



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.30—2003
代替 GB/T 5009.30—1996

食品中叔丁基羟基茴香醚(BHA)与 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的测定

Determination of butylated hydroxyanisole
and butylated hydroxytoluene in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5009.30—1996《食品中叔丁基羟基茴香醚(BHA)与 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.30—1996 相比主要修改如下：

- 修改了标准的中文名称,标准中文名称改为《食品中叔丁基羟基茴香醚(BHA)与 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的测定》;
- 按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分:化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由江苏省卫生防疫站负责起草。

本标准第二法由卫生部食品卫生监督检验所、武汉市卫生防疫站、邯郸市卫生防疫站负责起草。

本标准第三法由上海市卫生防疫站负责起草。

本标准于 1985 年首次发布,1996 年第一次修订,本次为第二次修订。



食品中叔丁基羟基茴香醚(BHA)与 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)的测定

1 范围

本标准规定了糕点和植物油等食品中 BHA、BHT 的测定方法。

本标准适用于糕点和植物油等食品中 BHA、BHT 的测定。

本方法检出限:气相色谱法检出量为 2.0 μg ,油脂取样量为 0.50 g 时检出浓度为 4.0 mg/kg。比色法检出量为 10.0 μg ,油脂取样量为 0.25 g 时检出浓度为 4.0 mg/kg。气相色谱法最佳线性范围:0.0 μg ~100.0 μg 。

第一法 气相色谱法

2 原理

试样中的叔丁基羟基茴香醚(BHA)和 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)用石油醚提取,通过层析柱使 BHA 与 BHT 净化,浓缩后,经气相色谱分离后用氢火焰离子化检测器检测,根据试样峰高与标准峰高比较定量。

3 试剂

- 3.1 石油醚:沸程 30℃~60℃。
- 3.2 二氯甲烷,分析纯。
- 3.3 二硫化碳,分析纯。
- 3.4 无水硫酸钠,分析纯。
- 3.5 硅胶 G:60 目~80 目于 120℃活化 4 h 放干燥器备用。
- 3.6 弗罗里砂土(Florisil):60 目~80 目于 120℃活化 4 h 放干燥器中备用。
- 3.7 BHA、BHT 混合标准储备液:准确称取 BHA、BHT(纯度为 99.0%)各 0.1 g 混合后用二硫化碳溶解,定容至 100 mL 容量瓶中,此溶液分别为每毫升含 1.0 mg BHA、BHT,置冰箱保存。
- 3.8 BHA、BHT 混合标准使用液:吸取标准储备液 4.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用二硫化碳定容至 100 mL 容量瓶中,此溶液分别为每毫升含 0.040 mg BHA、BHT,置冰箱中保存。

4 仪器

- 4.1 气相色谱仪:附 FID 检测器。
- 4.2 蒸发器:容积 200 mL。
- 4.3 振荡器。
- 4.4 层析柱:1 cm×30 cm 玻璃柱,带活塞。
- 4.5 气相色谱柱:柱长 1.5 m,内径 3 mm 的玻璃柱内装涂质量分数为 10%的 QF-1 Gas Chrom Q (80 目~100 目)。

5 试样处理

5.1 试样的制备

称取 500 g 含油脂较多的试样,含油脂少的试样取 1 000 g,然后用对角线取四分之一或六分之一,或根据试样情况取有代表性试样,在玻璃乳钵中研碎,混合均匀后放置广口瓶内保存于冰箱中。

5.2 脂肪的提取

5.2.1 含油脂高的试样(如桃酥等):称取 50 g,混合均匀,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加 50 mL 石油醚(沸程为 30℃~60℃),放置过夜,用快速滤纸过滤后,减压回收溶剂,残留脂肪备用。

5.2.2 含油脂中等的试样(如蛋糕、江米条等):称取 100 g 左右,混合均匀,置于 500 mL 具塞锥形瓶中,加 100 mL~200 mL 石油醚(沸程为 30℃~60℃),放置过夜,用快速滤纸过滤后,减压回收溶剂,残留脂肪备用。

5.2.3 含油脂少的试样(如面包、饼干等):称取 250 g~300 g,混合均匀后,于 500 mL 具塞锥形瓶中,加入适量石油醚浸泡试样,放置过夜,用快速滤纸过滤后,减压回收溶剂残留脂肪备用。

6 分析步骤

6.1 试样的制备

6.1.1 层析柱的制备:于层析柱底部加入少量玻璃棉,少量无水硫酸钠,将硅胶-弗罗里砂土(6+4)共 10 g,用石油醚湿法混合装柱,柱顶部再加入少量无水硫酸钠。

