



中华人民共和国国家标准

GB/T 17377—2008/ISO 5508:1990
代替 GB/T 17377—1998

动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析

Animal and vegetable fats and oils—
Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids

(ISO 5508:1990, IDT)

2008-11-04 发布

2009-01-20 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 ISO 5508:1990《动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析》(英文版)。为便于使用,本标准对 ISO 5508:1990 进行了下列编辑性修改:

- “本国际标准”一词改为“本标准”;
- 删除国际标准的前言;
- 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”。

本标准是对 GB/T 17377—1998《动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析》的修订。

本标准与 GB/T 17377—1998 的主要差异如下:

- 删除了原标准的“ISO 前言”;
- 将原标准的“附录 A”改为本标准的“5.1.2”。

本标准自实施之日起代替 GB/T 17377—1998。

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。

本标准负责起草单位:国家粮食储备局西安油脂科学研究设计院、陕西省产品质量监督检验所、中粮黄海粮油工业(山东)有限公司。

本标准主要起草人:孟橘、夏天文、王慧芳、唐欣、徐光洪、倪芳妍、刘配莲。

本标准所代替标准历次版本发布情况为:

- GB/T 17377—1998。

动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析

1 范围

本标准给出了采用填充柱或毛细管柱气相色谱法,对按 GB/T 17376 规定方法获得的脂肪酸甲酯混合物组成进行定性、定量测定的一般性指南。

本标准不适用于聚合的脂肪酸。

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 17376 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备(ISO 5509:2000, IDT)

3 试剂

3.1 载气

惰性气体(氮、氩、氦、氢等),完全干燥且氧气含量低于 10 mg/kg。

注 1: 氢气只有在采用毛细管柱进行分析时作载气使用,能使分析速度加快一倍,但氢气危险,应配用安全装置。

3.2 助燃气

3.2.1 氢气(纯度 99.9%),不含有机杂质。

3.2.2 空气或氧气,不含有机杂质。

3.3 参比标准物

纯脂肪酸甲酯的混合物或已知组成的油脂甲酯,其组成最好与欲分析的脂肪物质相似。

应注意防止多不饱和脂肪酸氧化。

4 仪器

本标准涉及到气相色谱法常用的设备,使用填充柱或毛细管柱及火焰离子化检测器。任何符合 5.1.2 中规定的效率和分离度的设备均适用。

4.1 气相色谱仪

气相色谱仪由以下单元组成。

4.1.1 进样装置

可任选一种进样装置:

a) 配用填充柱,死体积尽可能最小(在这种情况下进样口应可被加热至比柱温高 20 °C~50 °C 的温度);

b) 配用毛细管柱,在此种情况下,进样装置应特殊设计以便适用于此种柱管。可使用分流式进样装置,也可使用非分流式进样装置。

注 2: 在不含有少于 16 碳的脂肪酸时,可以使用针式进样器。

4.1.2 柱箱

柱箱应能将色谱柱的温度加热至 260 °C 以上,并能维持所需温度(填充柱为 ± 1 °C,毛细管柱为 ± 0.1 °C)。当使用熔融石英管时,后一条件是特别重要的。

在所有情况下,特别是在分析少于 16 碳的脂肪酸时,建议采用程序升温。

4.1.3 填充柱

4.1.3.1 管柱:所使用的材料应不与被分析物质发生反应(例如玻璃或不锈钢),具有如下尺寸:

- a) 长度:1 m~3 m。当存在长链脂肪酸(多于 20 碳)时,应使用相对短的柱子;当测定 4 碳或 6 碳的脂肪酸时,建议使用长度为 2 m 的柱子;
- b) 内径:2 mm~4 mm。

注 3:有三个以上双键的多不饱和组分可能会在不锈钢管柱内分解。

注 4:可以使用双柱系统。

4.1.3.2 填充物由以下要素构成:

