

团 体 标 准

T/SSX 007—2022

植物油 生育酚及生育三烯酚含量测定 反相高效液相色谱法

**Vegetable oils Determine the content of tocopherols and
tocotrienols by Reversed-Phase High Performance Liquid
Chromatography**

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

陕西省食品科学技术学会 发布

目次

前 言II

1. 范围 1

2. 规范性引用文件 1

3. 术语定义 1

4. 原理 1

5. 试剂 1

6. 仪器 2

7. 取样 3

8. 操作步骤 3

9. 结果表示 5

10. 精密度 5

附录 A 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《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。

本文件由陕西省食品科学技术学会提出并归口。

本文件负责起草单位：陕西师范大学、西安市粮油质量检验中心

本文件参与起草单位：陕西省粮油科学研究院

本文件主要起草人：李建科、武利梅、吴丽华、孟永宏、张玉环、赵晶晶、蔡静薇、雷亚楠。

本文件由陕西省食品科学技术学会负责解释。

本文件为首次发布。

联系信息如下：

单位：陕西省食品科学技术学会

电话：13659196911

地址：陕西省西安市长安区西长安街620号陕西师范大学食品工程与营养科学学院

邮编：710119

植物油 生育酚及生育三烯酚含量测定

反相高效液相色谱法

1. 范围

本文件规定了用高效液相色谱仪同时测定植物油中 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚及 α -、 β -、 γ -、 δ -生育三烯酚含量的方法。

本文件方法的检出限为 1 mg/kg（样品称样量为 0.5 g，定容 25 mL）。

2. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成必不可少条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；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 5524 动植物油脂 扦样

GB/T 26635 动植物油脂 生育酚及生育三烯酚含量测定 高效液相色谱法

3. 术语定义

下列术语定义适用于本文件。

3.1

生育酚含量 Tocopherols content

用本标准规定的方法测定的各单体生育酚含量的总和。

3.2

生育三烯酚含量 Tocotrienols content

用本标准规定的方法测定的各单体生育三烯酚含量的总和。

注：含量以毫克每千克表示。

4. 原理

植物油样用正己烷溶解，用甲醇水溶液均质提取后，通过高效液相色谱仪将各单体生育酚和生育三烯酚分离，依据标准溶液色谱保留时间对目标物质定性，采用外标法定量。

5. 试剂

5.1 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚，及 α -、 β -、 γ -、 δ -生育三烯酚标准物质。

α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚和 α -、 β -、 γ -、 δ -生育三烯酚标准物质可以自行选择，但其纯度需在95 %以上。

由于 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚和 α -、 β -、 γ -、 δ -生育三烯酚标准物质极不稳定，因此在每次测定前需要用紫外分光光度计测定所配标准溶液的浓度。

