100 mL 容量瓶,定容至刻度。

3.3 标准品

3.3.1 叔丁基对羟基茴香醚:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.2 2,6-二叔丁基对甲基苯酚:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.3 没食子酸辛酯:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.4 没食子酸十二酯:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.5 没食子酸丙酯:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.6 去甲二氢愈创木酸:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.7 2,4,5-三羟基苯丁酮:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.8 叔丁基对苯二酚:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.3.9 2,6-二叔丁基-4-羟基苯酚:纯度 $\geq 98\%$ 。

注:英文名字、分子式和 CAS 号见附录 A。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 抗氧化剂标准物质混合储备液:准确称取 0.1 g(精确至 0.1 mg)固体抗氧化剂标准物质,用乙腈溶于 100 mL 棕色容量瓶中,定容至刻度,配制成浓度为 1 000 mg/L 的标准混合储备液,0℃~4℃避光保存。

3.4.2 抗氧化剂混合标准使用液:移取适量体积的浓度为 1 000 mg/L 的抗氧化剂标准物质混合储备液分别稀释至浓度为 20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L 的混合标准使用液。

3.5 材料

3.5.1 C₁₈固相萃取柱:2 000 mg/12 mL。

3.5.2 有机系滤膜:孔径 0.22 μm。

4 仪器和设备

4.1 离心机:转速 $\geq 3\,000$ r/min。

4.2 旋转蒸发器。

4.3 高效液相色谱仪。

4.4 凝胶渗透色谱仪。

4.5 分析天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

4.6 涡旋振荡器。

5 分析步骤

5.1 试样制备

固体或半固体样品粉碎混匀,然后用对角线法取四分之二或六分之二,或根据试样情况取有代表性试样,密封保存;液体样品混合均匀,取有代表性试样,密封保存。

5.2 测定步骤

5.2.1 提取

5.2.1.1 固体类样品:称取 1 g(精确至 0.01 g)试样(5.1)于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷溶液,涡旋 1 min 充分混匀,浸泡 10 min。加入 5 mL 饱和氯化钠溶液,用 5 mL 正己烷饱和的乙腈溶液涡旋 2 min,3 000 r/min 离心 5 min,收集乙腈层于试管中,再重复使用 5 mL 正己烷饱和的乙腈溶液提取 2 次,合并 3 次提取液,加 0.1%甲酸溶液调节 pH=4,待净化。同时做空白试验。

5.2.1.2 油类:称取 1 g(精确至 0.01 g)试样(5.1)于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷溶液溶解样品,涡旋 1 min,静置 10 min,用 5 mL 正己烷饱和的乙腈溶液涡旋提取 2 min,3 000 r/min 离心 5 min,收集乙腈层于试管中,再重复使用 5 mL 正己烷饱和的乙腈溶液提取 2 次,合并 3 次提取液,待净化。同时做空白试验。

5.2.2 净化

在 C₁₈ 固相萃取柱中装入约 2 g 的无水硫酸钠,用 5 mL 甲醇活化萃取柱,再以 5 mL 乙腈平衡萃取柱,弃去流出液。将所有提取液(5.2.1)倾入柱中,弃去流出液,再以 5 mL 乙腈和甲醇的混合溶液洗脱,收集所有洗脱液于试管中,40 °C 下旋转蒸发至干,加 2 mL 乙腈定容,过 0.22 μm 有机系滤膜,供液相色谱测定。

5.2.3 凝胶渗透色谱法(纯油类样品可选)

称取样品(5.1)10 g(精确至 0.01 g)于 100 mL 容量瓶中,以乙酸乙酯和环己烷混合溶液定容至刻度,作为母液;取 5 mL 母液于 10 mL 容量瓶中以乙酸乙酯和环己烷混合溶液定容至刻度,待净化。

取 10 mL 待测液加入凝胶渗透色谱(GPC)进样管中,使用 GPC 净化(凝胶渗透色谱净化条件见附录 B),收集流出液,40 °C 下旋转蒸发至干,加 2 mL 乙腈定容,过 0.22 μm 有机系滤膜,供液相色谱测定。同时做空白试验。

5.3 液相色谱仪条件

- a) 色谱柱:C₁₈柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或等效色谱柱;
- b) 流动相 A:0.5%甲酸水溶液,流动相 B:甲醇;
- c) 洗脱梯度:0~5 min 流动相(A)50%,5 min~15 min:流动相(A)从 50%降至 20%,15 min~20 min 流动相(A)20%,20 min~25 min:流动相(A)从 20%降至 10%,25 min~27 min:流动相(A)从 10%增至 50%,27 min~30 min:流动相(A)50%;
- d) 柱温:35 °C;
- e) 进样量:5 μL;
- f) 检测波长:280 nm。

