

植物油中生育酚与生育三烯酚测定方法比较

潘开林, 季敏, 牛跃庭, 胡明明, OOI Cheng Keat

(马来西亚棕榈油总署 大马棕榈油技术研发(上海)有限公司, 上海 201108)

摘要: 比较 AOCS 中两种测定生育酚与生育三烯酚的方法, 即高效液相色谱—紫外法和高效液相色谱—荧光法。结果表明: 高效液相色谱—荧光法具有更好的回收率和准确性、更低的检出限和良好的抗杂质干扰能力, 使用高效液相色谱—荧光法测定 12 种植物油中生育酚与生育三烯酚的含量, 其结果均在文献参考范围之内。

关键词: 高效液相色谱; 植物油; 生育酚; 生育三烯酚

中图分类号: TS 207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2016)04-0052-04

Comparison of determination methods of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils

PAN Kai-lin, JI Min, NIU Yue-ting, HU Ming-ming, OOI Cheng Keat

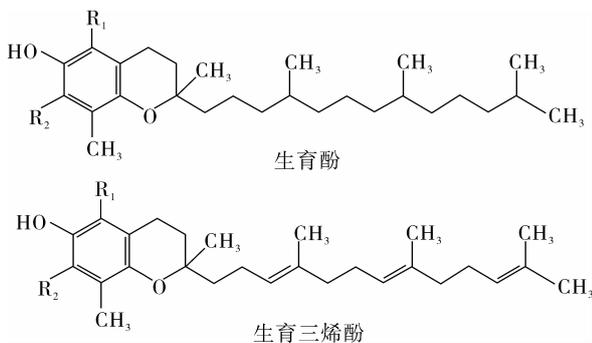
(Palm Oil Research and Technical Service Institute, Malaysian Palm Oil Board, Shanghai 201108)

Abstract: Two methods in AOCS were compared to determine tocopherols and tocotrienols in vegetable oils. The results showed that the high performance liquid chromatography – fluorescence detection (HPLC – FLD) was more sensitive than high performance liquid chromatography – ultraviolet (HPLC – UV), which has better recovery rate and accuracy, lower detection limits and higher resistance to interference of impurity. The results of determining tocopherols and tocotrienols in 12 kinds of vegetable oils by HPLC – FLD were all in the reference range of the literatures.

Key words: HPLC; vegetable oil; tocopherol; tocotrienol

生育酚(T)和生育三烯酚(T₃)统称维生素E, 根据其苯环上所含甲基位置 and 数目的不同, 可分为 α-生育酚(α-T)、β-生育酚(β-T)、γ-生育酚

(γ-T)、δ-生育酚(δ-T)和 α-生育三烯酚(α-T₃)、β-生育三烯酚(β-T₃)、γ-生育三烯酚(γ-T₃)、δ-生育三烯酚(δ-T₃), 分子结构式见图 1。



异构体种类	R ₁	R ₂
α	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
δ	H	H

图 1 维生素 E 分子结构式

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 马来西亚棕榈油总署基金(PORTSIM 033/2014)

作者简介: 潘开林, 1984 年出生, 男, 硕士。

油脂中生育酚与生育三烯酚的分析方法主要包括高效液相色谱法、气相色谱法、薄层色谱法、比色法^[1-2],其中高效液相色谱法是国标中常用的方法,如农业标准 NY/T 1598^[3]为高效液相色谱—紫外的方法测定植物油中维生素 E 含量,国标 GB/T 26635^[4]为高效液相色谱—荧光法测定油脂中生育酚与生育三烯酚的含量,AOCS Ce 8-89^[5]包含了高效液相色谱—紫外法和高效液相色谱—荧光法。为探索高效液相色谱—紫外法与高效液相色谱—荧光法测试油脂中生育酚与生育三烯酚含量的差别,本文选用了 AOCS 中的两种检测方法进行比较,通过比较高效液相色谱—紫外法(HPLC-UV)与高效液相色谱—荧光法(HPLC-FLD)的检出限、抗杂质干扰能力和回收率,得出最优方法,并用该方法测定了 12 种植物油中生育酚与生育三烯酚的含量,对比测试值与文献值的差别。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

