

# 正相高效液相色谱法同时测定食用油中生育酚和生育三烯酚的含量

刘旭<sup>1</sup>, 蒋国振<sup>1</sup>, 郭美琳<sup>2</sup>, 刘萍<sup>1</sup>

(1. 陕西省粮油产品质量监督检验中心, 西安 710016; 2. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 西安 710021)

**摘要:**在 GB 5009.82—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》第二法和 GB/T 26635—2011《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》两个国标方法的基础上, 结合并优化了两个标准中的测定条件, 确定了使用硅胶柱同时测定食用油中  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚和  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚 8 种异构体的正相高效液相色谱法。结果表明: 样品用 90% 正己烷 + 10% 甲基叔丁基醚 - 四氢呋喃 - 甲醇混合液(体积比 20:1:0.1) 为流动相涡旋振荡溶解 10 s 后, 在用流动相平衡 90 min 以上的硅胶色谱柱上进行分离, 经荧光检测器分析, 8 种异构体在 0.2 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99, 检出限均为 2 mg/kg, 定量限均为 6 mg/kg, 回收率在 70.08% ~ 116.33% 之间, 相对标准偏差为 1.14% ~ 9.85%。优化后方法的回收率和重复性得到了提高, 分离效果也有很大改善, 能满足食用油中生育酚和生育三烯酚含量同时测定的需要。

**关键词:**食用油; 生育酚; 生育三烯酚; 正相高效液相色谱

中图分类号: TS225.1; TQ646 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)01-0137-04

## Simultaneous determination of tocopherol and tocotrienol in edible oil by NP-HPLC

LIU Xu<sup>1</sup>, JIANG Guozhen<sup>1</sup>, GUO Meilin<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>

(1. Shaanxi Grain and Oil Products Quality Supervision and Inspection Center, Xi'an 710016, China; 2. School of Food and Bioengineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** Based on GB 5009.82—2016 second method and GB/T 26635—2011 two national standard methods, the determination conditions in the two standards were combined and optimized, and the normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC) detection method for simultaneous determination of  $\alpha$ - ,  $\beta$ - ,  $\gamma$ - ,  $\delta$ -tocopherol and  $\alpha$ - ,  $\beta$ - ,  $\gamma$ - ,  $\delta$ -tocotrienols in edible oil using silica gel column was determined. The results showed that with 90% *n*-hexane + 10% methyl *tert*-butyl ether - tetrahydrofuran - methanol mixture (volume ratio 20:1:0.1) as mobile phase, the sample was dissolved by vortex agitation for 10 s, then separated on a silica gel chromatographic column, which had been equilibrated with mobile phase for more than 90 min, finally analyzed by a fluorescence detector. The linear range of eight isomers was 0.2 - 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with the correlation coefficients above 0.99, and the detection limit and quantitation limit were 2 mg/kg and 6 mg/kg respectively. The recovery rates of the eight isomers was 70.08% - 116.33%, and the relative standard deviation was 1.14% - 9.85%. After optimization, the recovery rate and repeatability of the determination method were improved, and the separation effect was also greatly improved. The method could meet the requirement of simultaneous determination of tocopherol and tocotrienol in edible oil.

收稿日期: 2020-04-20; 修回日期: 2020-10-06

作者简介: 刘旭(1980), 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事粮油质量安全检测工作(E-mail) liuxu1980513@163.com。

**Key words:** edible oil; tocopherol; tocotrienol; NP-HPLC

生育酚和生育三烯酚总称为维生素 E<sup>[1-2]</sup>, 是人体代谢所必需的一种脂溶性维生素, 包括  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚及  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚<sup>[3]</sup>。维生素 E 具有抗氧化、抗衰老、抗不育、调节免疫力等作用, 对生殖功能、细胞代谢均有影响, 对一些临床疾病有积极的预防作用<sup>[4-6]</sup>。诸多证据表明生育三烯酚在抗氧化、降低胆固醇、抗癌症等方面具有独特的生理功能<sup>[7]</sup>。