5.4 标准曲线的制作

将系列浓度的标准工作液分别注入液相色谱仪中,测定相应的抗氧化剂,以标准工作液的浓度为横坐标,以响应值(如:峰面积、峰高、吸收值等)为纵坐标,绘制标准曲线。9 种抗氧化剂液相色谱图见附录 C。

5.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中,得到相应色谱峰的响应值,根据标准曲线得到待测液中抗氧化

剂的浓度。

6 分析结果的表述

试样中抗氧化剂含量按式(1)计算：

$$X_i = \rho_i \times \frac{V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X_i —— 试样中抗氧化剂含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；
 - ρ_i —— 从标准曲线上得到的抗氧化剂溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；
 - V —— 样液最终定容体积,单位为毫升(mL)；
 - m —— 称取的试样质量,单位为克(g)。
- 结果保留三位有效数字(或保留到小数点后两位)。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

8 其他

本方法的检出限为没食子酸丙酯(PG):2 mg/kg,2,4,5-三羟基苯丁酮(THBP):4 mg/kg,叔丁基对苯二酚(TBHQ):10 mg/kg,去甲二氢愈创木酸(NDGA):4 mg/kg,叔丁基对羟基茴香醚(BHA):10 mg/kg,2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚(Ionox-100):20 mg/kg,没食子酸辛酯(OG):2 mg/kg,2,6-二叔丁基对甲基苯酚(BHT):4 mg/kg,没食子酸十二酯(DG):10 mg/kg;定量限均为 20 mg/kg。

第二法 液相色谱串联质谱法

9 原理

油脂样品经有机溶剂溶解后,使用凝胶渗透色谱(GPC)净化;固体类食品样品用正己烷溶解,用乙腈提取,固相萃取柱净化。液相色谱串联质谱联用仪测定,外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 试剂

同 3.1

10.2 试剂配制

同 3.2

10.3 标准品

10.3.1 没食子酸辛酯:纯度 $\geq 98\%$ 。

10.3.2 没食子酸十二酯:纯度 $\geq 98\%$ 。

10.3.3 没食子酸丙酯:纯度 $\geq 98\%$ 。

10.3.4 去甲二氢愈创木酸:纯度 $\geq 98\%$ 。

10.3.5 2,4,5-三羟基苯丁酮:纯度 $\geq 98\%$ 。

注:英文名字、分子式和CAS号参见附录A。

10.4 标准溶液配制

10.4.1 标准物质储备液:准确称取0.1 g(精确至0.1 mg)固体抗氧化剂标准物质,用乙腈溶于100 mL棕色容量瓶中,定容至刻度,配置成浓度为1 000 mg/L的标准储备液,0℃~4℃避光保存。

10.4.2 标准物质中间液:移取标准物质储备液1.0 mL于100 mL容量瓶中,用乙腈定容,配制成浓度为10 mg/L的混合标准中间液,0℃~4℃避光保存。

10.4.3 标准物质使用液:移取适量体积的标准物质中间液分别稀释至浓度为0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L的混合标准使用液。

10.5 材料

同3.5。

11 仪器和设备

11.1 离心机:转速 $\geq 3\,000$ r/min。

11.2 旋转蒸发仪。

11.3 液相色谱串联质谱仪。

11.4 凝胶渗透色谱仪。

11.5 分析天平:感量为0.01 g和0.1 mg。

11.6 涡旋振荡器。

12 分析步骤

12.1 试样制备

同5.1。

12.2 测定步骤

同5.2。

12.3 液相色谱-串联质谱仪条件

- a) 色谱柱: C_{18} 键合硅胶色谱柱,柱长50 mm,内径2.0 mm,粒径1.8 μm ,或等效色谱柱;
- b) 流动相A:水,流动相B:乙腈;
- c) 流速:0.2 mL/min;
- d) 洗脱梯度:0~3 min:流动相(B)从10%至30%,3 min~5 min:流动相(B)30%,5 min~

10 min: 流动相(B)从 30%至 80%,10 min~12 min:流动相(B)80%,12 min~12.01 min 流动相(B)从 80%至 10%,12.01 min~14 min:流动相(B)10%;

- e) 柱温:35 ℃;
- f) 进样量:2 μL;
- g) 电离源模式:电喷雾离子化;
- h) 喷雾流速:3 L/min;
- i) 干燥气流速:15 L/min;
- j) 离子喷雾电压:3 500 V;
- k) 监测离子对、碰撞能量、驻留时间和保留时间见附录 D。

12.4 定性测定

在相同试验条件下进行样品测定时,如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致,并且在扣除背景后的样品质谱图中,所选择的离子均出现,而且所选择的离子丰度比与标准样品相一致(相对丰度>50%,允许±20%偏差;相对丰度>20%~50%,允许±25%偏差;相对丰度>10%~20%,允许±30%偏差;相对丰度≤10%,允许±50%偏差),则可判断样品中存在这种抗氧化剂。

