

《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》

团体标准编制说明

（征求意见稿）

陕西师范大学

《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》 团体标准编制说明

1 工作概况（包括任务来源、目的与意义、标准主导单位、参与单位、主要工作过程、起草人员任务分工）

1.1 任务来源

本标准任务来源于陕西师范大学食品工程与营养科学学院食用木本油料国家重点研发计划课题组承担的项目中的相关内容。

本标准的制定工作由陕西省食品科学技术学会提出、归口并负责解释。本标准由陕西师范大学和西安市粮油质量检验中心负责起草。

1.2 目的和意义

维生素 E 存在 8 种形式，分别为 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚及相应的生育三烯酚，是人体主要的脂溶性抗氧化剂。其中， α -生育酚被认为是维生素 E 的主要活性形式，也是植物油中普遍含量较高的一种。维生素 E 有着很多重要的生理功能，其中最具有代表性的就是它的抗氧化作用。维生素 E 的酚羟基可以有效猝灭油脂中的单线态氧，保护多不饱和脂肪酸免受氧化破坏，维持生物膜的正常结构，保护皮脂和细胞膜蛋白质及皮肤中的水分，且能促进人体细胞的再生，延缓细胞的老化过程。不同形式的维生素 E 具有不同的生物活性作用，如 γ -生育酚可缓解中度结肠炎，并抑制中度结肠炎促进的结肠癌，但也有报道， γ -、 δ -生育酚的混合物对偶氮甲烷诱导的结肠癌的发生无明显影响，同时 α -生育酚对结肠癌也无影响。人体从外界摄入维生素 E 的主要来源之一是植物油，维生素 E 作为植物油的伴随物之一，其组成和含量不仅体现了植物油的营养价值，而且对植物油的氧化稳定性(可以延缓植物油的氧化酸败，延长植物油的保质期)也存在一定的影响。因此，维生素 E 的组成和含量作为衡量食用植物油脂质量的重要指标，建立植物油中不同形式维生素 E 含量的精准分析检测技术，对植物油质量控制和品质评价具有重要的意义。

目前，不同形式维生素 E 测定方法主要有：荧光法、比色法、高效液相色谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱法、电化学分析法等。比色法只能测定维生素 E 的总含量，不能测定各种单体的含量；光谱法前处理繁琐，共存物对检测结果干扰较大；气相色谱法因维生素 E 分子量大、分子汽化度低，保留时间长且灵敏度低；气相色谱-质谱法仪器昂贵，普适性低；电化学分析法虽然灵敏度高、具有一定的选择性，但植物油中共存物的干扰会导致测定结果偏高，不适合植物油中维生素 E 含量的测定；反相高效液相色谱法具有快速、灵敏、准确度和精密度高等优点，适合于植物油中不同形式维生素 E 含量的测定。在样品分析中，前处理方法是最常遇见的问题。这是由于在绝大多数的实际样品分析中，目标分析物通常浓度低且样品基质复杂多样，因此建立合适的针对目标物质的提取方法，以达到浓缩痕量目标物、除去干扰物、消除对分析仪器有害成分、降低检出限、提高检测的灵敏度和选择性的目的是非常有必要的。

针对植物油中维生素 E 测定方法的现行标准有 GB 5009.82《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》第二法、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》、

NY/T 1598《食用植物油中维生素 E 组分和含量的测定 高效液相色谱法》。其中 GB 5009.82 第二法和 NY/T 分别采用正相高效液相色谱法和反向高效液相色谱法对植物油中的 4 种生育酚进行测定，未对生育三烯酚进行定性定量分析；GB/T 26635 规范了植物油中维生素 E 八种形式的测定方法，但其测定时间长且采用硅胶柱进行分析时不能有效分析 γ -生育酚和 β -生育三烯酚。采用正相高效液相色谱分析时，流动相采用的溶剂毒性较大，不符合现在提倡的“绿色化学”原理，同时样品前处理方法采用有机溶剂直接溶解，该法虽然前处理简单，但对仪器的污染较大，不适合大批量样品的检测；同时 GB/T 26635 和 NY/T 中前处理方法涉及到皂化方法，操作过程烦琐导致维生素 E 损耗，且会用到大量乙醚等有毒试剂。

目前并未查询到采用反相高效液相色谱法同时测定植物油中维生素 E 8 种形式，因此本研究建立了均质提取法结合反相液相高效色谱法对植物油中不同形式的维生素 E 进行测定，该法样品前处理简便快速，具有经济实用性，同时检测时间大大缩短，降低检测成本，可实现植物油总不同形式维生素 E 的快速测定。

