



中华人民共和国国家标准

GB/T 46855—2025/ISO 29841:2009

植物油脂 叶绿素 a 和叶绿素 a' 降解产物的测定(脱镁叶绿素 a, a' 和焦脱镁叶绿素)

Vegetable fats and oils—Determination of the degradation products of chlorophylls a and a' (pheophytins a, a' and pyropheophytins)

(ISO 29841:2009, IDT)

2025-12-31 发布

2026-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件等同采用 ISO 29841:2009《植物油脂 叶绿素 a 和叶绿素 a' 降解产物的测定(脱镁叶绿素 a, a' 和焦脱镁叶绿素)》。

本文件做了下列最小限度的编辑性改动：

——纳入了 ISO 29841:2009/Amd 1:2016 的修正内容,所涉及的条款的外侧页边空白位置用垂直双线(∥)进行了标示。

请注意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专利的责任。

本文件由国家粮食和物资储备局提出。

本文件由全国粮油标准化技术委员会(SAC/TC 270)归口。

本文件起草单位：国家粮食和物资储备局标准质量中心、国家粮食和物资储备局科学研究院、新疆维吾尔自治区粮油产品质量监督检验站、阿克苏地区食品安全检测中心、山东省粮油检测中心、安徽省粮油产品质量监督检测站、湖北省粮油食品质量监督检测中心、北京工商大学。

本文件主要起草人：祁潇哲、李秀娟、张艳、刘君丽、许瑛、韩煜晖、杨琳琳、秦时聪、段章群、李丽、王雪艳、薛雅琳、陈贝、刘慧琳、郭明璋、陈园、侯艳冰。

植物油脂 叶绿素 a 和叶绿素 a' 降解产物的测定(脱镁叶绿素 a, a' 和焦脱镁叶绿素)

1 范围

本文件描述了叶绿素降解产物脱镁叶绿素 a, a' 和焦脱镁叶绿素 a 的测定方法。
本文件适用于植物油脂。

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本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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。

ISO 661 动植物油脂 试样的制备(Animal and vegetable fats and oils—Preparation of test sample)

注: GB/T 15687—2008 动植物油脂 试样的制备(ISO 661:2003, IDT)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

焦脱镁叶绿素 a(叶绿素降解产物中的含量) pyropheophytin a (content in chlorophyll degradation products)

焦脱镁叶绿素 a 的质量除以叶绿素 a, a' 和焦脱镁叶绿素 a 的质量之和。

4 原理

利用微型硅胶柱层析法,将色素(叶绿素、脱镁叶绿素 a 和 a'、焦脱镁叶绿素 a)与大部分脂质(甘油三酯)分离。利用 RP18-HPLC 分析洗脱液,分离后的组分在 410 nm 波长下通过紫外检测器进行监测。

某些植物油(如菜籽油)的分析需要更高的灵敏度,可使用荧光检测器,激发波长为 430 nm,发射波长为 670 nm。

也可以使用附录 C 中描述的配备荧光检测器的高效液相色谱(HPLC)直接测定。

5 试剂

警告——请注意有关危险物质处理的具体规定。应遵循技术、组织和个人安全措施。

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。

5.1 叶绿素 a。

注: 由于缺少脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素标准物质,所以用叶绿素 a 来生产这些降解产物。脱镁叶绿素是通过叶绿素溶液酸化获得的;焦脱镁叶绿素需要额外加热(>100 °C)^[4]。

- 5.2 丙酮。
- 5.3 甲醇。
- 5.4 乙醚。
- 5.5 石油醚,沸程 40 °C~60 °C。
- 5.6 正庚烷或正己烷。

警告:考虑到毒性,如果有正庚烷,应避免使用正己烷。

- 5.7 石油醚-乙醚混合溶剂,体积分数: $\varphi_{\text{石油醚}}=90\text{ mL}/100\text{ mL}$; $\varphi_{\text{乙醚}}=10\text{ mL}/100\text{ mL}$ 。