红棕油:马来西亚 Sime Darby Plantation;24 度棕榈油、18 度棕榈油:天津聚龙嘉华投资集团有限公司提供;其他油脂均购于市场。

β -T 标准品、 γ -T 标准品、 δ -T 标准品:美国 supelco analytical 公司;混标(α -T、 α -T₃、 β -T₃、 γ -T₃、 δ -T₃):马来西亚 Sime Darby Plantation 公司;正己烷(色谱纯):美国 Honeywell 公司;异丙醇(色谱纯):上海展云化工有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪,配 Agilent G1314B 紫外检测器和 Agilent G1321A 荧光检测器:美国 Agilent 公司;KQ2200E 超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;针筒式微孔滤膜过滤器(Φ 13 mm,孔径 0.45 μ m):常州悦康医疗器材有限公司;电子天平(精度 0.1 mg):瑞士 Mettler Toledo 公司;移液枪:德国 Brand 公司。

1.3 色谱条件

色谱柱为 LiChroCART Si60(250 mm \times 4 mm, 5 μ m),配有紫外和荧光检测器,紫外检测波长为 292 nm,荧光激发波长 290 nm、发射波长 330 nm;柱温为 30 $^{\circ}$ C;流动相为正己烷与异丙醇(体积比为 99.5:0.5);流速为 0.8 mL/min;进样量为 25 μ L。外标法定量。

1.4 标准溶液的配制与工作曲线

精确称量 γ -T 标准品 4 mg、 δ -T 标准品 4 mg、混标 30 mg,移液枪移取 100 μ L β -T 标准品用正己烷溶解稀释后,分别定容至 10 mL 棕色容量瓶中,置于冰箱冷藏备用,分别取上述标准品溶液 1 mL 定容至 10、25、50、100、250 mL。以生育酚和

生育三烯酚的浓度(μ g/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并计算其回归方程。

1.5 样品处理

准确称取 1 g 植物油于 10 mL 试管中,加入 5 mL 正己烷为分散剂,超声波提取 10 min,转移至 10 mL 容量瓶中,用正己烷定容至刻度,过 0.45 μ m 的滤膜后进高效液相色谱仪分析,根据含量—峰面积标准曲线进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 生育酚与生育三烯标准曲线的回归方程

配制不同浓度的生育酚与生育三烯酚标准溶液,经 HPLC-UV 和 HPLC-FLD 分析,混合标准溶液的 HPLC-UV 色谱图见图 2,HPLC-FLD 色谱图见图 3,以峰面积 y 对质量浓度 x 作图,用 Excel 软件进行回归拟合,得到标准曲线的线性回归方程见表 1 和表 2。

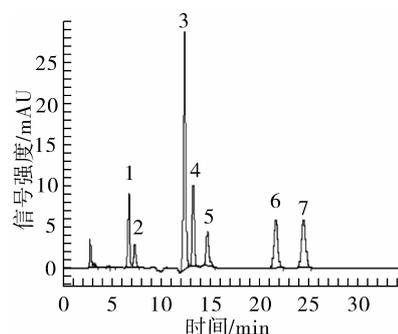


图2 混合标准溶液高效液相—紫外色谱图

注:1, α -T;2, α -T₃;3, β -T;4, β -T₃+ γ -T;5, γ -T₃;6, δ -T;7, δ -T₃。

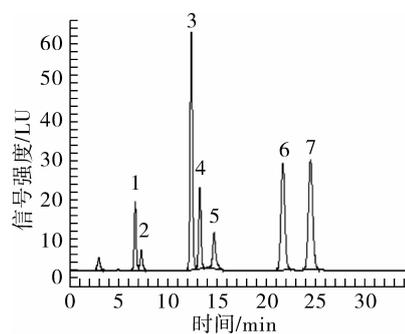


图3 混合标准溶液高效液相—荧光色谱图

注:1, α -T;2, α -T₃;3, β -T;4, β -T₃+ γ -T;5, γ -T₃;6, δ -T;7, δ -T₃。

表1 HPLC-UV 法检测生育酚与生育三烯酚的线性方程、相关系数和检出限

标准品	回归方程	R ²	检出限/(μ g/g)
α -T	$y = 12.81x - 3.31$	0.999 8	0.068
α -T ₃	$y = 13.37x - 7.73$	0.999 8	0.054
β -T	$y = 21.53x - 1.27$	0.999 6	0.781
γ -T + β -T ₃	$y = 24.3x - 4.77$	0.999 8	0.019
γ -T ₃	$y = 15.49x - 7.25$	0.999 7	0.044
δ -T	$y = 16.33x - 4.57$	0.999 8	0.096
δ -T ₃	$y = 13.34x - 5.72$	0.999 7	0.136