1.3 标准主导单位

陕西师范大学、西安市粮油质量检验中心。

1.4 标准参与单位

陕西省粮油科学研究院

1.5 主要工作过程

1.5.1 标准预研

为了更好地完成标准制订任务，并使标准适应市场需要。标准编制工作组制定了《植物油 生育酚及生育三烯酚含量测定 反相液相高效色谱法》标准编写方案，明确任务职责及确定了标准制定技术路线。

1.5.2 标准起草

根据标准预研的结果，组成起草工作组进行起草准备工作，包括资料收集，国内外状况分析，必要的实验验证等，依据国家标准的编写规则起草标准及标准编制说明。

1.5.3 征求意见和审查

社会公开征求意见，对征集的意见进行形成《征求意见汇总处理表》，并根据意见修改；由学会组织相关专家成立标准技术审查专家组，进行审查。

1.5.4 标准审批会

学会对团体标准报批材料进行形式审查和审批。

1.6 起草人员任务分工

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。

起草人员负责标准制定工作的组织、协调，相关资料的查阅、收集，标准文本及编制说明的起草、撰写，组织召开多次研讨会，通过电子邮件、传真等方式，征集、整理和归纳相关的意见和建议。

2 标准的编写原则

本标准的编写规则是按照 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》的要求进行。

- (1) 本标准编制遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”原则。
- (2) 本方法能够满足不同植物油中维生素E不同形式的检测要求。
- (3) 本方法的精密度、准确度和灵敏度达到国内外同等水平。

3 主要内容

3.1 范围

本标准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。

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

3.2 规范性引用文件

GB/T 5524 动植物油脂 扦样

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

3.3 原理

植物油样中的维生素 E 经过均质提取后，通过高效液相色谱仪将不同形式维生素 E 分离，用色谱保留时间对目标物质定性，采用外标法定量。

3.4 检测仪器及检测程序

高效液相色谱仪

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 μ L；柱温：30 $^{\circ}$ C；

流动相：甲醇+水=90+10（v+v）； 流速：0.8 mL/min

3.5 样品前处理方法

称取油样 0.5 g（ ± 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 0.1 g BHT 和 1 g 抗坏血酸，5 mL 正己烷溶解，加入 6 mL 90%甲醇，9200 r/min 均质 90 s，4 $^{\circ}$ 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 μ m 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。）

3.6 分离检测条件的优化

3.6.1 色谱分离

在设定的洗脱条件下（色谱柱：Poroshell 120 PFP 色谱柱（250 mm×4.6 mm，4 μ m，美国安捷伦公司）；流动相为 90%甲醇水（v/v）；等度洗脱，流速：0.8 mL/min；进样体积 10.0 μ L；柱温：30 $^{\circ}$ C；激发波长为 294 nm；发射波长为 328 nm），本文比较了 C8，C18-PAH，C18-XDB，Poroshell 120 PFP 四种色谱柱的分离效果。由图 1 可知，C18 和 C8 色谱柱不能分离 β -生育酚和 γ -生育酚，Poroshell 120 PFP

液相色谱柱在硅胶基质上键合五氟代苯基硅烷，对极性化合物具有独特的保留能力，能在 15 min 中内实现 8 种形式的分离，同时避免了使用极端 PH 条件和复杂流动相；与正相液相色谱相比分析时间更短。且在荧光检测下，维生素 E 具有更高的响应。维生素 E 标准品和菜籽油样品液相色谱图见图 2，由图可知，该检测方法在植物油样品中同样具有很好的分离度。