12.5 标准曲线的制作

将标准系列工作液进行液相色谱串联质谱仪测定,以定量离子对峰面积对应标准溶液浓度绘制标准曲线。9 种抗氧化剂多反应监测(MRM)色谱图见附录 E。

12.6 试样溶液的测定

将试样溶液进行液相色谱串联质谱仪测定,根据标准曲线得到待测液中抗氧化剂的浓度。

13 分析结果的表述

试样中抗氧化剂含量按式(2)计算:

$$X_i = \rho_i \times \frac{V}{m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X_i ——试样中抗氧化剂含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ_i ——从标准曲线上得到的抗氧化剂溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——称取的试样质量,单位为克(g)。

结果保留三位有效数字(或保留到小数点后两位)。

14 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

15 其他

本方法的检出限为没食子酸丙酯(PG):0.05 mg/kg,2,4,5-三羟基苯丁酮(THBP):0.05 mg/kg,去甲二氢愈创木酸(NDGA):0.05 mg/kg,没食子酸辛酯(OG):0.005 mg/kg,没食子酸十二酯(DG):

0.005 mg/kg; 定量限为没食子酸丙酯(PG):0.1 mg/kg, 2,4,5-三羟基苯丁酮(THBP):0.1 mg/kg, 去甲二氢愈创木酸(NDGA):0.1 mg/kg, 没食子酸辛酯(OG):0.01 mg/kg, 没食子酸十二酯(DG):0.01 mg/kg。

第三法 气相色谱-质谱法

16 原理

油脂样品经有机溶剂溶解后,使用凝胶渗透色谱(GPC)净化;固体类食品样品用正己烷溶解,用乙腈提取,固相萃取柱净化。气相色谱-质谱联用仪测定,外标法定量。

17 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

17.1 试剂

同 3.1。

17.2 试剂配制

同 3.2。

17.3 标准品

17.3.1 叔丁基对羟基茴香醚:纯度 $\geq 98\%$ 。

17.3.2 叔丁基对苯二酚:纯度 $\geq 98\%$ 。

17.3.3 2,6-二叔丁基对甲基苯酚:纯度 $\geq 98\%$ 。

17.3.4 2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚:纯度 $\geq 98\%$ 。

注:英文名称、分子式和 CAS 号见附录 A。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 标准物质储备液:准确称取 0.1 g(精确至 0.1 mg)固体抗氧化剂标准物质,用乙腈溶于 100 mL 棕色容量瓶中,定容至刻度,配置成浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液,0℃~4℃避光保存。

17.4.2 标准混合使用液:移取适量体积的浓度为 1 000 mg/L 的抗氧化剂标准储备液混合后,分别稀释至浓度为 1 mg/L、2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 的混合标准使用液。

17.5 材料

同 3.5。

18 仪器和设备

18.1 离心机:转速 $\geq 3\,000$ r/min。

18.2 旋转蒸发仪。

18.3 气相色谱质谱联用仪。

18.4 凝胶渗透色谱仪。

18.5 分析天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

18.6 涡旋振荡器。

19 分析步骤

19.1 试样制备

同 5.1。

19.2 测定步骤

同 5.2。

19.3 气相色谱质谱仪条件

- a) 色谱柱:5%苯基-甲基聚硅氧烷毛细管柱,柱长 30 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm ,或等效色谱柱;
- b) 色谱柱升温程序:70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min,然后以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 200 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min,再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min;
- c) 载气:氦气,纯度 $\geq 99.999\%$,流速 1 mL/min;
- d) 进样口温度:230 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:1 μL ;
- f) 进样方式:无分流进样,1 min 后打开阀;
- g) 电子轰击源:70 eV;
- h) 离子源温度:230 $^{\circ}\text{C}$;
- i) GC-MS 接口温度:280 $^{\circ}\text{C}$;
- j) 溶剂延迟 8 min;
- k) 选择离子监测:每种化合物分别选择一个定量离子,2 个~3 个定性离子。每组所有需要检测离子按照出峰顺序,分时段分别检测。每种化合物的保留时间、定量离子、定性离子、驻留时间见附录 F。

19.4 定性测定

在相同试验条件下进行样品测定时,如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致,并且在扣除背景后的样品质谱图中,所选择的离子均出现,而且所选择的离子丰度比与标准样品相一致(相对丰度 $>50\%$,允许 $\pm 20\%$ 偏差;相对丰度 $>20\% \sim 50\%$,允许 $\pm 25\%$ 偏差;相对丰度 $>10\% \sim 20\%$,允许 $\pm 30\%$ 偏差;相对丰度 $\leq 10\%$,允许 $\pm 50\%$ 偏差),则可判断样品中存在这种抗氧化剂。

19.5 标准曲线的制作

将标准系列工作液进行气相色谱质谱联用仪测定,以定量离子峰面积对应标准溶液浓度绘制标准曲线。4 种抗氧化剂选择离子监测 GC-MS 图见附录 G。

19.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入气相色谱质谱联用仪中,得到相应色谱峰响应值,根据标准曲线得到待测液中抗氧化剂的浓度。

