



中华人民共和国国家标准

GB/T 24894—2010/ISO 6800:1997

动植物油脂 甘三酯分子 2-位脂肪酸组分的测定

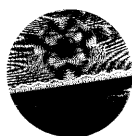
Animal and vegetable fats and oils—
Determination of the composition of fatty acids in the
2-position of the triglyceride molecules

(ISO 6800:1997, IDT)

2010-06-30 发布

2011-01-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布



前 言

本标准等同采用国际标准 ISO 6800:1997《动植物油脂 甘三酯分子 2-位脂肪酸组分的测定》(英文版)。

本标准的内容和结构与 ISO 6800:1997 一致,作了如下编辑性修改:

——“本国际标准”一词改为“本标准”;

——用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”;

——删除国际标准的前言;

——在“规范性引用文件中”,用 GB/T 5530《动植物油脂 酸值和酸度测定》代替 ISO 660:1996 Animal and vegetable fats and oils—Determination of acid value and of acidity;用 GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》代替 ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use—Specification and test methods;用 GB/T 15687《动植物油脂 试样的制备》代替 ISO 661:1989 Animal and vegetable fats and oils—Preparation of test sample;用 GB/T 17376《动植物油脂 脂肪酸甲酯制备》代替 ISO 5509:1978 Animal and vegetable fats and oils—Preparation of methyl esters of fatty acids;用 GB/T 17377《动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析》代替 ISO 5508:1990 Animal and vegetable fats and oils—Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids。

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:国家粮食局科学研究院。

本标准主要起草人:栾霞、王瑛瑶、张蕊、薛雅琳。

动植物油脂 甘三酯分子 2-位脂肪酸组分的测定

1 范围

本标准规定了动植物油脂中甘三酯分子 2-位脂肪酸(β 或内位)组分的测定。

由于胰脂酶的活性,本方法只适用于熔点 45 °C 以下的油脂。

本方法不适用于含有下列组分的油脂:

- 含有十二或更少碳原子的脂肪酸(如:椰子油、棕榈仁油、黄油);
- 含有二十碳或更多碳原子的高度不饱和脂肪酸(多于四个双键)(如:鱼油和海生动物油);
- 含有氧化次基团的脂肪酸。

注:双键位置在 n-6 至 n-11 的脂肪酸(如:岩芹酸)被胰脂酶酶解速度非常慢,可能引起错误结果。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 5530 动植物油脂 酸值和酸度测定(GB/T 5530—2005,ISO 660:1996,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

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

GB/T 17376 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备(GB/T 17376—2008,ISO 5509:2000,IDT)

GB/T 17377 动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析(GB/T 17377—2008,ISO 5508:1990, IDT)

3 原理

试样中游离脂肪酸中和后,经柱层析净化,用酶将甘三酯水解成 2-单甘酯,经薄层层析(TLC)分离,用气相色谱测定脂肪酸组分含量。

4 试剂

所有试剂均为分析级,水为符合 GB/T 6682 要求的二级水。

4.1 用于试样净化的试剂

4.1.1 2-丙醇或乙醇:95%(体积分数)。

4.1.2 正己烷或石油醚:沸程范围 30 °C~60 °C。

4.1.3 2-丙醇:50%(体积分数)或乙醇:50%(体积分数)。

4.1.4 氢氧化钠溶液:0.5 mol/L。

4.1.5 酚酞溶液:1 g 酚酞溶于 100 mL95%(体积分数)乙醇中。

4.1.6 活化的中性氧化铝:用于柱层析。最近在 260 °C 温度活化 2 h 的中性氧化铝,达到活性 I 级,保存在干燥器中。

4.1.7 氮气。

4.2 用于甘三酯水解的试剂

4.2.1 乙醚:不含过氧化物。

4.2.2 盐酸:6 mol/L。

4.2.3 胆酸钠溶液:1 g/L。

4.2.4 钙溶液:220 g/L(生化试剂)。

4.2.5 缓冲溶液:1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(别名:三羟甲基甲胺、2-氨基-2-丙基-1,3-二醇)溶液。用盐酸(4.2.2)调节至 pH8(用 pH 计测量)。溶液在 0℃~4℃ 条件下贮存,保存期 14 天。