6.1.2 试样制备:称取 5.2 制备的脂肪 0.50 g~1.00 g,用 25 mL 石油醚溶解移入 6.1.1 的层析柱上,再以 100 mL 二氯甲烷分五次淋洗,合并淋洗液,减压浓缩近干时,用二硫化碳定容至 2.0 mL,该溶液为待测溶液。

6.1.3 植物油试样的制备:称取混合均匀试样 2.00 g,放入 50 mL 烧杯中,加 30 mL 石油醚溶解,转移到 6.1.1 层析柱上,再用 10 mL 石油醚分数次洗涤烧杯中,并转移到层析柱,用 100 mL 二氯甲烷分五次淋洗,合并淋洗液,减压浓缩近干,用二硫化碳定容至 2.0 mL,该溶液为待测溶液。

6.2 测定

注入气相色谱 3.0 μL 标准使用液,绘制色谱图,分别量取各组分峰高或面积,进 3.0 μL 试样待测溶液(应视试样含量而定),绘制色谱图,分别量取峰高或面积,与标准峰高或面积比较计算含量。

6.3 结果计算

待测溶液 BHA(或 BHT)的质量按式(1)进行计算。

$$m_1 = \frac{h_i}{h_s} \times \frac{V_m}{V_i} \times V_s \times c_s \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

m_1 ——待测溶液 BHA(或 BHT)的质量,单位为毫克(mg);

h_i ——注入色谱试样中 BHA(或 BHT)的峰高或面积;

h_s ——标准使用液中 BHA(或 BHT)的峰高或面积;

V_i ——注入色谱试样溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_m ——待测试样定容的体积,单位为毫升(mL);

V_s ——注入色谱中标准使用液的体积,单位为毫升(mL);

c_s ——标准使用液的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL)。

食品中以脂肪计 BHA(或 BHT)的含量按式(2)进行计算。

$$X_1 = \frac{m_1 \times 1\,000}{m_2 \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X_1 ——食品中以脂肪计 BHA(或 BHT)的含量,单位为克每千克(g/kg);

m_1 ——待测溶液中 BHA(或 BHT)的质量,单位为毫克(mg);

m_2 ——油脂(或食品中脂肪)的质量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

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 15%。

8 其他

8.1 BHA、BHT 气相色谱图见图 1。

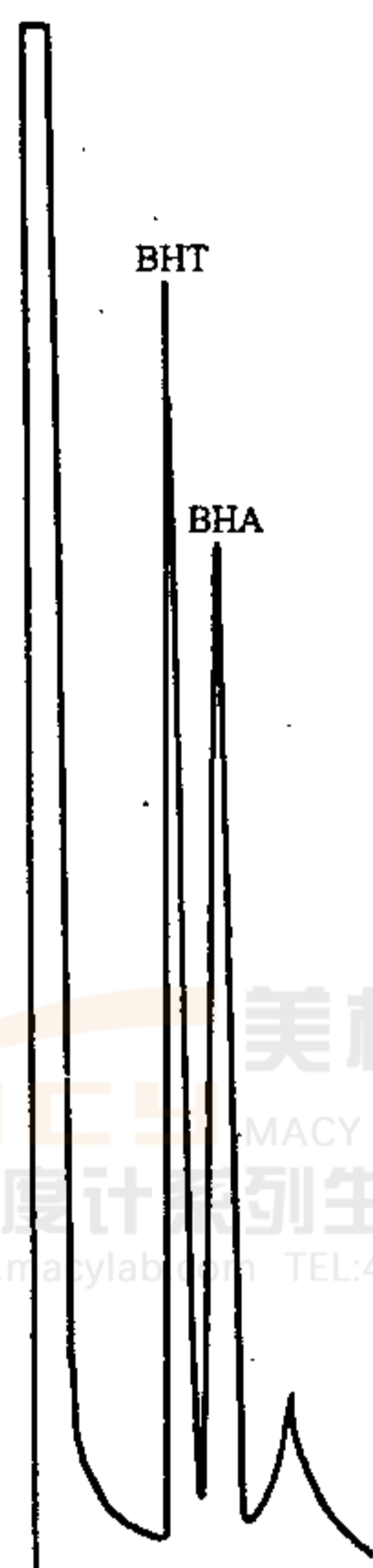


图 1

8.2 气相色谱参考条件：

色谱柱：长 1.5 m，内径 3 mm 玻璃柱，质量分数为 10% QF-1 的 Gas Chrom Q (80 目~100 目)。

检测器：FID。

温度：检测室 200℃，进样口 200℃，柱温 140℃。

载气流量：氮气 70 mL/min；氢气 50 mL/min；空气 500 mL/min。

第二法 薄层色谱法

9 原理

用甲醇提取油脂或食品中的抗氧化剂，用薄层色谱定性，根据其在薄层板上显色后的最低检出量与标准品最低检出量比较而概略定量，对高脂肪食品中的 BHT、BHA、PG 能定性检出。