6 仪器设备

常规的实验室仪器以及以下所述仪器设备。

6.1 高效液相色谱仪。

6.1.1 高效液相系统,由泵、进样装置(20 μL 定量环)或自动进样器、410 nm 处测量的紫外检测器或荧光检测器(激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=430\text{ nm}$,发射波长 $\lambda_{\text{em}}=670\text{ nm}$),以及积分系统组成。

6.1.2 高效液相色谱柱,长度 250 mm,内径 4.0 mm 或 4.6 mm,填充反相 C_{18} 颗粒,粒径 5 μm 。

以下条件被认为是合适的:

——固定相:ODS 硅胶微粒 3.5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm¹⁾;

——流动相:水、甲醇、丙酮(6.1.3);

——流速:1.0 mL/min。

6.1.3 流动相,水、甲醇、丙酮混合物,体积分数: $\varphi_{\text{水}}=4\text{ mL}/100\text{ mL}$; $\varphi_{\text{甲醇}}=36\text{ mL}/100\text{ mL}$; $\varphi_{\text{丙酮}}=60\text{ mL}/100\text{ mL}$,所有溶剂均应为色谱级。

6.2 锥形烧瓶,容量 25 mL 或 50 mL。

6.3 烧杯,不同容量规格。

6.4 旋转蒸发仪,带水浴。

6.5 自动进样瓶,合适的容量。

6.6 硅胶柱,500 mg/6 mL 或 1 000 mg/6 mL, 55 μm , 7 nm 或二醇基柱,3 mL。

注:自制硅胶柱也可用于分离。为此,使用硅胶 60(0.063 mm~0.100 mm)用于柱层析,调整至水分含量为 5%(质量分数)。于(160 $\pm$ 5)°C 加热过夜以活化硅胶。加热后,将硅胶放入干燥器中冷却,然后将硅胶转移到具塞烧瓶中。加入 5% 的水,摇匀,直到没有结块且粉末自由流动(若使用自动振荡器需 1 h)。活化后的硅胶静置过夜以备用²⁾。

7 样品

7.1 扦样

扦样不是本文件所规定的内容,推荐采用 ISO 5555。

实验室收到的样品应具有真实的代表性,且在运输和储藏过程中未受损坏或改变。

- 1) 例如,市售的 C_{18} 反相色谱柱可具备以下特性:碳载量质量分数为 10.5%,封头使硅烷醇失活,以减少对离子抑制试剂或离子配对剂的需求。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,可以使用等效产品。
- 2) Strata Si-1 (硅胶柱)和 Supelclean LC-Diol SPE Tubes-Supelco 57016 (二醇基柱)是市售产品。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,可以使用等效产品。

7.2 试样制备

按 ISO 661 的规定准备测试样品。

重要事项——试验样品应保存在玻璃容器中,避光冷藏。净化后,应立即对测试溶液进行分析,以防止降解和氧化。避免测试样品与塑料接触。

8 试验步骤

8.1 称约 300 mg 的测试样品(7.2)倒入小烧杯(6.3)中,用 1 mL 正庚烷或正己烷(5.6)溶解,将溶液倒入硅胶柱(6.6)上。用 1 mL 石油醚(5.5)冲洗烧杯两次,将这些洗涤液也加入硅胶柱。

8.2 待溶剂完全浸入硅胶柱填料时,立即用石油醚-乙醚混合溶剂(5.7)洗脱非极性物质,每次 5 mL,共洗脱 2 次。

8.3 用 5 mL 丙酮(5.2)洗脱脱镁叶绿素两次,收集至锥形烧瓶(6.2),避光保存。

8.4 用旋转蒸发仪(6.4)在最高 20 °C 下将溶剂蒸发至干燥。将残渣溶解于 200 μL 丙酮。立即将此溶液在高效液相色谱仪(6.1)上机检测。

重要事项——脱镁叶绿素在光照下非常不稳定,而且容易氧化。

8.5 在 6.1.2 所列的柱条件下运行的典型色谱图如图 A.1 和图 A.2。

9 测定结果

9.1 峰的鉴定

测定的色谱图可以显示叶绿素 a、叶绿素 b、相应的脱镁叶绿素和焦脱镁叶绿素的峰。宜参考附录 A 中图 A.1 和图 A.2 的典型色谱图,其他色素由于不稳定性而不能作为参考物质。鉴定脱镁叶绿素 a、脱镁叶绿素 a' 和焦脱镁叶绿素 a,见图 A.1 和图 A.2。