20 分析结果的表述

试样中抗氧化剂含量按式(3)计算:

$$X_i = \rho_i \times \frac{V}{m} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- X_i —— 试样中抗氧化剂含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ_i —— 从标准曲线上得到的抗氧化剂溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V —— 样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 称取的试样质量,单位为克(g)。

结果保留三位有效数字(或保留到小数点后两位)。

21 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

22 其他

本方法的检出限为叔丁基对苯二酚(TBHQ):0.5 mg/kg,叔丁基对羟基茴香醚(BHA):1 mg/kg, 2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚(Ionox-100):0.5 mg/kg,2,6-二叔丁基对甲基苯酚(BHT):0.5 mg/kg;定量限均为 1 mg/kg。

第四法 气相色谱法

23 原理

样品中的抗氧化剂用有机溶剂提取、凝胶渗透色谱(GPC)净化后,用气相色谱氢火焰离子化检测器检测,采用保留时间定性,外标法定量。

24 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为色谱纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

24.1 试剂

- 24.1.1 环己烷(C_6H_{12})。
- 24.1.2 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)。
- 24.1.3 石油醚:沸程 30 °C~60 °C(重蒸)。
- 24.1.4 乙腈(CH_3CN)。
- 24.1.5 丙酮(CH_3COCH_3)。

24.2 试剂配制

乙酸乙酯和环己烷混合溶液(1+1):量取 50 mL 乙酸乙酯和 50 mL 环己烷混匀。

24.3 标准品

24.3.1 BHA 标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

24.3.2 BHT 标准品:纯度 $\geq 99.3\%$ 。

24.3.3 TBHQ 标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

24.3.4 BHA、BHT、TBHQ 标准储备液:准确称取 BHA、BHT、TBHQ 标准品各 50 mg(精确至 0.1 mg),用乙酸乙酯和环己烷混合溶液定容至 50 mL,配制成 1 mg/mL 的储备液,于 4 °C 冰箱中避光保存。

24.3.5 BHA、BHT、TBHQ 标准使用液:吸取标准储备液 0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 于一组 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯和环己烷混合溶液定容,此标准系列的浓度为 0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL,现用现配。

24.4 材料

有机系滤膜:孔径 0.45 μm 。

25 仪器和设备

25.1 气相色谱仪(GC):配氢火焰离子化检测器(FID)。

25.2 凝胶渗透色谱仪(GPC),或可进行脱脂的等效分离装置。

25.3 分析天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

25.4 旋转蒸发仪。

25.5 涡旋振荡器。

25.6 粉碎机。

26 分析步骤

26.1 试样制备

同 5.1。

26.2 试样处理

26.2.1 油脂样品

混合均匀的油脂样品,过 0.45 μm 滤膜后,准确称取 0.5 g(精确至 0.1 mg),用乙酸乙酯和环己烷的混合溶液准确定容至 10.0 mL,混合均匀待净化。

26.2.2 油脂含量较高或中等的样品(油脂含量 15%以上的样品)

根据样品中油脂的实际含量,称取 5 g 混合均匀的样品,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入适量石油醚,使样品完全浸没,放置过夜,用快速滤纸过滤后,旋转蒸发回收溶剂,得到的油脂用乙酸乙酯和环己烷混合溶液准确定容至 10.0 mL,混合均匀待净化。

26.2.3 油脂含量少的试样(油脂含量 15%以下的样品)和不含油脂的样品(如口香糖等)

同 5.2 中固体类样品处理步骤。

26.3 净化

26.2 中处理得到的试样经凝胶渗透色谱装置净化(凝胶渗透色谱净化条件见附录 B),收集流出液蒸发浓缩至近干,用乙酸乙酯和环己烷混合溶液定容至 2 mL,进气相色谱仪分析。

不同试样的前处理需要同时做试样空白试验。

26.4 色谱参考条件

- a) 色谱柱:5%苯基-甲基聚硅氧烷毛细管柱,柱长 30 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm ,或等效色谱柱;
- b) 进样口温度:230 $^{\circ}\text{C}$;
- c) 升温程序:初始柱温 80 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;
- d) 检测器温度:250 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:1 μL ;
- f) 进样方式:不分流进样;
- g) 载气:氮气,纯度 $\geq 99.999\%$,流速 1 mL/min。

26.5 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入气相色谱仪中,测定相应的抗氧化剂,以标准工作液的浓度为横坐标,以响应值(如:峰面积、峰高、吸收值等)为纵坐标,绘制标准曲线。BHA、BHT、TBHQ 3 种抗氧化剂标准溶液气相色谱图见附录 H。

26.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入气相色谱仪中,得到相应抗氧化剂的响应值,根据标准曲线得到待测液中相应抗氧化剂的浓度。