表2 HPLC-FLD法检测生育酚与生育三烯酚的线性方程、相关系数和检出限

标准品	回归方程	R ²	检出限/(μg/g)
α-T	y=28.65x-19.24	0.999 8	0.025
α-T ₃	y=24.74x-8.42	0.999 8	0.014
β-T	y=48.36x-12.63	0.999 7	0.005
γ-T+β-T ₃	y=57.49x-20.51	0.999 8	0.004
γ-T ₃	y=36.21x-20.94	0.999 6	0.007
δ-T	y=78.74x-23.84	0.999 8	0.006
δ-T ₃	y=65.63x-26.83	0.999 8	0.008

检出限是反映样品中检出待测物质的最小浓度或最小量,是衡量方法灵敏度的重要指标,对比HPLC-FLD法与HPLC-UV法的检出限可以看出,HPLC-FLD法具有更低的检出限,因此HPLC-FLD法具有更好的灵敏度,适用于低浓度生育酚与生育三烯酚的检测。

2.2 方法准确性比较

为考察方法的准确性,分别用HPLC-UV法和HPLC-FLD法测定茶油、玉米油、红棕油中的生育酚与生育三烯酚,对比观察色谱图杂质峰的多少与大小,并做加标回收率比较,同一水平下测试5次,计算变异系数。

