

ICS 65.020

B 20

团体标准

T/HXCY130-2025

紫花苜蓿维生素 E 测定技术规程

Technical specification for determination of vitamin E in *Medicago sativa*

2025-7-23 发布

2025-7-24 实施

北京华夏草业产业技术创新战略联盟 发布

目 次

前 言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器设备 3

7 分析步骤 3

8 分析结果的表述 4

9 精密度 4

10 其他 4

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由北京华夏草业产业技术创新战略联盟提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、北京市营养源研究所有限公司、北京畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：姜雯珊、冯润滋、孔凡华、刘梦兰、张蕴薇、王学敏、张振甲、毕晓静。

本文件为首次发布。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

紫花苜蓿维生素 E 测定技术规程

1 范围

本文件规定了紫花苜蓿中维生素 E 测定技术的术语和定义、原理、试剂和材料、仪器设备、分析步骤、分析结果的表述、精密度等内容。

本文件适用于紫花苜蓿中维生素 E 的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

3.1 紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.

紫花苜蓿为豆科苜蓿属多年生草本植物，有“牧草之王”的美誉。紫花苜蓿根系发达，固氮能力强。茎直立中空，高 60 cm~120 cm，多分枝。三出复叶，小叶倒卵形，托叶尖长。腋生总状花序，蝶形花冠呈紫或蓝紫色。荚果螺旋状盘曲（2 旋~4 旋），含肾形黄绿色种子。

3.2 维生素 E vitamin E

维生素 E 是生育酚类物质的总称，是一种金黄色或者淡黄色的油状物，在动物机体中无法合成，是最主要的抗氧化剂之一。

4 原理

试样中的维生素 E 经甲醇：三氯甲烷溶液提取、浓缩后，C₃₀ 反相液相色谱柱分离，荧光检测器检测，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 水（H₂O）：符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

5.1.2 2, 6-二叔丁基对甲基苯酚（简称 BHT）：分析纯。

5.1.3 无水乙醇（C₂H₅OH）：优级纯。

5.1.4 三氯甲烷（CHCl₃）：分析纯。

5.1.5 甲醇 (CH_3OH)：色谱纯。

5.1.6 标准品

α -生育酚 ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$, CAS 号: 10191-41-0)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

β -生育酚 ($\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_2$, CAS 号: 148-03-8)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

γ -生育酚 ($\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_2$, CAS 号: 54-28-4)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

δ -生育酚 ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$, CAS 号: 119-13-1)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.2 试剂配制

5.2.1 甲醇：三氯甲烷溶液 (2: 1, V: V)

称取 0.015 g 2,6-二叔丁基对甲基苯酚于烧杯中，加入 100 mL 甲醇和 50 mL 三氯甲烷，混匀备用。

5.2.2 甲醇：水溶液 (95: 5, V: V)

量取 475 mL 甲醇，加入 25 mL 水，混匀备用。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 维生素 E 标准储备溶液 (1.00 mg/mL)

称取 4 种生育酚异构体标准品各 50.0 mg (准确至 0.1 mg)，用无水乙醇溶解于 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL。将溶液转移至棕色试剂瓶中，密封后，在 -20°C 避光保存，有效期 6 个月。临用前将溶液回温至室温，并进行浓度校正 (校正方法参见附录 A)。

5.3.2 维生素 E 标准溶液中间液 (10.00 $\mu\text{g/mL}$)

准确吸取维生素 E 标准储备溶液各 1.00 mL 于同一 100 mL 容量瓶中，用甲醇：水溶液 (95: 5, V: V) 定容至刻度，此溶液中维生素 E 各生育酚浓度为 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.3.3 维生素 E 标准系列工作溶液

分别准确吸取维生素 E 混合标准溶液中间液 0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇：水溶液 (95: 5, V: V) 定容至刻度，该标准系列中 4 种生育酚浓度分别为 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 、

5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.4 材料

5.4.1 植物材料：紫花苜蓿新鲜叶片。

5.4.2 有机系滤膜（孔径为 0.45 μm ）。

6 仪器设备

6.1 天平：感量为 0.0001 g。

6.2 离心机：转速 14000 g。

6.3 旋涡混合器。

6.4 旋转蒸发仪。

6.5 紫外分光光度计。

6.6 高效液相色谱仪：带荧光检测器。

7 分析步骤

7.1 试样制备

称取 50 mg 新鲜叶片在液氮中研磨至均匀一致，储存于离心管中，样品现用现制备。

7.2 提取

向储存样品的离心管中加入 1 mL 甲醇：三氯甲烷溶液（2：1，V：V），室温避光放置 20 min。然后加入 300 μL 三氯甲烷和 600 μL 水，涡旋混合均匀后，14000 g 离心 10 min。弃去上层水相，将下层有机相转入三角瓶中。

7.3 浓缩

将三角瓶接到旋转蒸发仪上，于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中减压浓缩至近干，用 400 μL 甲醇溶解三角瓶中的残留物，过 0.45 μm 有机系滤膜后供高效液相色谱测定。

7.4 色谱参考条件

C_{30} 色谱柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm ，或具同等性能的色谱柱；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；流动相：甲醇：水溶液（95：5，V：V）；流速：1 mL/min；激发波长：294 nm，发射波长：328 nm；进样量：20 μL 。

7.5 标准曲线的制作

将维生素 E 标准系列工作溶液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以峰面积为纵坐标，以标准测定液浓度为横坐标绘制标准曲线，计算直线回归方程。

7.6 样品测定

试样液经高效液相色谱仪分析,测得峰面积,采用外标法通过上述标准曲线计算其浓度。

8 分析结果的表述

试样中 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚的含量按式 (1) 计算:

$$Xi = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 100} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

Xi -试样中 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g) ;

c -根据标准曲线计算得到的 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚的质量浓度,单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$) ;

V -试样溶液定容的体积,单位为毫升 (mL) ;

m -试样的称样量,单位为克 (g) ;

100-换算为 100 克样品中含量的换算系数;

1000-将浓度单位 $\mu\text{g/mL}$ 换算为 mg/mL 的换算系数。

试样中维生素 E 的含量按式 (2) 计算:

$$X = X\alpha + X\beta + X\gamma + X\delta \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X -试样中维生素 E 的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g) ;

$X\alpha$ -试样中 α -生育酚的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g) ;

$X\beta$ -试样中 β -生育酚的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g) ;

$X\gamma$ -试样中 γ -生育酚的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g) ;

$X\delta$ -试样中 δ -生育酚的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g) 。

以两次测定结果的算术平均值表示,计算结果保留三位有效数字。

9 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%。

10 其他

当取样量为 50 mg, 定容 0.4 mL 时, 各生育酚的检出限为 32 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

附 录 A
(资料性)

维生素 E 标准溶液浓度校正方法

维生素 E 标准溶液配制后，在使用前需要对其浓度进行校正，具体操作如下：

分别取 α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚和 δ-生育酚标准储备溶液 500 μL 于各 10 mL 棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，分别用 1 cm 石英比色杯，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1 的测定波长测定其吸光度。

试液中维生素 E 的浓度按式 (A.1) 计算：

$$X = \frac{A \times 10000}{E} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

X-维生素 E 标准稀释液浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

A-维生素 E 标准稀释液的平均紫外吸光值；

10000-换算系数；

E-维生素 E 比色吸光系数（各维生素 E 相应的比色吸光系数见表 A.1）。

表 A.1 测定波长及比色吸光系数

目标物	波长/nm	E（比色吸光系数）
α-生育酚	292	76
β-生育酚	296	89
γ-生育酚	298	91
δ-生育酚	298	87