- a) 载体:酸洗并硅烷化的硅藻土或其他适用的惰性载体,且粒度分布范围狭窄(粒径在 125 μm ~200 μm 时为 25 μm),平均粒度与管柱内径和长度有关;
- b) 固定相:聚酯型极性固定液(如二甘醇聚丁二酸酯、丁二醇聚丁二酸酯、乙二醇聚己二酸酯等),氰基硅酮或符合色谱分离要求的其他固定液。固定相用量为填充物质量的 5%~20%。非极性固定相也可用于某些分离。

4.1.3.3 柱的老化:如果可能,将柱子与检测器脱开,先以 20 mL/min~60 mL/min 的流速将惰性气体通入新制备的色谱柱,将柱箱逐渐加热至 185 $^{\circ}\text{C}$,并在此温度下至少保持 16 h 后,再于 195 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下继续通气 2 h。

4.1.4 毛细管柱

4.1.4.1 管柱:所使用的材料应不与被分析物质发生反应(通常使用玻璃或熔融石英管)。内径为 0.2 mm~0.8 mm。在涂布固定相前,需对内表面进行适当处理(如表面制备、钝化)。在大多数情况下,25 m 长已足够。

4.1.4.2 固定相:通常使用聚乙二醇类(聚乙二醇-20 000),聚酯(丁二醇聚丁二酸酯)或极性的聚硅氧烷(氰基硅氧烷)。键合(交联)柱也是适用的。

注 5:使用极性聚乙烯硅氧烷柱分离鉴定亚麻酸和 20 碳酸会有一定困难。

涂层要薄,在 0.1 μm ~0.2 μm 之间。

4.1.4.3 柱的安装、老化:遵从安装毛细管柱的常用注意事项,如色谱柱在柱箱内的位置(支架),选择并安装接头(气密度),柱子末端在进样器和检测器中的位置(减少死体积)。柱内通入载气流[例如对于长 25 m 内径 0.3 mm 的柱为 30 kPa(0.3 bar)]。

令柱箱以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度程序升温,从环境温度升温至比固定相分解温度极限低 10 $^{\circ}\text{C}$ 的温度,对柱子进行老化。保持此柱箱温度 1 h 至基线稳定。再降至 180 $^{\circ}\text{C}$ 在恒温状态下进行工作。

注 6:可购用已预先老化的色谱柱。

4.1.5 检测器

以可加热到高于柱温的检测器为宜。

4.2 注射器

注射器最大容量应为 10 μL ,刻度应为 0.1 μL 。

4.3 记录器

如果由记录曲线计算被分析混合物的组分,则需要一台高精度、能与所用仪器相匹配的电子记录器。记录器应具有如下性能:

- a) 响应时间小于 1.5 s,最好小于 1 s(响应时间是当瞬间输入 100%信号时,记录笔从 0%移动至 90%所需的时间);
- b) 记录纸宽:至少 20 cm;
- c) 记录纸速:在 0.4 cm/min~2.5 cm/min 之间可调。

4.4 积分仪或计算机(任选)

可用电子积分仪或计算机进行快速、准确的计算。积分仪应具有满足线性响应的灵敏度,能较好地校正基线偏移。

5 操作步骤

使用火焰离子化检测器时按 5.1~5.3 步骤进行。

也可使用热导检测器进行气相色谱分析。但操作条件要按第 8 章执行。

5.1 试验条件

5.1.1 最佳操作条件的选择

5.1.1.1 填充柱

在选择试验条件时,应考虑下列各因素:

- a) 柱的长度和直径;
- b) 固定相的性质和数量;
- c) 柱温;
- d) 载气流速;
- e) 所需的分离度;
- f) 试样用量,选择检测器和静电计结合可给出线性响应的进样量;
- g) 分析时间。