4.2.6 胰脂酶:活性 8 单位/mg~20 单位/mg。储存在干燥的冰箱里。使用前取出所需粉状品,使其温度达到室温。

注:可使用有良好活性的市售脂肪酶,也可按附录 A 步骤制备脂肪酶,并检测脂肪酶活性。

4.3 用于分离 2-单甘酯的试剂

4.3.1 乙醇:95%(体积分数)。

4.3.2 正己烷或石油醚:沸程范围 30℃~60℃。

4.3.3 丙酮。

4.3.4 硅胶:含有粘合剂,用于薄层层析。

4.3.5 展开剂:正己烷或石油醚+乙醚+98%甲酸=70+30+1。

4.3.6 显示剂:2',7'-二氯荧光黄乙醇溶液(2',7'-Dichlorofluorescein):2 g/L。100 mL 溶液加 1 滴 1 mol/L 氢氧化钠溶液使呈微碱性。

4.4 用于气相色谱分析 2-单甘酯的试剂

参见 GB/T 17376 和 GB/T 17377。

5 仪器

实验室常用仪器设备,特别是下列仪器设备:

5.1 用于净化样品的仪器

5.1.1 水浴锅:在 30℃~40℃ 之间能恒温控制。

5.1.2 层析柱:用于层析分离,内径 13 mm、长 400 mm 的玻璃管,配有烧结玻璃过滤板和活塞开关。

5.1.3 旋转蒸发器:配有 250 mL 圆底烧瓶。

5.1.4 氮吹仪:提供氮气流。

5.1.5 分液漏斗:500 mL。

5.1.6 圆底烧瓶:100 mL。

5.2 用于甘三酯水解的仪器

5.2.1 离心机。

5.2.2 玻璃离心管:10 mL,带有磨口玻璃塞。

5.2.3 电动振荡器:能使离心管激烈摇动。

5.2.4 水浴锅:可恒温控制,温度保持在 40℃±0.5℃。

5.2.5 注射器:1 mL,配有细针头。

5.2.6 秒表。

5.3 用于分离 2-单甘酯的仪器

5.3.1 展开槽:用于薄层层析,带有磨砂玻璃盖,适合于 200 mm×200 mm 玻璃板。

5.3.2 涂布器:用于制备薄层层析板。

5.3.3 玻璃板:200 mm×200 mm。

5.3.4 微量注射器:3 μL/滴~4 μL/滴。

5.3.5 喷雾器:用于薄层层析板喷射显示剂。

5.3.6 微型刮铲:用于刮下薄层层析板上单甘酯谱带。

5.3.7 烘箱:保持温度 103℃±2℃。

- 5.3.8 紫外光灯:检测薄层板上的谱带,波长 254 nm。
- 5.3.9 圆底烧瓶:25 mL,配有磨口接头的 1 m 长空气冷凝器。
- 5.3.10 锥形瓶:250 mL,带有磨口玻璃塞。
- 5.3.11 锥形瓶:50 mL。
- 5.3.12 玻璃过滤器:烧结玻璃的孔隙为 16 μm ~40 μm 。
- 5.3.13 干燥器:内有有效的干燥剂。

5.4 用于气相色谱法分析 2-单甘酯的仪器

参见 GB/T 17376 和 GB/T 17377。

6 取样

十分重要的是实验室收到的样品必须有真实代表性,并在运输和贮存期间不得有损坏和变化。扦样不是本标准规定的内容,推荐采用 GB/T 5524 规定的方法扦样。

7 试样制备

按 GB/T 15687 规定的步骤制备试样。

8 分析步骤

注:如果要检查测试结果是否满足重复性要求(见 10.2),可按分析步骤 8.1~8.6 进行两个单独测定。

8.1 试样酸值的测定

试样酸值按 GB/T 5530 测定。如果酸值低于 3%(质量分数),可按 8.3 直接通过氧化铝层析柱净化试样;如果酸值高于 3%(质量分数),先按 8.2 在有溶剂存在的情况下用氢氧化钠中和,然后按 8.3 氧化铝层析柱净化试样。

8.2 氢氧化钠中和

将约 10 g 的油样溶解于 100 mL 正己烷或石油醚(4.1.2)中,转入分液漏斗(5.1.5)。加 50 mL 2-丙醇或乙醇(4.1.1),几滴酚酞溶液(4.1.5),加入中和油样游离脂肪酸所需的氢氧化钠溶液(4.1.4)并超量 0.5%。用力振摇 1 min,加 50 mL 蒸馏水再振摇,然后静置。分层后,弃去下层皂液和中间层(粘液和不溶于水的物质)。逐次用 25 mL~30 mL 的 2-丙醇或乙醇溶液(4.1.3)清洗中和油脂的正己烷或石油醚,直至酚酞的粉红色消失为止。

将溶液转移到旋转蒸发器(5.1.3)的底瓶中,在减压条件下去除大部分正己烷或石油醚。减压并通入氮气流(4.1.7)、在 30 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,干燥油脂,直到溶剂完全除去为止。