27 分析结果的表述

试样中抗氧化剂含量按式(4)计算:

$$X = \rho \times \frac{V}{m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- X —— 试样中抗氧化剂含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ —— 从标准曲线上得到的抗氧化剂溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V —— 样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 称取的试样质量,单位为克(g)。

结果保留三位有效数字(或保留到小数点后两位)。

28 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

29 其他

本方法的检出限为叔丁基对苯二酚(TBHQ):5 mg/kg ,叔丁基对羟基茴香醚(BHA):2 mg/kg ,2,

6-叔丁基对甲基苯酚(BHT):2 mg/kg,定量限均为 5 mg/kg。

第五法 比色法

30 原理

试样经石油醚溶解,用乙酸铵水溶液提取后,没食子酸丙酯(PG)与亚铁酒石酸盐起颜色反应,在波长 540 nm 处测定吸光度,与标准比较定量。

31 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

31.1 试剂

31.1.1 石油醚:沸程 30 °C~60 °C。

31.1.2 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)。

31.1.3 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。

31.1.4 酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。

31.2 试剂配制

31.2.1 乙酸铵溶液(100 g/L):称取 10 g 乙酸铵加适量水溶解,转移至 100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度;

31.2.2 乙酸铵溶液(16.7 g/L):称取 16.7 g 乙酸铵加适量水溶解,转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水定容至刻度;

31.2.3 显色剂:称取 0.1 g 硫酸亚铁和 0.5 g 酒石酸钾钠,加水溶解,稀释至 100 mL,临用前配制。

31.3 标准溶液配制

PG 标准溶液:准确称取 0.010 0 g PG 溶于水中,移入 200 mL 容量瓶中,并用水稀释至刻度。此溶液每毫升含 50.0 μg PG。

32 仪器和设备

32.1 分析天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

32.2 分光光度计。

33 分析步骤

33.1 试样制备

称取 10.00 g 试样,用 100 mL 石油醚溶解,移入 250 mL 分液漏斗中,加 20 mL 乙酸铵溶液(16.7 g/L),振摇 2 min,静置分层,将水层放入 125 mL 分液漏斗中(如乳化,连同乳化层一起放下),石油醚层再用 20 mL 乙酸铵溶液(16.7 g/L)重复提取两次,合并水层。石油醚层用水振摇洗涤两次,每次 15 mL,水洗涤并入同一 125 mL 分液漏斗中,振摇静置。将水层通过干燥滤纸滤入 100 mL 容量瓶中,

用少量水洗涤滤纸,加水至刻度,摇匀。将此溶液用滤纸过滤,弃去初滤液的 20 mL。收集滤液供比色测定用。同时做空白试验。

33.2 测定

移取 20.0 mL 上述处理后的试样提取液于 25 mL 具塞比色管中,加入 1 mL 显色剂,加 4mL 水,摇匀。

另准确吸取 0 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL PG 标准溶液(相当于 0 μg、50 μg、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg PG),分别置于 25 mL 带塞比色管中,加入 2.5 mL 乙酸铵溶液(100 g/L),加入水至约 23 mL,加入 1 mL 显色剂,再准确加水定容至 25 mL,摇匀。

用 1 cm 比色杯,以零管调节零点,在波长 540 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线比较。

34 分析结果的表述

试样中抗氧化剂的含量按式(5)计算:

$$X = \frac{A}{m \times (V_2/V_1)} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

X —— 试样中 PG 含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A —— 样液中 PG 的质量,单位为微克(μg);

m —— 称取的试样质量,单位为克(g);

V₂ —— 测定用吸取样液的体积,单位为毫升(mL);

V₁ —— 提取后样液总体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留三位有效数字(或保留到小数点后两位)。

35 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

36 其他

本方法的定量限为:25 mg/kg。

附 录 A
食品中 9 种抗氧化剂的英文名称、分子式与 CAS 号

食品中 9 种抗氧化剂的英文名称、分子式与 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 食品中 9 种抗氧化剂的英文名称、分子式和 CAS 号

序号	中文名称	英文名称	分子式	英文简称	CAS 号
1	没食子酸丙酯	Propyl gallate	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	PG	121-79-9
2	2,4,5-三羟基苯丁酮	2,4,5-Trihydroxybutyrophenone	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	THBP	1421-63-2
3	叔丁基对苯二酚	Tert-butylhydroquinone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	TBHQ	1948-33-0
4	去甲二氢愈创木酸	Nordihydroguaiaretic acid	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	NDGA	500-38-9
5	叔丁基对羟基茴香醚	Butylhydroxyanisole	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	BHA	25013-16-5
6	2,6-二叔丁基-4-羟甲基苯酚	2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy methylphenol	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	Ionox-100	88-26-6
7	没食子酸辛酯	Octyl gallate	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	OG	1034-01-1
8	2,6-二叔丁基对甲基苯酚	Butylated hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	BHT	128-37-0
9	没食子酸十二酯	Dodecyl gallate	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	DG	1166-52-5