5.2 色谱级甲醇：用 HPLC 尼龙过滤器过滤（0.22 μm ）。

5.3 超纯水：用 HPLC 尼龙过滤器过滤（0.22 μm ）。

5.4 抗坏血酸。

5.5 2,6-二叔丁基对甲酚（BHT）。

6. 仪器

除常用实验仪器外，还包括以下仪器：

6.1 高效液相色谱系统

高压泵；

进样器；

柱温箱：柱温可调节在 30 $^{\circ}\text{C}$ (可选择)；

荧光检测器：具有 295 nm 激发波长和 330 nm 的发射波长；

数据处理系统。

推荐使用荧光检测器，若无荧光检测器，也可以使用紫外检测器。如果使用紫外检测器，波长应设置为 292 nm。

6.2 高效液相色谱分析柱：可选用 250 mm $\times$ 4.6 mm，填充平均粒径约为 4 μm 的 Poroshell 120 PFP 柱

注：柱的长度与直径可根据实验条件做相应选择。

6.3 IKA 均质机。

6.4 高速冷冻离心机。

6.5 紫外分光光度计：能在精确波长处准确测定。带 10 mm 比色皿。

6.6 量筒：100 mL。

6.7 移液管：5 mL，10 mL 和 20 mL。

6.8 容量瓶：50 mL 和 25 mL。

6.9 氮吹仪。

7. 取样

所取样品应具代表性。在运输储藏过程中不得受损或变质。
取样不是本标准中规定的部分，推荐采用 GB/T 5524。

8. 操作步骤

注意：在分析过程中生育酚的氧化可能导致试验结果偏低。氧化速度随着碱金属、热和光的影响而增加，检测时应避免这些因素的影响。

8.1 标准溶液制备

用正己烷溶解标准物质，配制生育酚及生育三烯酚标准储备液质量浓度为1.00 mg/mL，转移至棕色标液瓶中，标准储备液置于-18 °C冰箱中避光保存，最多放置一周。用移液管吸取5 mL储备液至样品试管中，在温度不超过40°C真空条件下，用氮吹仪除去正己烷。用移液管向试管中注入10 mL甲醇（5.2）振荡溶解残余物。用带10 mm比色皿的紫外分光光度计（6.5），在270nm~310nm之间选择适当的波长（见表1）测吸光度。测得的吸光度应在0.2~0.8之间。用吸光度除以表1中相应的校正系数计算浓度（用mg/mL表示）。

分别移取1 mL上述标准储备液于容量瓶中，定容至10 mL，得到混合标准中间液。用90%甲醇稀释成0.05, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μg/mL的混合标准工作液，现配现用。标准工作液在0 °C~4 °C之间避光储存。
试剂瓶外用铝箔包裹。

注：若采用紫外检测器时，也需要进行校正。标准溶液的浓度应该更高些。

表1 校正系数

波长/ nm	物质	校正系数
292	α-生育酚	0.007 6
296	β-生育酚	0.008 9
298	γ-生育酚	0.009 1
298	δ-生育酚	0.008 7
注：以上参数是根据生育酚的E值（1%/1cm）换算得到。例如，α-生育酚在292nm（在甲醇中）的E值（1%/ 1cm）为 76,因此，1 μ g/mL的α-生育酚在292 nm的吸光度为0.007 6。		

8.2 样品制备

称取油样 0.5 g（精确到 0.01）于 50 mL 离心管中，加入 0.1 g BHT 和 1 g 抗坏血酸，5 mL 正己烷涡旋振荡溶解，加入 6 mL 90%甲醇，9200（9000） r/min 均质 90 s，4 °C 下离心 5 min，收集水醇层于 25 mL 容量瓶中，重复 3 次，最后定容到 25 mL，过 0.22 μm 滤膜，待测。

（为防止光对维生素 E 的影响，整个操作处于避光环境，且在当天分析完成。）

8.3 测定

8.3.1 色谱参考条件

- 色谱柱：Poroshell 120 PFP 250 mm×4.6 mm；
- 荧光检测波长：激发波长 294 nm，发射波长 328 nm；
- 进样体积 10.0 μL；柱温：30 °C；
- 流动相：甲醇+水=90+10（v+v）； 流速：0.8 mL/min

若柱子(6.2)是新的或情况不明，或是其他原因需要处理，则需根据要求冲洗柱子。再用高效液相色谱流动相以 1 mL/min 的流速，冲洗柱子至少 30 min。

8.3.2 标准曲线的制作

设定仪器最佳条件，待基线稳定后，将生育酚和生育三烯酚混合标准工作溶液（8.1）按质量浓度由低到高分别注入高效液相色谱仪中进行测定，以标准系列溶液中目标化合物的浓度为横坐标，以色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.3.3 试样测定

依次将空白溶液和试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到色谱图，以色谱保留时间进行定性。根据标准曲线得到试样溶液中不同形式维生素E的浓度，平行测定次数不少于两次。不同形式维生素E色谱图参见附录 A。

各形式维生素E的相对保留时间见表2。

表2 样品中生育酚和生育三烯酚的相对保留时间

以α-生育酚为参照物			
α-生育酚=2.00	γ-生育酚=1.84	β-生育酚=1.68	δ-生育酚=1.51
α-生育三烯酚=1.42	γ-生育三烯酚=1.33	β-生育三烯酚=1.22	δ-生育三烯酚=1.12