8.3 氧化铝层析柱净化试样

15 g 已活化的氧化铝(4.1.6)与 50 mL 正己烷或石油醚(4.1.2)制备成悬浮液,边振动边倒入层析柱(5.1.2)中,确保氧化铝均匀沉降。当溶剂液面下降到吸附剂以上 1 mm~2 mm 时,把用 25 mL 正己烷或石油醚(4.1.2)溶解的 5 g 油脂溶液,小心地倒入层析柱里,用 100 mL 圆底烧瓶(5.1.6)收集从层析柱流出的洗涤液。

减压蒸馏去除大部分溶剂,充入氮气流(4.1.7),在 30 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 温度下干燥油脂,直到溶剂完全除去为止。

8.4 水解甘三酯

8.4.1 称取约 0.1 g 净化的试样(8.3)置于 10 mL 离心管(5.2.2)中。如果室温下试样不是液体,将离心管置于 60 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅内,如果试样还不完全液化,继续浸在水浴中,但不超过 10 s。从水浴锅中取出离心管,迅速进行 8.4.2 到 8.4.5 步骤操作。

8.4.2 向已液化的试样加入已预先称重的约 20 mg 脂肪酶(4.2.6)和 2 mL 缓冲溶液(4.2.5)。小心摇动,然后加入 0.5 mL 的胆酸钠溶液(4.2.3)和 0.2 mL 氯化钙溶液(4.2.4),盖上塞子小心摇动。这

些操作步骤应在 30 s 内完成,立即将管子放入 40 °C 水浴锅内,保持手摇 60 ± 2 s。

8.4.3 从水浴锅中取出离心管,在 40 °C 下,用振荡器(5.2.3)剧烈摇动 120 ± 2 s。

8.4.4 立即加入 1 mL 盐酸(4.2.2)和 1 mL 乙醚(4.2.1)。盖上塞子,并用振荡器(5.2.3)剧烈振摇。

8.4.5 离心分离,用注射器(5.2.5)将有机相转移到试管里。如果在环境温度下试样是固态,再用 1 mL 乙醚浸取,提取物合并到试管中。

8.5 分离 2-单甘酯

8.5.1 薄层板的制备

用乙醇(4.3.1)、正己烷或石油醚(4.3.2)和丙酮(4.3.3)小心清洗玻璃板(5.3.3),直到脂肪类物质彻底清除。称 30 g 硅胶(4.3.4)装入 250 mL 锥形瓶(5.3.10)中,加入 60 mL 水。盖上塞子,激烈摇动 1 min,立即将浆液倒入涂布器(5.3.2)上,在干净的玻板上涂上 0.25 mm 厚的薄层。接着在空气中至少晾干 1 h。无论是按上述方法制备的薄层板,还是购买的薄层板,都需要在 103 °C 烘箱中(5.3.7)烘 1 h,进行活化。使用前允许薄层板在干燥器(5.3.13)中冷却到室温。

为避免酰基转移,硅胶板可用硼酸饱和处理。反应混合物应尽快进行薄板层析分离。

由于一些硅胶含有可能影响脂肪酸分析的有机物,建议进行空白测试,确保没有这些物质存在。另外,事先把制备的薄层板放在展开槽中,用溶剂展开到薄层板的顶端加以清洗。

8.5.2 2-单甘酯的分离

用微量注射器(5.3.4)将试样提取液(8.4.5)滴在距薄层板(8.5.1)底边 15 mm 的位置,使细滴组成连续带。将薄层板放入展开槽(5.3.1),展开槽事先加有展开剂(4.3.5),并已达到饱和状态。盖上盖子进行层析(层析温度约 20 °C),直到溶剂到达薄层板上沿 10 mm 处为止。在约 20 °C 温度的空气中干燥薄层板,用喷雾器(5.3.5)将显示剂(4.3.6)喷涂在薄层板上。在紫外光灯(5.3.8)下标出单甘酯的谱带(R_f 值约 0.035),用微型刮铲(5.3.6)刮下,要避免刮到起点线上的物质。

在室温下是液体的净化试样(8.3),收集的硅胶移入烧瓶(5.3.9),按 8.6 步骤进行操作。

在室温下是固体的净化试样(8.3),收集到的硅胶移入 50 mL 锥形瓶(5.3.11),加 15 mL 乙醚(4.2.1),充分摇动。把所有硅胶移入烧结玻璃过滤器(5.3.12),每次用 15 mL 乙醚冲洗过滤器,共三次。收集过滤液用旋转蒸发器除去乙醚至滤液体积为 4 mL~5 mL,将其转移到已称重的圆底烧瓶(5.3.9)中,用氮气除去余下的乙醚,称重并计算单甘酯的质量。单甘酯的量应占该试样量的 10%~30%(质量分数),否则要重新水解甘三酯(8.3)或检查脂肪酶活性(见附录 A)。