目前, 针对生育酚和生育三烯酚, 常用检测方法有分光光度法、高效液相色谱法、气相色谱法和傅里叶变换红外光谱法等。测定食用油中生育酚和生育三烯酚最常用的国家标准方法为 GB 5009. 82—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》和 GB/T 26635—2011《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》。GB 5009. 82—2016 中包括第一法反相高效液相色谱法和第二法正相高效液相色谱法, 反相高效液相色谱法前处理烦琐、检测效率不高, 正相高效液相色谱法前处理简单、检测效率高, 但两种方法都只能测定食用油中的  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚 4 种异构体, 是否能同时测定  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚 4 种异构体, 没有给出明确说明; GB/T 26635—2011 可同时测定食用油中  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚和  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚 8 种异构体, 并且前处理步骤简单, 检测效率高, 成本低廉。由于要同时分离 8 种维生素 E 异构体, 对色谱柱的要求较高, 该标准中推荐了二醇基硅胶柱和硅胶柱两种色谱柱, 使用二醇基硅胶柱并按照推荐的色谱条件可以轻易将 8 种异构体有效分离, 但二醇基硅胶柱较硅胶柱而言对于一般实验室来说不常配备, 且采购价格较为昂贵, 若选用硅胶柱并按照该标准推荐的色谱条件不能将  $\gamma$ -生育酚和  $\beta$ -生育三烯酚有效分离(参见 GB/T 26635—2011), 对准确测定其中每种异构体的含量造成一定困难。

本文在 GB 5009. 82—2016 第二法和 GB/T 26635—2011 两个国标方法的基础上, 通过实验研究, 结合并优化了两个标准中的测定参数, 确定了使用硅胶柱同时测定食用油中  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚和  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚 8 种异构体的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菜籽油(陕西西瑞粮油工业有限公司提供), BHT(国药集团), 正己烷(色谱级), 四氢呋喃(色谱级)。

$\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚标准品,  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚标准品, 均由国家标准物质中心提供。

取上述标准品用正己烷分别稀释成 1.0 mg/mL 的单标储备液和 0.1 mg/mL 的混标储备液。

Agilent1100 高效液相色谱仪(配有荧光检测器), 涡旋振荡器。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品前处理

称取 2 g 油样(准确至 0.01 g)于 25 mL 的棕色容量瓶中, 加入 0.1 g BHT, 加入 10 mL 流动相超声或涡旋振荡溶解后, 用流动相定容至刻度, 摇匀。过 0.22  $\mu$ m 有机系滤头于棕色进样瓶中, 待进样。

#### 1.2.2 标准曲线绘制

生育酚和生育三烯酚单标工作液的配制: 取 0.2 mL  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育酚和  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -生育三烯酚的单标储备液(1.0 mg/mL), 分别转移至 100 mL 容量瓶中, 用正己烷定容至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 2.0  $\mu$ g/mL 的 8 种异构体的单标溶液。将 8 种异构体的单标溶液分别进样 20  $\mu$ L 进行高效液相色谱分析, 记录每种异构体的保留时间。

生育酚和生育三烯酚混标工作液的配制: 分别吸取 0.2、0.4、2.0、5.0、10.0 mL 混标储备液(0.1 mg/mL), 用正己烷定容至 100 mL, 得到 0.2、0.4、2.0、5.0、10.0  $\mu$ g/mL 系列混标工作液。将系列混标工作液分别进样 20  $\mu$ L 进行高效液相色谱分析, 记录保留时间与峰面积, 根据单标的保留时间确定混标色谱图中每个峰对应的异构体, 分别以 8 种(生育酚和生育三烯酚)异构体质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制各异构体的标准曲线。