10 试剂

10.1 甲醇。

10.2 石油醚(30℃~60℃)。

10.3 异辛烷。

10.4 丙酮。

10.5 冰乙酸。

10.6 正己烷。

10.7 二氧六环。

10.8 硅胶 G:薄层用。

10.9 聚酰胺粉 200 目。

10.10 可溶性淀粉。

10.11 BHT、BHA、PG 混合标准溶液的配制:分别准确称取 BHT、BHA、PG(纯度为 99.9%以上)各 10 mg,分别用丙酮溶解,转入三个 10 mL 容量瓶中,用丙酮稀释至刻度。每毫升含 1.0 mgBHT、BHA、PG,吸取 BHT (1.0 mg/mL)1.0 mL,BHA(1.0 mg/mL)、PG(1.0 mg/mL)各 0.3 mL 置同一 5 mL 容量瓶中,用丙酮稀释至刻度。此溶液每毫升含 0.20 mgBHT、0.060 mgBHA、0.060 mgPG。

10.12 显色剂:2,6-二氯醌-氯亚胺的乙醇溶液(2 g/L)。

11 仪器

11.1 减压蒸馏装置。

11.2 具刻度尾管的浓缩瓶。

11.3 层析槽:

a) 24 cm×6 cm×4 cm;

b) 20 cm×13 cm×8 cm。

11.4 玻璃板:5 cm×20 cm、10 cm×20 cm。

11.5 微量注射器:10.0 μL。



12 分析步骤

12.1 提取

12.1.1 植物油(花生油、豆油、菜籽油、芝麻油):称取 5.00 g 油置 10 mL 具塞离心管中,加入 5.0 mL 甲醇,密塞振摇 5 min,放置 2 min,离心(3 000 r/min~3 500 r/min)5 min,吸取上层清液置 25 mL 容量瓶中,如此重复提取共五次,合并每次甲醇提取液,用甲醇稀释至刻度。吸取 5.0 mL 甲醇提取液置一浓缩瓶中,于 40℃ 水浴上减压浓缩至 0.5 mL,留作薄层色谱用。

12.1.2 猪油:称取 5.00 g 猪油置 50 mL 具磨口的锥形瓶中,加入 25.0 mL 甲醇,装上冷凝管于 75℃ 水浴上放置 5 min,待猪油完全溶化后将锥形瓶连同冷凝管一起自水浴中取出,振摇 30 s,再放入水浴 30 s;如此振摇三次后放入 75℃ 水浴,使甲醇层与油层分清后,将锥形瓶连同冷凝管一起置冰水浴中冷却,猪油凝固,甲醇提取液通过滤纸滤入 50 mL 容量瓶中,再自冷凝管顶端加入 25 mL 甲醇,重复振摇提取一次,合并二次甲醇提取液,将该容量瓶置暗处放置,待升至室温后,用甲醇稀释至刻度。吸取 10 mL 甲醇提取液置一浓缩瓶中,于 40℃ 水浴上减压浓缩至 0.5 mL,留作薄层色谱用。

12.1.3 食品(油炸花生米、酥糖、巧克力、饼干):按 5.2 测定脂肪的含量,并称取约 2.00 g 的脂肪,视提取出的油脂是植物油还是动物性脂肪而决定提取方法。可按 12.1.1 或 12.1.2 操作。

12.2 测定

12.2.1 薄层板的制备

12.2.1.1 硅胶 G 薄层板:称取 4 g 硅胶 G 置玻璃乳钵中,加 10 mL 水。研磨至粘稠状,铺成 5 cm×20 cm 的薄层板三块,置空气中干燥后于 80℃ 烘 1 h,存放于干燥器中。

12.2.1.2 聚酰胺板:称取 2.40 g 聚酰胺粉,0.60 g 可溶性淀粉置于玻璃乳钵中,加约 15 mL 水,研磨至浆状,铺成 10 cm×20 cm 的薄层板三块,置空气中干燥后于 80℃ 烘 1 h,置干燥器中保存。

12.2.2 点样

12.2.2.1 用 10 μL 微量注射器在 5 cm \times 20 cm 的硅胶 G 薄层板上距下端 2.5 cm 处点三点:标准溶液 5.0 μL 、试样提取液 6.0 μL ~30.0 μL 、加标准溶液 5.0 μL 。