8.6 气相色谱法分析 2-单甘酯

收集硅胶所获得的单甘酯(或从硅胶中提取的单甘酯),按 GB/T 17376 方法制备脂肪酸甲酯,采用三氟化硼常规法或中性油脂法。再按 GB/T 17377 气相色谱法测定脂肪酸甲酯。

9 结果表示

计算出各种 2-单甘酯占总 2-单甘酯的比值,以质量分数表示。

结果保留一位小数。

10 精密度

10.1 实验室间测试结果

附录 B 汇总了本标准实验室间测试精密度的情况。这些测试结果得出的数值可能不适用于其他浓度范围和测试对象。

10.2 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,在短时间内两个独立测试结果的绝对差值不应超过:

脂肪酸酯含量 $< 5\%$ (质量分数)时,绝对差 $\leq 0.2\%$ (质量分数);

脂肪酸酯含量 $\geq 5\%$ (质量分数)时,毛细管柱法的绝对差 $\leq 1\%$ (质量分数),填充柱法的绝对差 $\leq 3\%$ (质量分数)。

10.3 再现性

在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测试方法,两个独立测试结果的绝对差值不应超过:

脂肪酸酯含量 $< 5\%$ (质量分数)时,绝对差 $\leq 0.5\%$ (质量分数);

脂肪酸酯含量 $\geq 5\%$ (质量分数)时,毛细管柱法的绝对差 $\leq 3\%$ (质量分数),填充柱法的绝对差 $\leq 10\%$ (质量分数)。

11 实验报告

实验报告应说明:

- 采样方法(如知道);
- 所使用的方法;
- 测试结果;
- 如果进行了重复性检验,提供最后结果;
- 本标准中未指定或自选操作,以及可能影响结果的任何细节。

实验报告应包括关于样品的所有信息。

附 录 A

(规范性附录)

脂肪酶的制备和活性的测定

A.1 脂肪酶的制备

将 5 kg 的鲜猪胰脏冻至 0℃, 除去周围的固体脂肪和连着的组织, 在捣碎机中捣碎, 获得糊状物。低温下加入 2.5 L 无水丙酮, 搅拌 4 h~6 h, 然后离心分离。

用同体积的丙酮萃取残留物三次以上, 然后用 1+1 的丙酮和乙醚混合液萃取两次, 再用乙醚萃取两次。

在减压条件下干燥残留物 48 h, 获得稳定的粉状物为止, 储存于冰箱中。

A.2 脂肪酶活性的测定

用 165 mL 阿拉伯树胶溶液(100 g/L)、15 g 碎冰和 20 mL 已中和的油脂, 在合适的搅拌装置中, 混合搅拌 10 min, 制备成乳化油。

取 10 mL 乳化油置于 50 mL 烧杯中, 依次加入 0.3 mL 胆酸钠(200 g/L)溶液和 20 mL 蒸馏水。将烧杯置入 37℃±0.5℃的水浴锅中(见注 1)。

插入 pH 计的电极和螺旋桨搅拌器, 用 5 mL 滴定管一滴一滴地加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 直到 pH 达到 8.5。

加入足够量(见注 2)精确体积的 0.1%(质量分数)的脂肪酶粉末悬浮水溶液, 刚加入时 pH 计仍显示 pH8.3, 立即启动秒表, 滴入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 维持 pH8.3 不变, 记下每分钟所使用的碱溶液体积, 约 10 min。

以时间为横坐标, 以维持恒定 pH 所需碱溶液的毫升数为纵坐标, 将测定值作图, 所得图形应是直线。

注 1: 液态油脂, 水解温度选定 37℃, 熔点在 45℃以下的脂肪, 可选定 40℃, 以便进行测定。

注 2: 脂肪酶悬浮液的用量, 应使消耗 1 mL 碱液约需 4 min~5 min。一般需要 2 mL~5 mL 脂肪酶悬浮液, 也就是 1 mg~5 mg 的粉末。