9.2 相对焦脱镁叶绿素 a 含量的计算

使用峰面积来计算分析物在样品溶液中的相对比例。基于该方法的目的,假设所有色素的响应因子是相等的。焦脱镁叶绿素 a 含量(w_{PPPa})以质量分数的百分比计,根据峰面积比计算,如下:

$$w_{PPPa} = \frac{A_{PPPa} \times 100}{A_{PPPa} + \sum A_{PP}}$$

式中:

A_{PPPa} ——焦脱镁叶绿素 a 的峰面积;

$\sum A_{PP}$ ——脱镁叶绿素 a 和 a' 的峰面积之和。

结果保留到小数点后一位。

10 精密度

10.1 实验室间测试

附录 B 为该标准实验室间测试数据的汇总。所得的数值可能不适用于其他浓度范围和测试物质。

10.2 重复性

在同一实验室,由同一操作人员使用相同设备,按相同的测试方法,在短时间内对相同的试验样品

进行试验,两次独立试验结果的绝对差值大于表 B.1 中给出的重复性限 r 的情况不超过 5%。

10.3 再现性

在不同实验室,由不同操作者使用不同设备,按相同的测试方法,对相同的试样样品进行试验,两次试验结果的绝对差值大于表 B.1 中给出的再现性限 R 的情况不超过 5%。

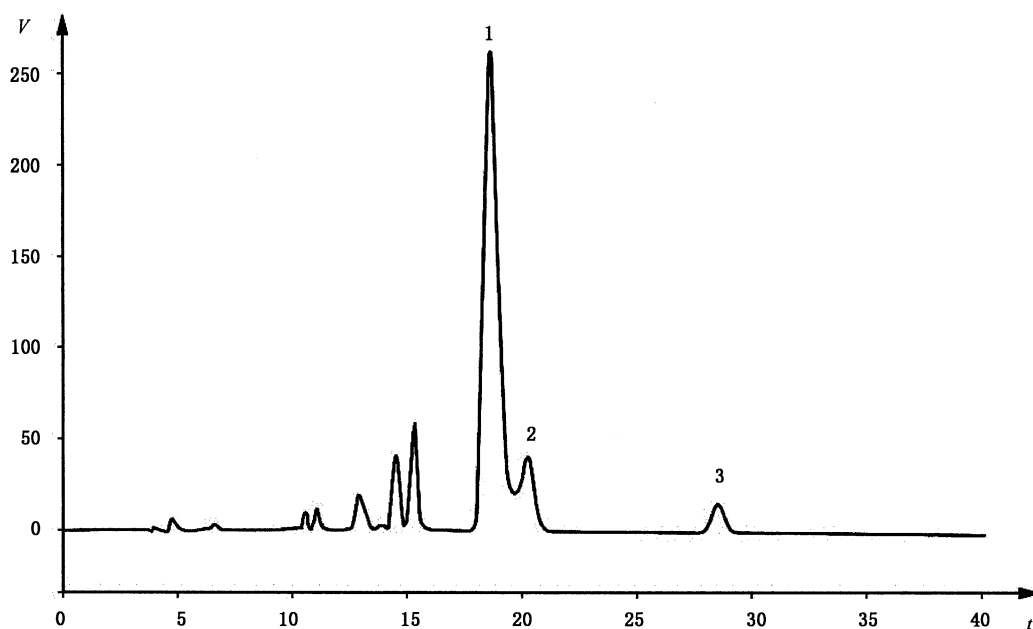
11 测试报告

测试报告应包括:

- a) 完全识别样品所需的所有信息;
- b) 使用的扦样方法(如已知);
- c) 参照本文件使用的测试方法;
- d) 所有在本文件中未规定或视为可选的操作细节,以及所有可能影响测试结果的操作细节;
- e) 测定结果;
- f) 如果进行了重复性试验,说明最终结果。