附 录 B

凝胶渗透色谱净化参考条件

凝胶渗透色谱净化参考条件如下：

- a) 凝胶渗透色谱柱:300 mm×20 mm 玻璃柱,Bio Beads(S-X3),40 μm ~75 μm ;
- b) 柱分离度:玉米油与抗氧化剂(PG、THBP、TBHQ、OG、BHA、Ionox-100、BHT、DG、NDGA)的分离度>85%;
- c) 流动相:乙酸乙酯:环己烷=1:1(体积比);
- d) 流速:5 mL/min;
- e) 进样量:2 mL;
- f) 流出液收集时间:7 min~17.5 min;
- g) 紫外检测器波长:280 nm。

附 录 C
食品中 9 种抗氧化剂标准液相色谱图

食品中 9 种抗氧化剂标准液相色谱图见图 C.1。

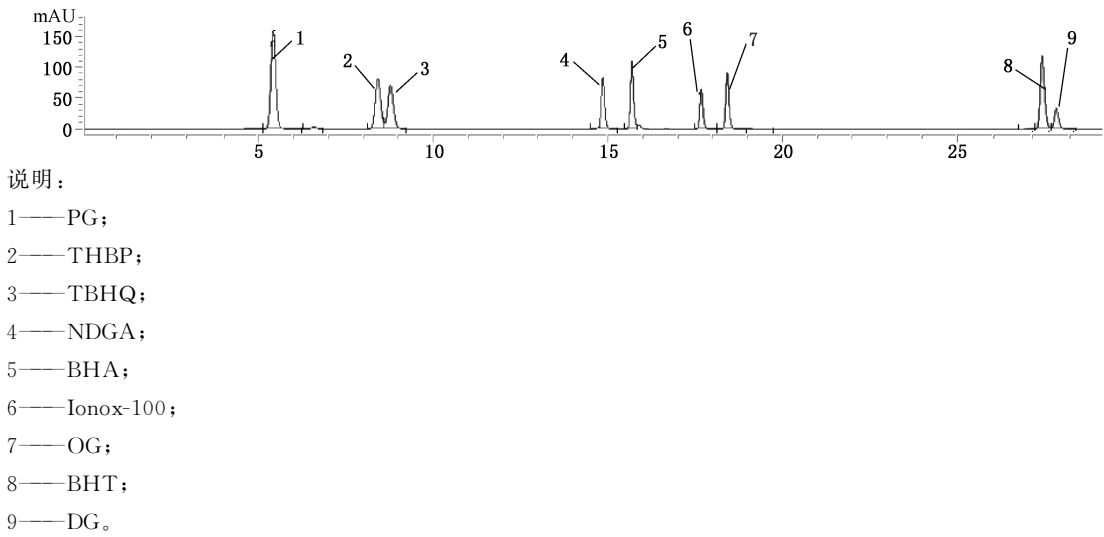


图 C.1 50 mg/L 抗氧化剂标准溶液液相色谱图

附 录 D

食品中抗氧化剂的监测离子对、碰撞能量、驻留时间和保留时间

食品中抗氧化剂的监测离子对、碰撞能量、驻留时间和保留时间见表 D.1。

表 D.1 食品中抗氧化剂的监测离子对、碰撞能量、驻留时间和保留时间

抗氧化剂名称	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 eV	驻留时间 ms	保留时间 min
THBP	195	125	20	25	6.175
		166	22		
PG	211	125	23	25	4.932
		168.9	18		
OG	281.1	124	31	25	9.327
		169	21		
NDGA	301.1	122.1	29	25	8.136
		108	30		
DG	337.2	124	33	25	11.456
		169	26		