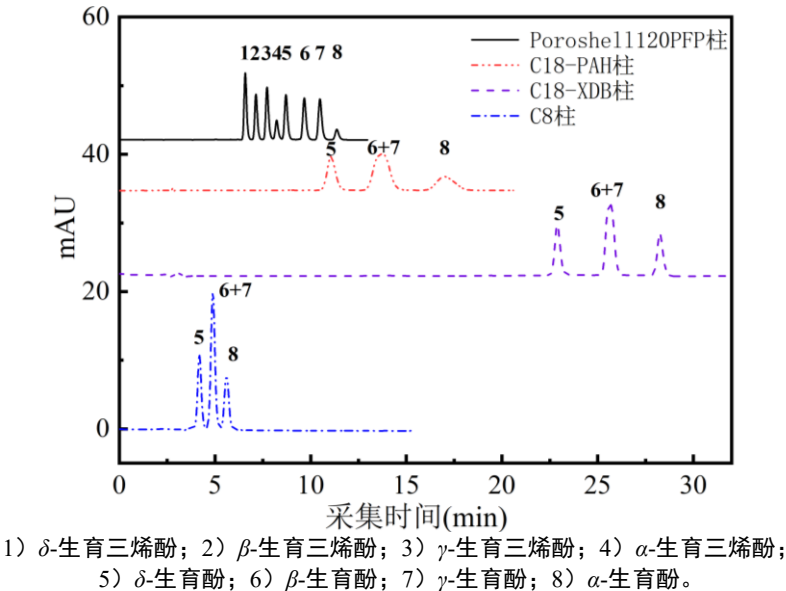


图 1 不同色谱柱分离维生素 E 标准品液相色谱图

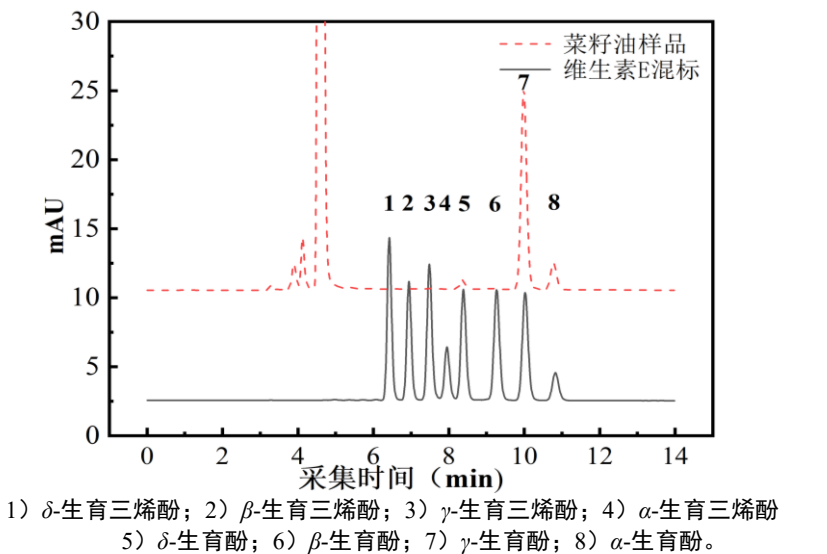


图 2 Poroshell 120 PFP 色谱柱分离维生素 E 标准品和菜籽油样品液相色谱图

3. 6. 2 前处理条件的优化

以菜籽油样品为例，采用不同前处理方法进行对照，平行测定 6 次，结果见表 1。由表 1 可知：采用 GB/T 26635 的方法对样品进行皂化处理，操作过程繁琐导致维生素 E 损耗，造成测定结果偏低，精密度相对较差；同时，皂化过程中会用到大量乙醚等有毒试剂，不利于快速检测；固相萃取法和均质快速提取法所得的结果与皂化法无显著性差异 ($p>0.05$)，却都高于皂化法的测定结果，但固相萃取法固相萃取小柱价格较为昂贵，所以均质快速提取操作方便快捷、具有经济实用性，减少了前处理过程中维生素 E 的损耗，精密度较高。

表 1 菜籽油的对照试验结果 (n=6)

前处理方法	含量 (mg/kg)								
	δ -T	β -T	γ -T	α -T	δ -T ₃	β -T ₃	γ -T ₃	α -T ₃	总量
皂化法	11.78±0.65	2.09±0.12	347.21±14.38	112.63±10.71	--	--	--	--	473.71±20.86
固相萃取法	15.71±0.32	3.38±0.05	389.69±13.28	152.23±6.10	--	--	2.90±0.13	--	563.91±13.88
均质快速 提取法	22.19±0.66	5.58±0.28	392.76±12.60	153.26±5.80	--	--	3.94±0.22	--	578.02±11.57

3. 7 方法学验证

3. 7. 1 维生素 E 线性范围、检出限和定量限

配制维生素E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。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。在已建立的检测条件下，采用外标法进行定量，横坐标为化合物的质量浓度（x，μg/mL），目标物质的峰面积（y）为纵坐标进行线性回归，同时对目标化合物的检出限、定量限进行考察，结果见表2。

表 2 维生素 E 的线性范围、检出限、定量限(n=6)