附录 A
(资料性)
典型色谱图示例

典型色谱图示例见图 A.1 和图 A.2。



标引序号说明：

1 —— 脱镁叶绿素 a；

2 —— 脱镁叶绿素 a'；

3 —— 焦脱镁叶绿素；

t —— 洗脱时间, min；

V —— 电压, V。

图 A.1 叶绿素降解产物中焦脱镁叶绿素含量为 5% 的特级初榨橄榄油的 HPLC 色谱图

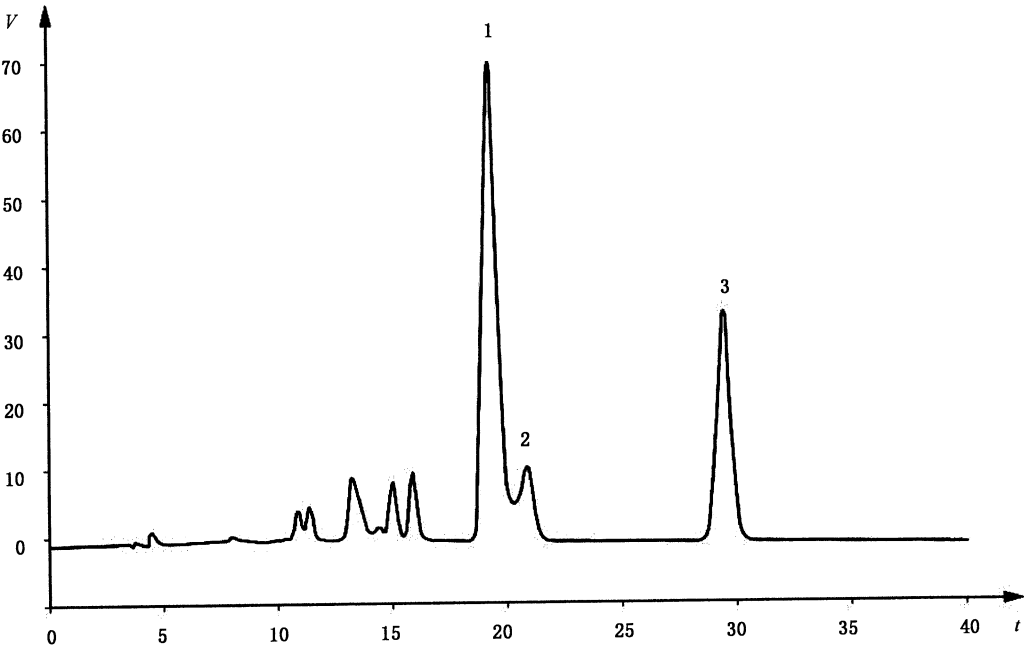


图 A.2 叶绿素降解产物中焦脱镁叶绿素含量为 30% 的特级初榨橄榄油的 HPLC 色谱图

附录 B
(资料性)
实验室间测试

该方法的精密度来源于油脂、脂肪产品、相关产品和原材料分析联合委员会(DIN/DGF)组织的实验室间测试结果,来自法国、德国和意大利的 16 个实验室参与了该测试。2005 年对 5 个样品进行了测试,精密度数据按照 ISO 5725-1 和 ISO 5725-2 要求计算,结果见表 B.1。

表 B.1 橄榄油的统计结果

样品	A	B	C	D	E
参与测试的实验室数量 N	16	16	16	16	16
消除异常值后保留的实验室数量 n	12	12	14	15	15
所有实验室对每个样品独立测试的数量 $\sum_{i=1}^n n_{w,i}$	24	24	28	30	30
平均值 $\overline{w}_{\text{PPA}}/\%$	28.86	34.01	5.63	6.26	84.75
重复性标准偏差 $s_r/\%$	0.53	0.61	0.59	0.36	1.09
重复性变异系数 $CV(r)/\%$	1.8	1.8	10.4	5.8	1.3
重复性限 $r(s_r \times 2.8)/\%$	1.48	1.71	1.65	1.01	3.05
再现性标准偏差 $s_R/\%$	1.78	2.08	0.79	1.29	3.06
再现性变异系数 $CV(R)/\%$	6.2	6.1	14.1	20.7	3.6
再现性限 $R(s_R \times 2.8)/\%$	4.98	5.82	2.21	3.61	8.56