#### 1.2.3 高效液相色谱条件

Agilent 硅胶柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 柱温箱温度 25  $^{\circ}$ C, 流动相为 90% 正己烷 + 10% 甲基叔丁基醚-四氢呋喃-甲醇混合液(体积比 20:1:0.1), 流速 0.8 mL/min, 激发波长 294 nm, 发射波长 328 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理方法的优化

正相高效液相色谱法测定食用油中的生育酚和生育三烯酚前处理方法相对简单, 只需要用流动相把食用油样品溶解定容即可。GB/T 26635—2011 中没有给出具体的溶解方法; GB 5009. 82—2016 第二法中规定使用超声或涡旋振荡方式进行溶解。通

过实验发现,采用超声和涡旋振荡处理一定时间最终都能完全溶解食用油样品,目标物的提取率也基本一样,但超声处理用时 60 s,而涡旋振荡处理用时 10 s,所以最终确定采用涡旋振荡 10 s 的方式对样品进行溶解提取。

## 2.2 流动相的选择

GB/T 26635—2011 中推荐可使用硅胶柱对生育酚和生育三烯酚进行分离,方法中提供的流动相为 3.85% 四氢呋喃 - 正庚烷溶液,流速为 1 mL/min。实验发现,在使用硅胶柱分离生育酚和生育三烯酚 8 种异构体时,用 3.85% 四氢呋喃 - 正庚烷溶液作为流动相,无论流速如何调整,都不能将  $\gamma$ -生育酚和  $\beta$ -生育三烯酚有效分离,两者的色谱峰基本重叠。因此,我们在不改变色谱柱的情况下尝试参照 GB 5009.82—2016 中第二法推荐的流动相进行洗脱,即 90% 正己烷 + 10% 甲基叔丁基醚 - 四氢呋喃 - 甲醇混合液(体积比 20:1:0.1),洗脱流速为 0.8 mL/min。实验结果显示,该洗脱条件能够将生育酚和生育三烯酚的 8 种异构体全部分离,如图 1 所示,色谱峰基本能够积分分析。因此,使用硅胶柱分离上述 8 种异构体时,建议采用 90% 正己烷 + 10% 甲基叔丁基醚 - 四氢呋喃 - 甲醇混合液(体积比 20:1:0.1)为流动相进行洗脱。

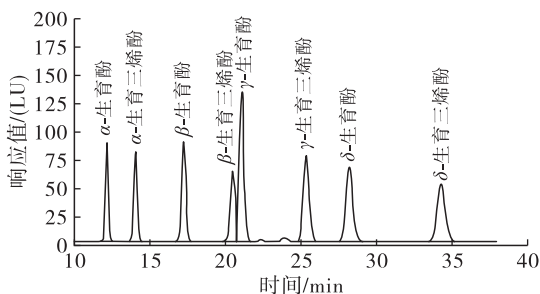


图 1 生育酚和生育三烯酚 8 种异构体标样的 HPLC 图

## 2.3 色谱柱平衡时间的优化

对于多组分的分离,保留时间漂移会使目标物辨认错误。所以保留时间的稳定性是生育酚和生育三烯酚 8 种异构体能被准确辨识的关键,而高效液相色谱分析中经常会有保留时间漂移的情况发生,即各目标物保留时间统一沿单方向向前或向后变化<sup>[8]</sup>。在流动相没有被污染或没有使用梯度洗脱的情况下,发生漂移的原因一般为液相色谱柱没有得到充分平衡,所以要准确辨识 8 种异构体,必须对色谱柱的平衡时间进行优化,使色谱柱键合相的空间结构达到稳定状态,各异构体保留时间不发生明显漂移。我们分别使用流动相对色谱柱进行了 30、

60 min 和 90 min 平衡,每次平衡后进混标和加标样品并记录每个峰的保留时间,结果显示,平衡 30、60 min 后进样,第一针和第二针相比较,每个组分的保留时间都有明显漂移,仪器辨识 8 种组分出现错误;平衡 90 min 后进样,第一针和第二针相比较,每个组分的保留时间基本无明显漂移,仪器能准确辨识 8 种异构体。最终确定用流动相对色谱柱平衡至少 90 min 后才能对标样和样品进行测定。