通常,按表 1 和表 2 中给出的条件可得到较好的分离效果,以硬脂酸甲酯为例,在 15 min 内洗脱,可达到理论塔板数至少每米柱长 2 000。

如仪器性能允许,进样口温度应约为 200 °C,而检测器温度应等于或高于柱温。

一般情况下,根据管柱直径的不同,火焰离子化检测器的氢气流速与载气流速比值为 1:2~1:1。氧气(助燃气)的流速是氢气流速的 5 倍~10 倍。

表 1

柱内径/mm	载气流速/(mL/min)
2	15~25
3	20~40
4	40~60

表 2

固定相质量分数/%	柱温/°C
5	175
10	180
15	185
20	185

5.1.1.2 毛细管柱

毛细管柱的效率和渗透性意味着各组分之间的分离和分析时间主要依赖于柱内的载气流速,因此有必要按照此参数(或者更简单地根据色谱柱的压力损失)使操作条件达到最佳状态,以满足操作者对提高分离效果或缩短分析时间的不同要求。

5.1.2 理论塔板数和分离度的测定

以分析由硬脂酸甲酯和油酸甲酯按等量比例组成的混合物(例如,由可可脂制得的甲酯)为例。

合理选择柱温、载气流速和进样量,使硬脂酸甲酯峰的最大值大约在溶剂峰出现 15 min 后出现,且

峰高达到满标的 3/4。见图 1。

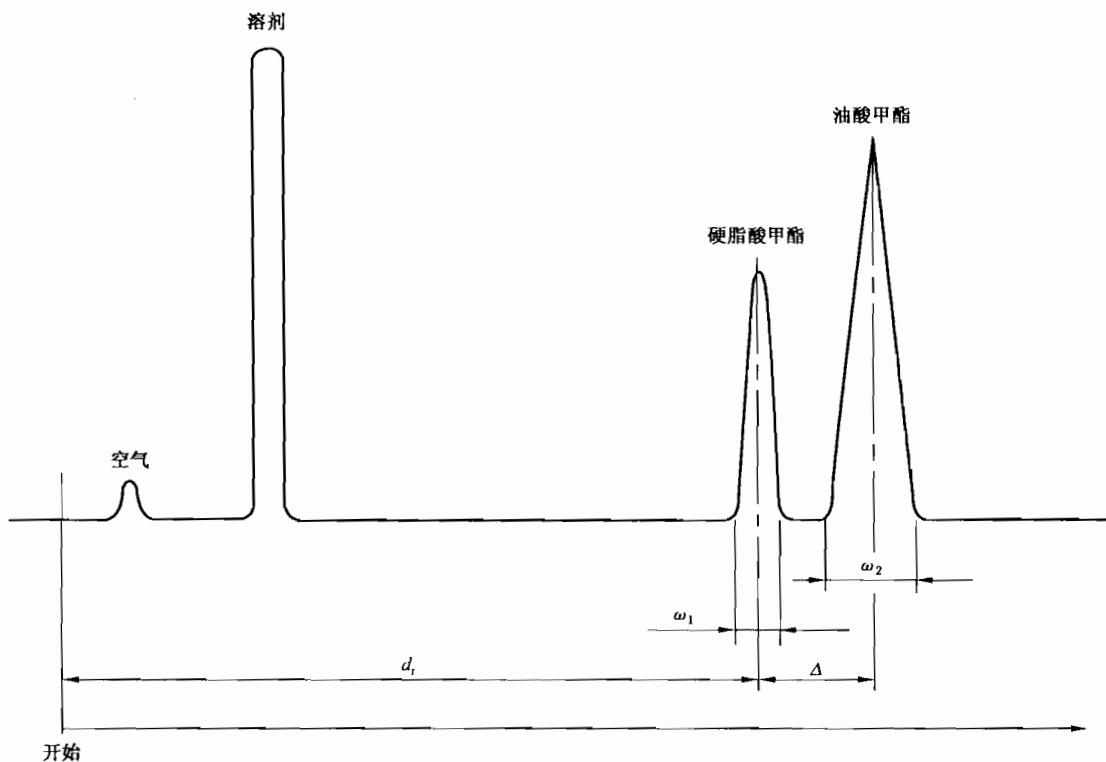


图 1 理论塔板数(有效率)和分离度的测定

理论塔板数 n , 按式(1)计算:

$$n = 16 \times \left(\frac{d_i}{\omega_1}\right)^2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