茶油、玉米油和红棕油的HPLC-UV色谱图与HPLC-FLD色谱图见图4~图9,回收率和变异系数分别见表3和表4。

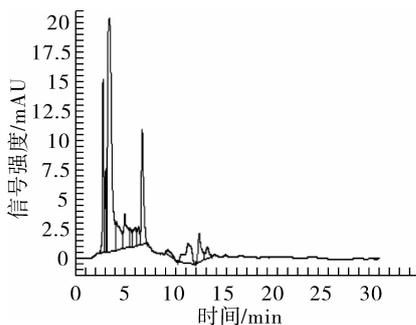


图4 紫外法测定茶油中生育酚与生育三烯酚色谱图

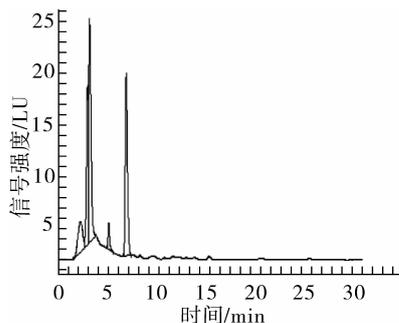


图5 荧光法测定茶油中生育酚与生育三烯酚色谱图

对比HPLC-UV与HPLC-FLD色谱图发现:紫外检测器受杂质影响较大,会出现较多的杂峰,而荧光检测器受杂质影响较小,不会出现较乱的杂峰。

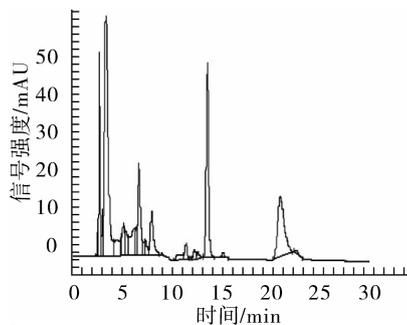


图6 紫外法测定玉米油中生育酚与生育三烯酚色谱图

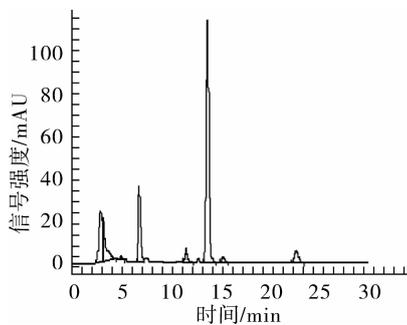


图7 荧光法测定玉米油中生育酚与生育三烯酚色谱图

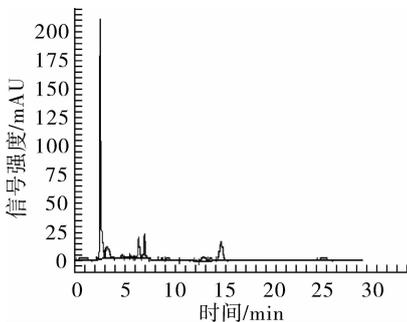


图8 紫外法测定红棕油中生育酚与生育三烯酚色谱图

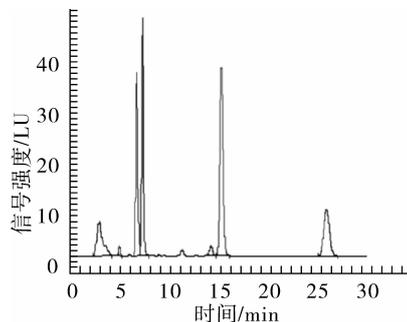


图9 荧光法测定红棕油中生育酚与生育三烯酚色谱图

因此,与HPLC-UV法相比,HPLC-FLD法具有更强的抗干扰能力。

加标回收率是常用的确定方法准确度的质控手段之一,通过表3和表4比较HPLC-UV法与HPLC-FLD法的加标回收率,可以看出HPLC-FLD法的回收率范围在77.1%~109.6%,而HPLC-UV法的回收率范围较大,其中茶油中α-T的回收率达到170.6%,玉米油中γ-T+β-T₃的回收率只有24.6%;红棕油中γ-T₃的回收率只有37.9%。经5次重复性测试,计算变异系数RSD,其结果均小于

6.0%,表明两种测试方法重现性较好。因此通过回收率比较可以得出:使用 HPLC - UV 法测定生育酚与生育三烯酚时,测试值与实际含量相差较大,而 HPLC - FLD 法的回收率在合理范围之内,可以精确地测定植物油中的生育酚和生育三烯酚含量。

表3 HPLC - UV 法测定茶油、玉米油、红棕油中生育酚与生育三烯酚的回收率和变异系数(RSD) %

V _E 种类	茶油		玉米油		红棕油	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
α - T	170.6	4.2	42.5	5.5	111.3	3.5
α - T ₃	222.9	4.5	98.9	4.4	145.2	5.6
β - T	81.3	3.5	76.4	2.9	97.7	3.5
γ - T + β - T ₃	80.4	3.5	24.6	4.6	71.8	2.7
γ - T ₃	91.6	3.6	80.8	4.9	37.9	4.9
δ - T	109.6	3.3	152.5	4.8	98.7	4.7
δ - T ₃	103.0	3.5	88.8	2.9	103.9	4.5

表4 HPLC - FLD 法测定茶油、玉米油、红棕油中生育酚与生育三烯酚的回收率和变异系数(RSD) %

V _E 种类	茶油		玉米油		红棕油	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
α - T	107.0	2.6	95.2	4.2	100.7	3.8
α - T ₃	104.5	3.2	109.6	3.5	78.2	5.8
β - T	98.0	2.9	99.9	2.4	108.1	3.8
γ - T + β - T ₃	101.1	3.9	82.5	5.4	100.6	2.6
γ - T ₃	91.9	3.8	93.6	4.4	77.1	4.4
δ - T	99.1	4.5	100.5	5.2	97.6	4.6
δ - T ₃	98.9	3.3	100.3	3.5	97.9	3.1