9. 结果表示

样品中生育酚及生育三烯酚单体含量 x 可根据外标法计算，公式（1）如下：

$$X = \frac{C \times D \times V_1 \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——植物油中不同形式维生素E的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——由标准曲线算出不同形式维生素E的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

D ——样品定容后的稀释倍数，如未进行稀释，则 $D=1$ ；

V_1 ——洗脱液蒸干后定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

10. 精密度

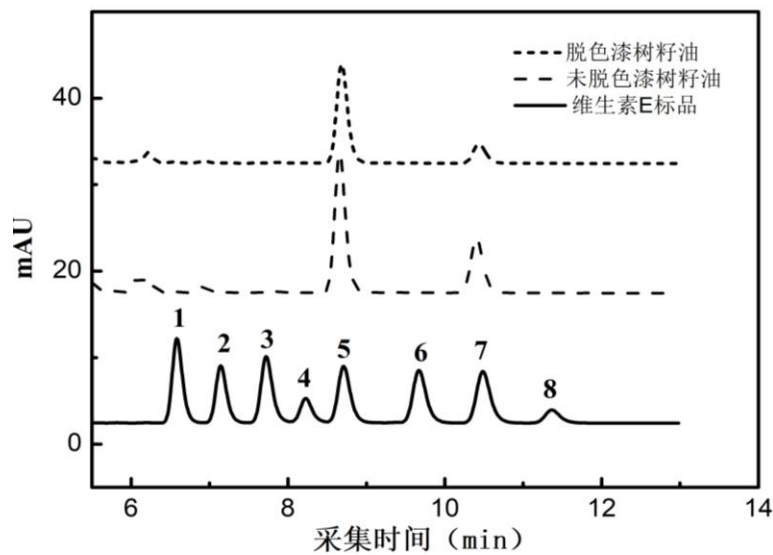
10.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对值不得超过算术平均值的10%，以大于这两个测定值的算术平均值的10%的情况不超过5%为前提。

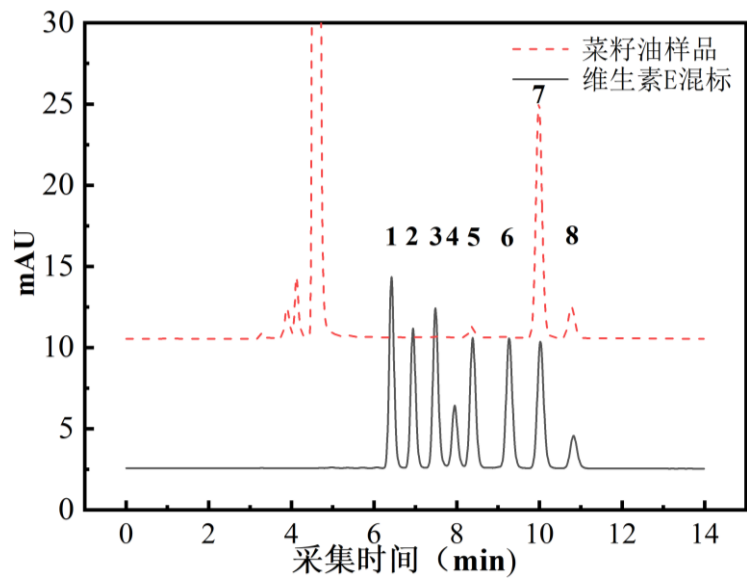
10.2 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对值不得超过算术平均值的15%，以大于这两个测定值的算术平均值的15%的情况不超过5%为前提。

附录 A
样品色谱图



a) 维生素E混合标准物质及漆树籽油样品



b) 维生素E混合标准物质及菜籽油样品

1: δ -生育三烯酚 2: β -生育三烯酚 3: γ -生育三烯酚 4: α -生育三烯酚

5: δ -生育酚 6: β -生育酚 7: γ -生育酚 8: α -生育酚

图A 维生素E混合标准物质及植物油样品色谱图