分离度 R 按式(2)计算:

$$R = \frac{2 \times \Delta}{\omega_1 + \omega_2} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

n ——理论塔板数;

R ——分离度;

d_i ——保留距离,从色谱图起始点到硬脂酸甲酯最高峰间的距离,单位为毫米(mm);

ω_1 ——硬脂酸甲酯的峰宽,是从曲线两个拐点作切线与基线的交点间的距离,单位为毫米(mm);

ω_2 ——油酸甲酯的峰宽,是从曲线两个拐点作切线与基线的交点间的距离,单位为毫米(mm);

Δ ——硬脂酸甲酯与油酸甲酯最高峰间的距离,单位为毫米(mm)。

被选择的检测条件应满足理论塔板数(n)每米柱长至少 2 000,分离度(R)至少 1.25。

5.2 进样量

用注射器(4.2)取 0.1 μL ~2 μL 按照 GB/T 17376 制备的甲酯溶液进样。

如果是干甲酯,可用色谱纯庚烷将其配制成约 100 mg/mL 的溶液,取此溶液 0.1 μL ~1 μL 进样。

如果检测痕量组分,试样量可以增大(至 10 倍)。

5.3 分析

一般情况下,按 5.1.1 规定的条件操作。

但在测定碳原子数少于 12 的脂肪酸甲酯时应采用较低的柱温,而测定多于 20 碳的脂肪酸甲酯时应采用较高的柱温,在上述两种情况下,可以采用程序升温。例如,若试样中含有低于 12 碳的脂肪酸甲

酯,可在 100 °C 下进样(如有丁酸存在,则可在 50 °C~60 °C 进样)并立即以 4 °C/min~8 °C/min 的速率升至最佳温度。在某些情况下可以将这两个步骤结合起来。

程序升温后,在恒定温度下继续洗脱直至所有组分洗脱出来。如果仪器无程序升温,可在 100 °C 和 195 °C 两个固定温度下进行操作。

如有必要,例如在分析鱼油样品或同时存在着 C18:3 和 C20:0 或 C18:3 和共轭的 C18:2 试样时,建议使用两种极性不同的固定相进行分析,以确认无被隐蔽的峰。

5.4 标准色谱图和标准曲线的制备

用与试样相同的条件分析参比标准混合物(3.3),并测出各脂肪酸甲酯组分的保留时间或保留距离。在半对数坐标纸上以任意不饱和度作图,所得的曲线将显示保留时间或保留距离的对数是碳原子数的函数。在等温条件下,相同不饱和度的直链脂肪酸的曲线应是直线。这些直线大致上是平行的。

应避免存在“隐蔽峰”,即在该处的分离度不足以分离两种组分。

6 结果计算

6.1 定性分析

由按 5.4 绘制的色谱图上确定样品的甲酯峰,必要时可用内插法。

6.2 定量分析

6.2.1 组成的测定

除特殊情况外,通常使用内部归一化法,即假定试样的所有组分都显示在色谱图上,因此各峰面积的总和即代表 100% 的组成(完全洗脱)。

如果仪器配有积分仪,可使用由此获得的数据。如无积分仪,则可用峰高乘半峰宽测定各峰的面积,此时应考虑记录过程所使用的不同衰减。

6.2.2 计算方法

6.2.2.1 一般情况

组分 i 的含量(X_i),按式(3)计算,以甲酯的质量分数表示,数值以%计:

$$X_i = \frac{A_i \times 100}{\sum A} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

A_i ——组分 i 的峰面积;

$\sum A$ ——各峰面积的总和。

计算结果保留至小数点后一位。

注 7:一般情况下,由峰面积比计算的结果可被认为代表质量分数。特殊情况,请参阅第 6.2.2.2 条。

6.2.2.2 校正因子的使用

在某些情况下,特别是存在碳原子数少于 8 的脂肪酸或有二级基团的脂肪酸,使用热导检测器或需要最高精确度时,应使用校正因子将峰面积比转换成组分的质量分数。

校正因子是在与试样相同的操作条件下,由分析已知组成的甲酯参比混合物得到的色谱图测定的。

对于此种参比混合物,组分 i 的质量分数(T)可由式(4)求出,数值以%计:

$$T = \frac{m_i \times 100}{\sum m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

m_i ——参比混合物中组分 i 的质量,单位为毫克(mg);