脂肪酶单位规定为 37℃和 pH8.3 条件下, 每分钟释放 1 μmol 酸的酶量。

粉状物酶活性 A(以脂肪酶单位每毫克表示), 按式(A.1)计算:

$$A = \frac{V \times c}{m} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

V——从图形中算出的每分钟消耗氢氧化钠溶液的体积数, 单位为毫升每分钟(mL/min);

m——用于测试的脂肪酶粉状物的质量, 单位毫克(mg), 所使用的脂肪酶活性应在 8 单位每毫克至 20 单位每毫克之间;

c——氢氧化钠溶液浓度, 单位为毫摩尔每升(mmol/L)(c=100 mmol/L)。

附录 B
(资料性附录)
实验室间测试结果

B.1 使用填充柱的方法

实验室间测试在荷兰完成,参加实验室 8 个。对猪油、牛油、40%猪油和 60%牛油的混合油样品进行测试,给出剔除离群值后的统计结果(根据 ISO 5725^[2]评价)见表 B.1。测试结果用脂肪酸中甲酯的质量分数表示。

表 B.1 填充柱色谱测试猪油和牛油的统计结果

脂肪酸	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
A) 猪油							
平均含量(质量分数)	4.0	70.6	3.0	4.5	11.3	4.0	0.39
重复性标准偏差(S_r)	0.14	1.41	0.51	0.40	0.32	0.15	0.04
重复性变异系数/%	3.5	2.0	17.0	8.8	2.8	3.7	9.8
重复性限(r)	0.40	4.00	1.45	1.13	0.89	0.41	0.12
再现性标准偏差(S_R)	0.16	1.78	0.82	0.40	0.72	0.81	0.09
再现性变异系数/%	4.1	2.5	27.4	8.9	6.3	20.4	22.6
再现性限(R)	0.46	5.05	2.33	1.14	2.02	2.28	0.27
B) 牛油							
平均含量(质量分数)	7.8	14.2	4.5	9.0	55.0	2.5	0.86
重复性标准偏差(S_r)	0.83	0.54	0.26	0.33	1.93	0.37	0.11
重复性变异系数/%	10.6	3.8	5.8	3.6	3.5	15.0	12.5
重复性限(r)	2.34	1.51	0.73	0.92	5.45	1.05	0.30
再现性标准偏差(S_R)	0.84	0.79	0.26	0.50	2.18	0.69	0.49
再现性变异系数/%	10.7	5.6	5.9	5.5	4.0	27.8	57.4
再现性限(R)	2.37	2.23	0.74	1.40	6.16	1.96	1.39
C) 猪油和牛油的混合油, 40+60							
平均含量(质量分数)	6.2	36.8	3.7	7.2	38.2	3.0	0.74
重复性标准偏差(S_r)	0.58	0.44	0.28	0.74	1.02	0.20	0.13
重复性变异系数/%	9.4	1.2	7.5	10.3	2.7	6.7	17.3
重复性限(r)	1.65	1.26	0.78	2.11	2.90	0.57	0.36
再现性标准偏差(S_R)	0.58	1.78	0.49	0.79	1.36	0.48	0.25
再现性变异系数/%	9.4	4.8	13.1	10.9	3.6	16.2	33.7
再现性限(R)	1.65	5.05	1.38	2.23	3.84	1.37	0.71

B.2 使用毛细管柱的方法

1993 年,实验室间测试用 3 个橄榄油样品由 AOCS/IOOC 进行,24 个实验室参加。表 B.2 给出甘油三酯 2 位 C_{16:0} 和 C_{18:0} 脂肪酸组分含量的统计结果(根据 ISO 5725^[2]评价)。

表 B.2 毛细管柱色谱测试橄榄油的统计结果

样 品	1	5	8
剔除离群值后实验室数	23	23	22
平均含量(质量分数)	0.86	1.36	1.02
重复性标准偏差(S_r)	0.06	0.07	0.06
重复性变异系数/%	6.70	5.42	5.98
重复性限(r)	0.16	0.21	0.17
再现性标准偏差(S_R)	0.19	0.26	0.17
再现性变异系数/%	21.91	18.51	17.05
再现性限(R)	0.53	0.73	0.49

参 考 文 献

- [1] GB/T 5524—2008 动植物油脂 扦样(GB/T 5524—2008,ISO 5555:2001,IDT).
 - [2] ISO 5725:1986 Precision of test methods—Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
动 植 物 油 脂
甘三酯分子 2-位脂肪酸组分的测定
GB/T 24894—2010/ISO 6800:1997

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

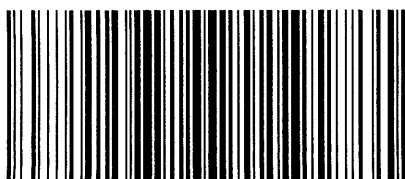
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 18 千字
2010 年 8 月第一版 2010 年 8 月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-40222 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 24894-2010