12.2.2.2 另取一块硅胶 G 薄层板点三点:标准溶液 5.0 μL 、试样提取液 1.5 μL ~3.6 μL 、试样提取液 1.5 μL ~3.6 μL 加标准溶液 5.0 μL 。

12.2.2.3 用 10 μL 微量注射器在 10 cm \times 20 cm 的聚酰胺薄层板上距下端 2.5 cm 处点:标准溶液 5.0 μL 、试样提取液 10.0 μL 、试样提取液 10.0 μL 加标准溶液 5.0 μL ,边点样边用吹风机吹干,点上一滴吹干后再继续滴加。

12.2.3 显色

12.2.3.1 溶剂系统

硅胶 G 薄层板:正己烷-二氧六环-乙酸(42+6+3),异辛烷-丙酮-乙酸(70+5+12)。

聚酰胺板:

- 甲醇-丙酮-水(30+10+10);
- 甲醇-丙酮-水(30+10+12.5);
- 甲醇-丙酮-水(30+10+15)。

对甲醇-丙酮-水系统,芝麻油只能用 a)菜籽油用 b),食品用 c)。

展开系统中水的比例对花生油、豆油、猪油中 PG 的分离无影响。

将点好样的薄层板置预先经溶剂饱和的展开槽内展开 16 cm。

12.2.3.2 展开

12.2.3.2.1 硅胶 G 板自层析槽中取出,薄层板置通风橱中挥干至 PG 标准点显示灰黑色斑点,即可认为溶剂已基本挥干,喷显色剂,置 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加热 10 min,比较色斑颜色及深浅,趁热将板置氨蒸气槽中放置 30 s,观察各色斑颜色变化。

12.2.3.2.2 聚酰胺板自层析槽中取出,薄层板置通风橱中吹干,喷显色剂,再通风挥干,直至 PG 斑点清晰。

12.2.4 评定

12.2.4.1 定性

根据试样中显示出的 BHT、BHA、PG 点与标准 BHT、BHA、PG 点比较 R_f 值和显色后斑点的颜色反应定性。如果样液点显示检出某种抗氧化剂,则试样中抗氧化剂的斑点应与加入内标的抗氧化剂斑点重叠。

当点大量样液时由于杂质多,使试样中抗氧化剂点的 R_f 值略低于标准点。这时应在试样点上滴加标准溶液作内标,比较 R_f 值,见表 1。

表 1 BHT、BHA、PG 在薄层板上的最低检出量 R_f 值及斑点颜色

| 抗氧化剂 | 硅胶 G 板结果 | | | 聚酰胺板结果 | | |
|------|----------|-------------------------|---------------------|---------|-------------------------|------|
| | R_f 值 | 最低检出量/ μg | 色斑颜色 | R_f 值 | 最低检出量/ μg | 色斑颜色 |
| BHT | 0.73 | 1.00 | 桔红 \rightarrow 紫红 | — | — | — |
| BHA | 0.37 | 0.30 | 紫红 \rightarrow 蓝紫 | 0.52 | 0.30 | 灰棕 |
| PG | 0.04 | 0.30 | 灰 \rightarrow 黄棕 | 0.66 | 0.30 | 蓝 |

注: PG 在硅胶 G 板上定性及半定量不可靠,有干扰,且 R_f 值太小,应进一步用聚酰胺板展开。

12.2.4.2 概略定量及限度试验

根据薄层板上样液点抗氧化剂所显示的色斑深浅与标准抗氧化剂色斑比较而估计含量,如果在 12.2.2.1 的硅胶 G 薄层板上,试样中各抗氧化剂所显色斑浅于标准抗氧化剂色斑,则试样中各抗氧化

剂含量在本方法的定性检出限量以下(BHA、PG 点样量为 6.0 μL, BHT 点样量为 30.0 μL)。如果在 12.2.2.2 的硅胶 G 薄层板上, 试样中各抗氧化剂所显色斑的颜色浅于标准抗氧化剂色斑, 则试样中各抗氧化剂的含量没有超过使用卫生标准(BHA、PG 点样量为 1.5 μL, BHT 点样量为 3.6 μL)。如果试样点色斑颜色较标准点深, 可稀释后重新点样, 估计含量。