2.3 不同植物油中生育酚与生育三烯酚含量测定

根据上述实验结果,采用 HPLC - FLD 法测定 12 种植物油中生育酚与生育三烯酚的含量,测试结果见表 5。

表5 12种植物油中生育酚与生育三烯酚的含量 mg/kg

油种	α - T	β - T	γ - T + β - T ₃	δ - T	α - T ₃	γ - T ₃	δ - T ₃	总计	文献值 ^[6-17]
红棕油	183.21	nd	nd	nd	263.35	265.28	59.20	771.04	256 ~ 1 100
24 度棕榈油	175.85	nd	nd	nd	218.26	236.04	46.32	676.47	256 ~ 1 100
18 度棕榈油	165.34	nd	nd	nd	169.47	259.63	35.41	629.85	256 ~ 1 100
玉米油	202.08	nd	371.35	20.02	nd	15.07	nd	608.52	510 ~ 886
大豆油	103.15	6.00	333.27	126.74	nd	nd	nd	569.16	227 ~ 1 100
花生油	295.22	nd	110.08	9.02	nd	nd	nd	414.32	165 ~ 421
芝麻油	35.34	nd	294.16	nd	nd	nd	nd	329.5	260 ~ 516
菜籽油	117.07	nd	181.65	6.68	nd	nd	nd	305.4	151 ~ 572
南瓜子油	23.36	nd	241.23	13.26	nd	nd	nd	277.85	40 ~ 710
胡麻油	nd	nd	270.24	7.47	nd	nd	nd	277.1	210 ~ 377
橄榄油	155.44	nd	6.00	nd	nd	nd	nd	161.44	151 ~ 220
茶油	100.08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100.08	90 ~ 205

注:nd 指未检出。

不同油种中生育酚与生育三烯酚的含量与排序如表 5 所示,红棕油中生育酚与生育三烯酚总含量最高,为 771.04 mg/kg,同时生育三烯酚的含量也最高,为 587.83 mg/kg,其次是 24 度棕榈油和 18 度棕榈油,茶油中生育酚与生育三烯酚的含量最低,仅为 100.08 mg/kg,测试结果均在参考文献值^[6-17]范围之内。

3 结论

通过比较高效液相色谱-荧光法与高效液相色谱-紫外法测定生育酚与生育三烯酚,发现高效液相色谱-荧光法具有更好的回收率和准确性,更低的检出限和良好的抗杂质干扰能力。采用高效液相色谱-荧光法测定 12 种植物油中生育酚与生育三烯酚的含量,其结果在文献值参考范围之内。

参考文献:

[1] 王胜南,代志凯,赵健,等. 棕榈油脱臭馏出物中生育酚及生育三烯酚的测定[J]. 中国食品添加剂,2014(4):144-149.
 [2] 楼建华,吴彩娟,杨亦文,等. 棕榈油中生育酚和生育三烯酚的 HPLC 测定[J]. 食品工业科技,2006,27(7):176-179.
 [3] NY/T 1598-2008. 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[S].
 [4] 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[S].

[5] AOCS Ce 8-89. Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Vegetable Oils and Fats by HPLC[S].
 [6] 彭光华,王辉,张春雨,等. 高效液相色谱法测定菜籽油中维生素 E 含量[J]. 中国粮油学报,2008,23(4):211-214.
 [7] 章海风,周晓燕,李辉,等. 3 种食用油在油条煎炸过程中的品质变化比较[J]. 食品科学,2013,34(22):160-164.
 [8] 王瑞英,汤静,张丽静,等. 高效液相色谱法测定各植物油中维生素 E 含量[J]. 新疆大学学报,2003,20(4):393-395.
 [9] 李桂华,郭良玉,付黎敏. 高效液相色谱法测定精炼程度不同的植物油中各种生育酚的含量[J]. 郑州粮食学院学报,1994,15(2):34-39.
 [10] 李奈,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.
 [11] 聂明,杨水平,姚小华,等. 不同加工方式对油茶籽油理化性质及营养成分的影响[J]. 林业科学研究,2010,23(2):165-167.
 [12] 王洁,张宁,王淑静,等. 高效液相色谱法测定宁夏 11 种食用植物油中的维生素 E[J]. 宁夏医学院学报,2000,22(1):11-12.
 [13] 杨金娥,黄庆德,郑畅,等. 烤籽温度对压榨亚麻籽油品质的影响[J]. 中国油脂,2011,36(6):28-31.
 [14] 吴晓磊,潘勤. 南瓜籽油的化学成分与药理作用[J]. 现代药物与临床,2009,24(6):336-338.
 [15] 李星,姜丽娟,刘会娟,等. 南瓜籽油的营养功能与制取方法[J]. 农业机械,2013(3):42-44.
 [16] 杨波涛,陈凤香,莫文莲,等. 我国食用植物油维生素 E 含量研究[J]. 粮油加工,2009(9):52-55.
 [17] 杨青坪,梁少华,杨瑞楠. 不同熔点棕榈油组成的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2015,36(1):27-31.