附 录 E

食品中 THBP、PG、OG、NDGA、DG 5 种抗氧化剂多反应监测 LC-MS-MS 图

食品中 THBP、PG、OG、NDGA、DG 5 种抗氧化剂多反应监测 LC-MS-MS 图见图 E.1。

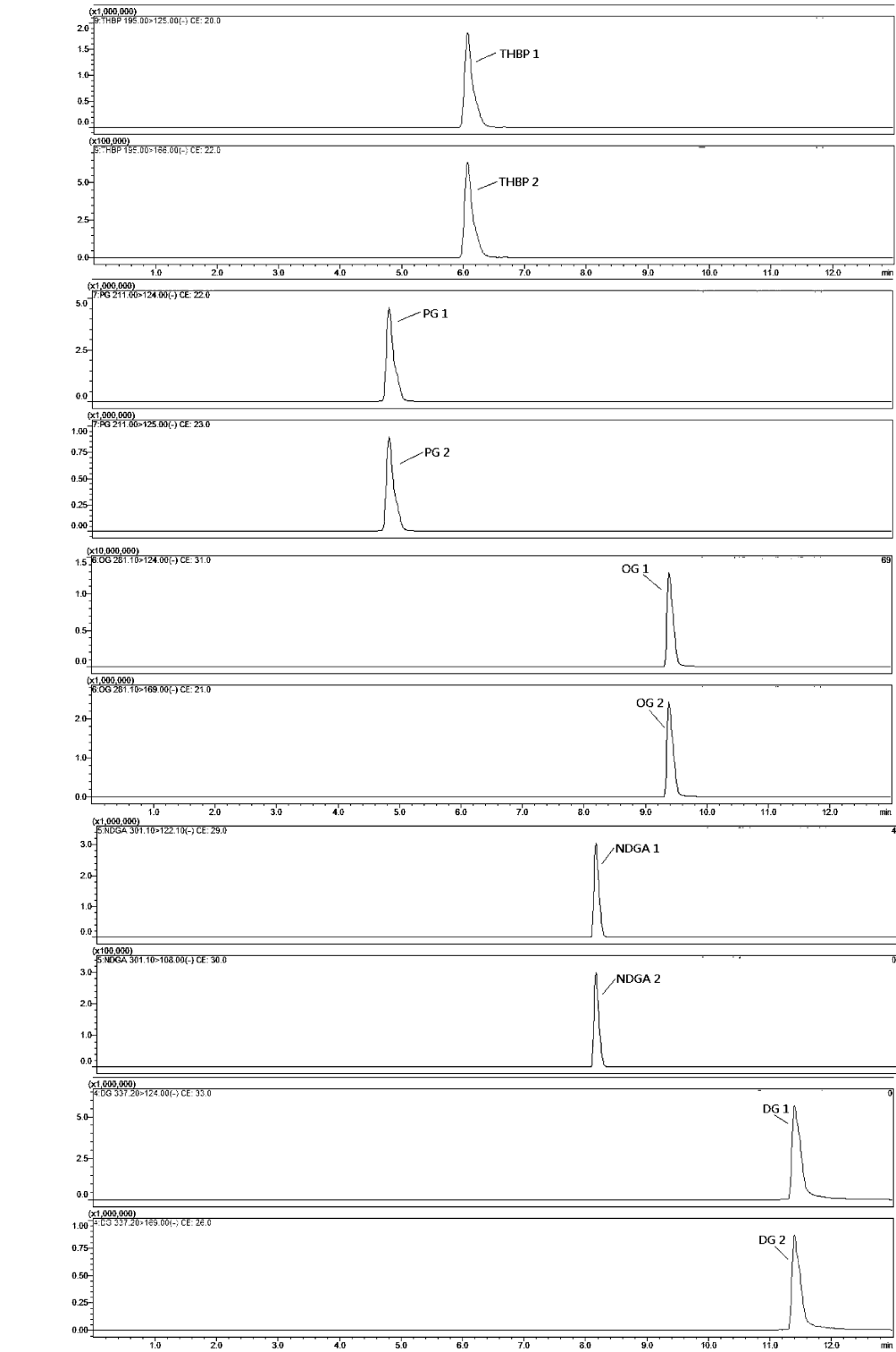


图 E.1 食品中 THBP、PG、OG、NDGA、DG 5 种抗氧化剂多反应监测 LC-MS-MS 图

附 录 F

食品中抗氧化剂的保留时间、定量离子、定性离子及丰度比值和驻留时间

食品中抗氧化剂的保留时间、定量离子、定性离子及丰度比值和驻留时间见表 F.1。

表 F.1 食品中抗氧化剂的保留时间、定量离子、定性离子及丰度比值和驻留时间

抗氧化剂名称	保留时间 min	定量离子	定性离子 1	定性离子 2	驻留时间 ms
BHA	11.981	165(100)	137(76)	180(50)	20
BHT	12.251	205(100)	145(13)	220(25)	20
TBHQ	12.805	151(100)	123(100)	166(47)	20
Ionox-100	15.598	221(100)	131(8)	236(23)	20