12.3 结果计算

12.3.1 试样中抗氧化剂(以脂肪计)的含量按式(3)进行计算。

$$X = \frac{m_1 \times D \times 1\,000}{m_2 \times \frac{V_2}{V_1} \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- X —— 试样中抗氧化剂 BHA、BHT、PG(以脂肪计)的含量, 单位为克每千克(g/kg);
- m₁ —— 薄层板上测得试样点抗氧化剂的质量, 单位为微克(μg);
- V₁ —— 供薄层层析用点样液定容后的体积, 单位为毫升(mL);
- V₂ —— 滴加样液的体积, 单位为毫升(mL);
- D —— 样液的稀释倍数;
- m₂ —— 定容后的薄层层析用样液相当于试样的脂肪质量, 单位为克(g)。

12.3.2 所示试样中各抗氧化剂定性检出限度, 见表 2。

表 2 所示试样中各抗氧化剂定性检出限度

| 试 样 | BHT | BHA | PG |
|-------|--------------|-----|----|
| | 检出浓度/(mg/kg) | | |
| 油炸花生米 | 25 | 10 | 10 |
| 酥糖 | 10 | 10 | 10 |
| 饼干 | 10 | 10 | 10 |
| 巧克力 | 25 | 25 | 25 |
| 油脂 | 25 | 25 | 25 |

第三法 比色法

13 原理

试样通过水蒸气蒸馏, 使 BHT 分离, 用甲醇吸收, 遇邻联二茴香胺与亚硝酸钠溶液生成橙红色, 用三氯甲烷提取, 与标准比较定量。

14 试剂

- 14.1 无水氯化钙。
- 14.2 甲醇。
- 14.3 三氯甲烷。
- 14.4 甲醇(50%)。
- 14.5 亚硝酸钠溶液(3 g/L): 避光保存。
- 14.6 邻联二茴香胺溶液: 称取 125 mg 邻联二茴香胺于 50 mL 棕色容量瓶中, 加 25 mL 甲醇, 振摇使全部溶解, 加 50 mg 活性炭, 振摇 5 min 过滤, 取 20.0 mL 滤液, 置于另一 50 mL 棕色容量瓶中, 加盐酸(1+11)至刻度。临用时现配并避光保存。
- 14.7 BHT 标准溶液: 准确称取 0.050 0 g BHT, 用少量甲醇溶解, 移入 100 mL 棕色容量瓶中, 并稀释

至刻度,避光保存。此溶液每毫升相当于 0.50 mg BHT。

14.8 BHT 标准使用液:临用时吸取 1.0 mL BHT 标准溶液,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,混匀,避光保存。此溶液每毫升相当于 10.0 μg BHT。

15 仪器

15.1 水蒸气蒸馏装置。

15.2 甘油浴。

15.3 分光光度计。

16 分析步骤

16.1 试样处理

称取 2 g~5 g 试样(约含 0.40 mg BHT)于 100 mL 蒸馏瓶中,加 16.0 g 无水氯化钙粉末及 10.0 mL 水,当甘油浴温度达到 165 $^{\circ}\text{C}$ 恒温时,将蒸馏瓶浸入甘油浴中,连接好水蒸气发生装置及冷凝管,冷凝管下端浸入盛有 50 mL 甲醇的 200 mL 容量瓶中,进行蒸馏,蒸馏速度每分钟 1.5 mL~2 mL,在 50 min~60 min 内收集约 100 mL 馏出液(连同原盛有的甲醇共约 150 mL,蒸气压不可太高,以免油滴带出),以温热的甲醇分次洗涤冷凝管,洗液并入容量瓶中并稀释至刻度。

16.2 测定

准确吸取 25.0 mL 上述处理后的试样溶液,移入用黑纸(布)包扎的 100 mL 分液漏斗中,另准确吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL BHT 标准使用液(相当于 0.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg BHT),分别置于黑纸(布)包扎的 60 mL 分液漏斗,加入甲醇(50%)至 25 mL。分别加入 5 mL 邻联二茴香胺溶液,混匀,再各加 2 mL 亚硝酸钠溶液(3 g/L),振摇 1 min,放置 10 min,再各加 10 mL 三氯甲烷,剧烈振摇 1 min,静置 3 min 后,将三氯甲烷层分入黑纸(布)包扎的 10 mL 比色管中,管中预先放入 2 mL 甲醇,混匀。用 1 cm 比色杯,以三氯甲烷调节零点,于波长 520 nm 处测吸光度,绘制标准曲线比较。

17 结果计算

试样中 BHT 的含量按式(4)进行计算。

$$X = \frac{m_2 \times 1\,000}{m_1 \times \frac{V_2}{V_1} \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

X ——试样中 BHT 的含量,单位为克每千克(g/kg);

m_2 ——测定用样液中 BHT 的质量,单位为微克(μg);

m_1 ——试样质量,单位为克(g);

V_1 ——蒸馏后样液总体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——测定用吸取样液的体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留三位有效数字。

18 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%。