附 录 C

(资料性)

配备荧光检测器的高效液相色谱(HPLC)直接测定法

C.1 原理

本附录描述了另一种方法。油不经任何前处理,直接用高效液相色谱分析。

C.2 高效液相色谱溶剂

C.2.1 水,色谱级。

C.2.2 甲醇,色谱级。

C.2.3 丙酮,色谱级。

C.3 仪器

C.3.1 二元高效液相色谱系统:由泵、进样装置(每环 20 μL)或自动进样器、荧光检测器($\lambda_{\text{ex}}=430\text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{em}}=670\text{ nm}$)和积分系统组成。

C.3.2 色谱柱:长 250 mm,内径 4.0 mm 或 4.6 mm,填充反相 C_{18} 颗粒,粒径 5 μm 。

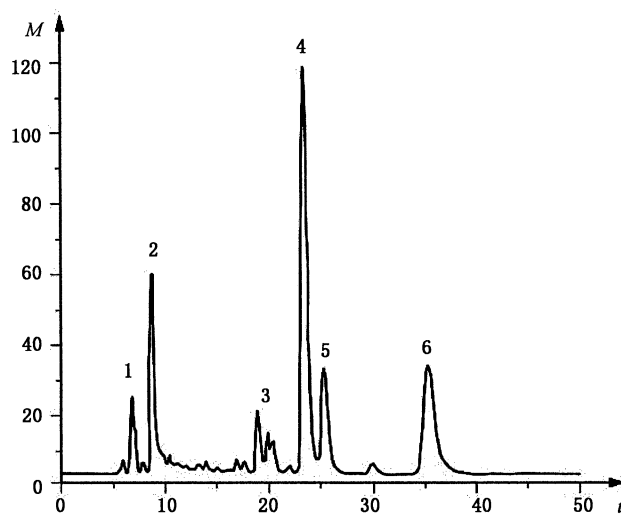
C.4 试验步骤

C.4.1 将油加入棕色液相进样瓶中。

C.4.2 将测试样品放入高效液相色谱仪(C.3)。按照表 C.1 设置条件,典型色谱图见图 C.1。

表 C.1 1.0 mL/min 洗脱方案

时间/min	溶剂 A 体积比(水:甲醇:丙酮=4:76:20)	溶剂 B 体积比(水:甲醇:丙酮=4:36:60)
0	100%	0%
7	0%	100%
50	0%	100%
50.1	100%	0%
60	100%	0%



标引序号说明：

- 1 —— 脱镁叶绿酸盐；
- 2 —— 脱镁叶绿酸甲酯；
- 3 —— 脱镁叶绿素 b；
- 4 —— 脱镁叶绿素 a；
- 5 —— 脱镁叶绿素 a'；
- 6 —— 焦脱镁叶绿素；

M ——荧光检测器响应值, lx；

t —— 洗脱时间, min。

图 C.1 菜籽油中焦脱镁叶绿素的高效液相色谱图

参 考 文 献

- [1] ISO 5555 Animal and vegetable fats and oils—Sampling
 - [2] ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—
Part 1: General principles and definitions
 - [3] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—
Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measure-
ment method
 - [4] AITZETMÜLLER, K. Chlorophyll-Abbauprodukte in pflanzlichen Ölen [Chlorophyll deg-
radation products in vegetable oils]. Fat Sci. Technol. 1989, 91, pp. 99-105; AITZETMÜLLER,
K. Analysis of chlorophyll degradation products in fats and oilseeds. In: Actes du congrès
international «Chevreul» pour l'étude des corps gras [Proceedings of the Chevreul International Con-
gress], Angers, 1989-06-06/10, p. 177-84. Association française pour l'Étude des Corps gras,
Neuilly sur Seine.
-