附 录 G
食品中 4 种抗氧化剂选择离子监测 GC-MS 图

食品中 4 种抗氧化剂选择离子监测 GC-MS 图见图 G.1。

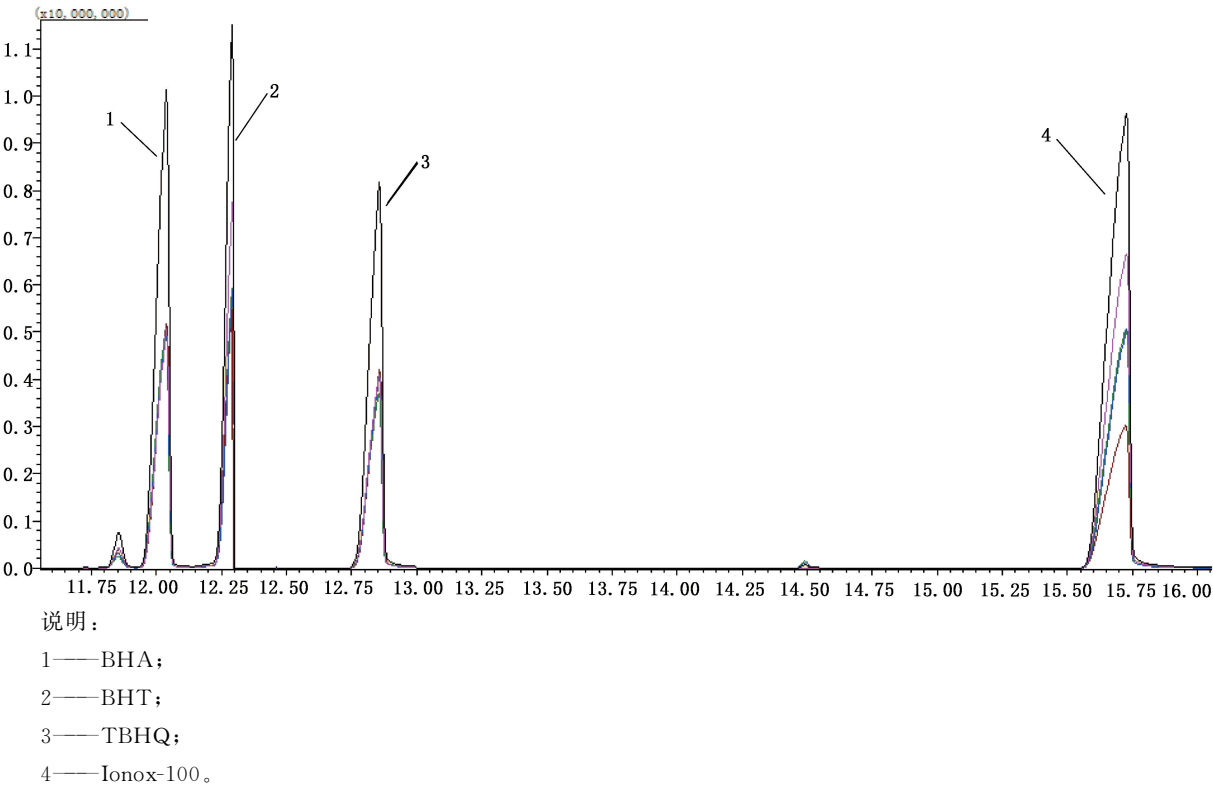


图 G.1 食品中 4 种抗氧化剂选择离子监测 GC-MS 图

附 录 H

食品中 BHA、BHT、TBHQ3 种抗氧化剂标准溶液气相色谱图

食品中 BHA、BHT、TBHQ3 种抗氧化剂标准溶液气相色谱图见图 H.1。

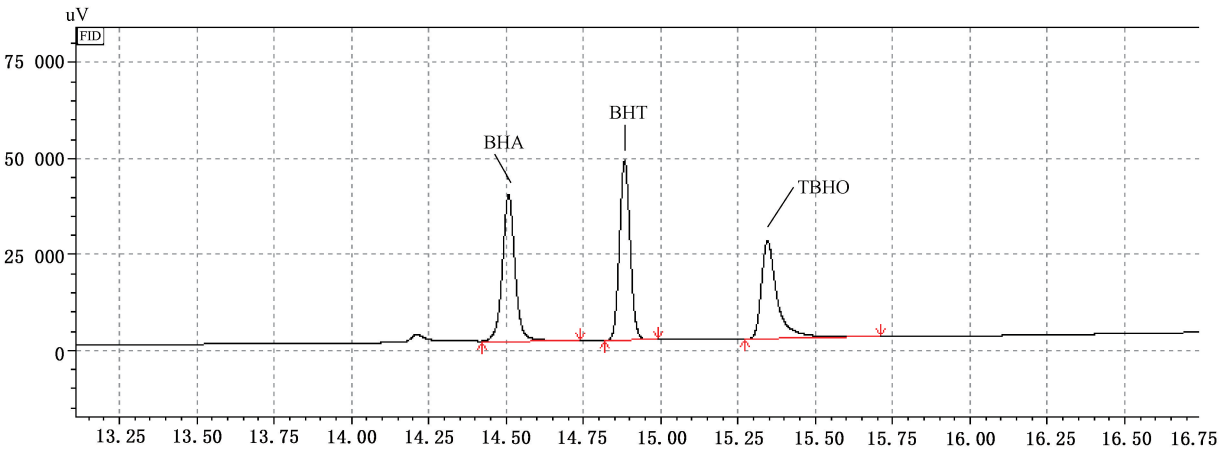


图 H.1 食品中 BHA、BHT、TBHQ 3 种抗氧化剂标准溶液气相色谱图