目标物质	线性范围 (μg/mL)	标准曲线	回归系数 (R ²)	检出限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
δ -生育三烯酚	0.5~10.6	y=17.26x-0.64	0.999 5	0.02	0.07
β -生育三烯酚	0.5~10.6	y=17.25x-0.64	0.999 5	0.02	0.07
γ -生育三烯酚	0.5~10.6	y=21.65x-0.43	0.999 5	0.02	0.07
α -生育三烯酚	0.4~9.6	y=8.49x-0.11	0.999 2	0.02	0.07
δ -生育酚	0.4~8.2	y=25.11x-1.56	0.999 4	0.02	0.07
β -生育酚	0.5~10.6	y=19.65x-0.87	0.999 7	0.02	0.07
γ -生育酚	0.5~10.6	y=20.22x-0.33	0.999 5	0.02	0.07
α -生育酚	0.4~9.6	y=5.50x+0.09	0.999 5	0.05	0.17

由表 2 可知，在线性范围内，维生素 E 的质量浓度与峰面积的线性关系良好，回归系数均大于 0.999。检出限是 0.02~0.05 μg/mL，定量限是 0.07~0.17 μg/mL。该检测方法分离度好，灵敏度较高，可以同时对植物油中的维生素 E 8 种形式进行定量分析。

3. 7. 2 精密度与回收率

对菜籽油样品添加低、中、高三个浓度水平的维生素 E 标品，每个水平进行 3 次重复试验，得到该方法提取维生素 E 的回收率，如表 3 所示，加标回收率为 90.00%-110.00%。

表 3 均质提取菜籽油的准确度（加标回收率）

成分	本底平均值 /μg	加标量 /μg	测定平均值 /μg	加标回收率/%
δ-生育酚	5.55	2.5	7.95	96.00
		5.0	10.41	97.20
		25.0	30.31	99.04
β-生育酚	1.40	0.7	2.09	98.57
		1.5	2.93	102.0
		7.0	8.18	96.86
γ-生育酚	98.19	50	147.57	98.76
		100	193.77	95.58
		500	623.24	105.01
α-生育酚	38.32	20	57.10	96.81
		40	77.21	97.10
		200	234.72	98.20
δ-生育三烯酚	--	0.1	0.11	110.0
		0.2	0.19	95.0
		1	1.02	102.0
β-生育三烯酚	--	0.1	0.10	100.0
		0.2	0.21	105.0
		1	1.03	103.0
γ-生育三烯酚	0.99	0.5	1.46	94.0
		1	2.05	106.06
		5	6.45	109.2
α-生育三烯酚	--	0.1	0.09	90.0
		0.2	0.19	95.0
		1	1.05	105.0

注：“--”表示未检出，下同。

表 4 HPLC-FLD 同时测定维生素 E 8 种形式方法的精密度（n=6）

序号	含量/(mg/kg)							
	δ-T	β-T	γ-T	α-T	δ-T3	β-T3	γ-T3	α-T3
1	22.79	5.53	375.52	144.83	--	--	4.16	--
2	22.44	5.79	397.63	156.42	--	--	4.00	--
3	21.98	5.76	400.66	157.66	--	--	4.09	--
4	21.73	6.17	392.35	152.95	--	--	3.58	--
5	21.22	5.65	409.32	148.08	--	--	3.74	--
6	21.96	6.23	381.10	159.66	--	--	4.08	--
RSD/%	2.99	4.83	3.20	3.78	--	--	5.79	--

由表 4 可知，使用同一菜籽油进行 6 次重复试验，除 δ-生育三烯酚，β-生育三烯酚和 α-生育三烯酚未检出外，其余检出的 5 种维生素 ERSD 均小于 5.79%，说明方法重现性良好。

综上所述，本方法测定植物油中生育酚及生育三烯酚准确度良好

3.8 方法验证

按照标准草案《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》提供的方法进行测试，方法线性范围、检出限、定量限、精密度、准确度是评价方法水平的主要技术指标，选取 3 家资深检测单位进行方法学验证。

4 标准实施建议

建议标准实施前有 6 个月以上的实施前的宣贯培训期、缓冲期和过渡准备时间。

5 标准知识产权说明

无

6 重大意见分歧处理

无

7 其他应予说明的事项

无

8 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准所涉及的引用标准均为本行业现行有效的国家标准及行业标准。与相关法律、法规、规章及相关标准协调一致，没有冲突。

陕西师范大学
2022 年 11 月 28 日