## 2.4 线性关系、检出限和定量限

生育酚及生育三烯酚 8 种异构体的标准曲线回归方程、相关系数、检出限和定量限结果见表 1。

表 1 生育酚及生育三烯酚 8 种异构体的回归方程、相关系数、检出限及定量限

组分	回归方程	相关系数	检出限/ (mg/kg)	定量限/ (mg/kg)
$\alpha$ -生育酚	$y = 83.3164x + 15.5996$	0.9975	2	6
$\beta$ -生育酚	$y = 141.2719x + 22.5570$	0.9976	2	6
$\gamma$ -生育酚	$y = 146.2619x + 28.2609$	0.9979	2	6
$\delta$ -生育酚	$y = 148.2346x + 21.8623$	0.9978	2	6
$\alpha$ -生育三烯酚	$y = 116.0123x + 19.1360$	0.9976	2	6
$\beta$ -生育三烯酚	$y = 134.5032x + 18.8576$	0.9978	2	6
$\gamma$ -生育三烯酚	$y = 198.0837x + 26.6878$	0.9981	2	6
$\delta$ -生育三烯酚	$y = 172.4762x + 21.5653$	0.9979	2	6

由表 1 可知,生育酚及生育三烯酚 8 种异构体在 0.2 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.99,检出限均为 2 mg/kg,定量限均为 6 mg/kg。

## 2.5 回收率和精密度

根据 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》标准中附录 F 对回收率和精密度的要求,在菜籽油样品中加入生育酚及生育三烯酚 8 种异构体的混标溶液,制成质量浓度分别为 20、100、500 mg/kg 的加标样品,按照 1.2.1、1.2.3 的方法分别对加标样品和基质空白样品进行处理分析,加标样品每个水平测定 6 次,根据扣除基质空白后的测定结果计算 8 种异构体的平均回收率和相对标准偏差,结果见表 2。

由表 2 可以看出,生育酚及生育三烯酚的 8 种异构体的平均回收率在 70.08% ~ 116.33% 之间,相对标准偏差为 1.14% ~ 9.85%。

表2 样品加标回收测定结果

样品	组分	加标量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)						平均回收率/%	相对标准偏差/%
			1	2	3	4	5	6		
1	$\alpha$ -生育酚	20	14.5	17.5	15.6	16.5	14.3	18.2	80.50	9.85
	$\beta$ -生育酚	20	14.1	15.1	14.8	15.5	14.5	13.6	73.00	4.71
	$\gamma$ -生育酚	20	13.6	13.5	15.3	14.3	13.2	14.2	70.08	5.40
	$\delta$ -生育酚	20	15.5	16.2	16.8	16.4	15.0	15.5	79.50	4.25
	$\alpha$ -生育三烯酚	20	17.5	15.1	16.2	16.8	15.5	17.3	82.00	5.92
	$\beta$ -生育三烯酚	20	16.5	14.1	15.5	14.2	17.8	14.5	77.17	9.57
	$\gamma$ -生育三烯酚	20	18.1	19.2	19.8	17.2	18.7	19.8	94.00	5.43
	$\delta$ -生育三烯酚	20	19.5	19.1	19.9	19.2	18.0	19.5	96.00	3.39
2	$\alpha$ -生育酚	100	98.8	102.1	101.5	104.6	101.7	103.2	101.98	1.90
	$\beta$ -生育酚	100	87.8	85.5	86.5	86.1	85.9	89.9	86.95	1.89
	$\gamma$ -生育酚	100	83.4	81.2	72.5	70.9	76.6	75.8	76.73	6.31
	$\delta$ -生育酚	100	94.5	98.2	99.8	100.5	98.5	100.1	98.60	2.23
	$\alpha$ -生育三烯酚	100	82.9	87.2	86.4	87.5	88.7	92.3	87.50	3.50
	$\beta$ -生育三烯酚	100	110.3	97.2	99.3	98.1	105.3	103.1	102.22	4.92
	$\gamma$ -生育三烯酚	100	87.5	91.6	89.3	90.5	91.5	92.5	90.48	2.02
	$\delta$ -生育三烯酚	100	85.5	88.9	88.2	90.6	88.5	91.1	88.80	2.25
3	$\alpha$ -生育酚	500	535.0	501.0	541.0	499.0	508.0	540.0	104.13	3.85
	$\beta$ -生育酚	500	556.0	521.0	531.0	568.0	519.0	571.0	108.87	4.33
	$\gamma$ -生育酚	500	452.0	451.0	458.0	488.0	450.0	453.0	91.73	3.19
	$\delta$ -生育酚	500	560.0	541.0	559.0	580.0	589.0	600.0	114.30	3.84
	$\alpha$ -生育三烯酚	500	540.0	530.0	525.0	540.0	530.0	535.0	106.67	1.14
	$\beta$ -生育三烯酚	500	601.0	570.0	590.0	560.0	591.0	578.0	116.33	2.61
	$\gamma$ -生育三烯酚	500	519.0	510.0	530.0	540.0	521.0	532.0	105.07	2.04
	$\delta$ -生育三烯酚	500	545.0	532.0	521.0	550.0	553.0	541.0	108.07	2.22