$\sum m$ ——参比混合物中各组分的总质量,单位为毫克(mg)。

按式(5)计算组分 i 的质量分数(Z ,面积/面积):

$$Z = \frac{A_i \times 100}{\sum A} \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

A_i ——组分 i 的峰面积,由参比混合物的色谱图(5.4)得到;

ΣA ——各峰面积的总和。

则校正因子可按式(6)进行计算:

$$K'_i = \frac{m_i \times \Sigma A}{A_i \times \Sigma m} \dots\dots\dots(6)$$

通常,校正因子是以对棕榈酸的校正因子 K_{c16} 的相对值来表示的,故此相对校正因子变为:

$$K'_i = K_i / K_{c16} \dots\dots\dots(7)$$

因此,试样中组分 i 的含量按式(8)计算,以甲酯的质量分数表示,数值以%计:

$$\frac{K'_i \times A_i \times 100}{\Sigma(K'_i \times A_i)} \dots\dots\dots(8)$$

计算结果保留至小数点后一位。

6.2.2.3 内标的使用

在某些分析中(例如在不是所有的脂肪酸组分都能被定量测定时,特别是4碳和6碳的脂肪酸与16碳和18碳的脂肪酸并存时,或者需要测定样品中某种脂肪酸绝对量时)需要使用内标。通常使用5、15或17碳脂肪酸,应测定该内标的校正因子。

以甲酯表示的组分 i 的质量分数(X_i)可由式(9)求出:

$$X_i = \frac{m_i \times K'_i \times A_i \times 100}{m \times K'_{is} \times A_s} \dots\dots\dots(9)$$

式中:

X_i ——甲酯组分的质量分数,%;

A_i ——对应于组分 i 的峰面积;

A_s ——对应于内标物的峰面积;

K'_i ——组分 i 的校正因子(相对于 K_{c16});

K'_{is} ——内标物的校正因子(相对于 K_{c16});

m ——试样质量,单位为毫克(mg);

m_s ——内标物质量,单位为毫克(mg)。

计算结果保留至小数点后一位。

6.2.3 精密度

按照 GB/T 17376 制备甲酯,并按照本标准中所述进行气相色谱分析,结果应满足下述重复性和再现性的要求。这些要求一直以来均被认可。

6.2.3.1 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,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果,对于质量分数大于5%的组分,相对偏差应不大于3%,绝对差值不大于1%;对于质量分数小于等于5%的组分,绝对差值应不大于0.2%。

6.2.3.2 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,对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果,对于质量分数大于5%的组分,相对偏差不超过10%,绝对差值应不超过3%;对于质量分数小于等于5%的组分,绝对差值应不超过0.5%。

7 特殊情况——使用热导检测器

使用热导检测器的气相色谱仪也可用于定性、定量测定脂肪酸甲酯混合物的组成。如果使用热导检测器,应按照表3中所示修改第4章和第5章中规定的条件。

定量分析时,应使用6.2.2.2中定义的校正因子。

表 3 热导检测器条件

项 目	条 件
柱管	柱长:2 m~4 m,内径:4 mm
载体/ μm	粒度:160~200
固定相质量分数/%	15~25
载气	氮气,若无氮气可用含氧量尽可能低的氢气
助燃气	无
进样口温度/ $^{\circ}\text{C}$	比柱温度高 40~60
柱温/ $^{\circ}\text{C}$	180~200
载气流速/(mL/min)	60~80
进样量/ μL	0.5~2

8 测试报告

测试报告应详细说明:

- 完成样品测定所需的全部信息;
- 甲酯化制备方法;
- 气相色谱分析所采用的方法;
- 测定结果;
- 所有在本标准中未规定或视为任意的操作细节,以及其他可能已经影响了实验结果的事件。