### 3 结论

本文在 GB 5009.82—2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》第二法和 GB/T 26635—2011《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》两个国标方法的基础上,结合并优化了两个标准中的测定条件,确定了使用硅胶柱同时测定食用油中  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -生育酚和  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -生育三烯酚 8 种异构体的正相高效液相色谱法。样品用 90% 正己烷 + 10% 甲基叔丁基醚 - 四氢呋喃 - 甲醇混合液 (体积比 20:1:0.1) 为流动相涡旋振荡溶解 10 s 后,在用流动相平衡 90 min 以上的硅胶色谱柱上进行分离,经荧光检测器分析,8 种异构体在 0.2 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.99,检出限均为 2 mg/kg,定量限均为 6 mg/kg,回收率在 70.08% ~ 116.33% 之间,相对标准偏差为 1.14% ~ 9.85%,优化后进一步提高了该方法的回收率和重复性,分离效果也有很大改善,能满足食用油中生育酚及生育三烯酚含量同时测定的需要。

#### 参考文献:

[1] 李柰,樊琛,李小波,等. 食用植物油中生育酚含量测定

方法优化及分析[J]. 食品科学技术学报,2015,33(3): 59-63.

- [2] 魏雪缘,沈伟健,张睿,等. 食用植物油中生育酚和生育三烯酚检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(2):686-692.
- [3] 朱丽,谭微,邓梦雅,等. 反相高效液相色谱法测定乳粉中生育酚和生育三烯酚[J]. 食品科技,2017,42(10): 306-312.
- [4] 仓宝成,宫璀璨,王莉,等. 维生素 E 在体内外具有抗氧化作用[J]. 基础医学与临床,2016,36(1): 80-84.
- [5] 杨溢,何悦,陈思远,等. 维生素 E 对帕金森病模型细胞的抗凋亡作用及其机制[J]. 江苏大学学报(医学版), 2017,27(1):27-30,35.
- [6] HUANG S H, NG L T. An improved high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and  $\gamma$ -oryzanol in rice[J]. J Chromatogr A,2011,1218:4709-4713.
- [7] NESARETNAM K, STEPHEN R, DILS R, et al. Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status[J]. Lipids, 1998, 33(5): 461-469.
- [8] 王娜,王海娇,岳明新,等. 高效液相色谱常见问题分析与对策[J]. 辽宁化工,2008,37(4):227-280.