

前 言

本标准是依据我国动植物油脂检测技术的实际与发展状况,等效采用国际标准 ISO 5508:1990《动植物油脂——脂肪酸甲酯的气相色谱分析》制定的,在标准的编写与表述上按照 GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第1单元:标准的起草与表述规则 第1部分:标准编写的基本规定》和 GB 1.4—88《标准化工作导则 化学分析方法标准编写规定》的要求进行编写的。

依据 ISO 5508:1990 编写本标准时,将“理论塔板数和分离度的测定”部分作为标准的附录放入附录 A 中。

本标准由中华人民共和国国内贸易部提出。

本标准由中华人民共和国国内贸易部归口。

本标准起草单位:国内贸易部谷物油脂化学研究所。

本标准主要起草人:李歆、应珊红、郝希成。

ISO 前言

ISO(国际标准化组织)是由各国标准化团体(ISO 成员团体)组成的世界性联合会。制定国际标准的工作通常由 ISO 技术委员会进行,各成员团体若对某技术委员会已确立的标准项目感兴趣,均有权参加该委员会的工作。与 ISO 保持联系的各国际组织(官方的或非官方的)也可参加有关工作。在电工技术标准化方面,ISO 与国际电工委员会(IEC)保持密切合作关系。

由技术委员会正式通过的国际标准草案提交各成员团体表决,国际标准需取得至少 75%参加表决的成员团体的同意才能正式通过。

ISO 5508:1990 是由 ISO/TC34 农产食品技术委员会制定的。

经过技术修订构成的第二版取消并代替第一版(ISO 5508:1978)。

中华人民共和国国家标准

动 植 物 油 脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析

GB/T 17377—1998
eqv ISO 5508:1990

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

1 范围

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

本标准不适用于聚合的脂肪酸。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 17376—1998 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备(eqv ISO 5509:1978)

3 试剂

3.1 载气:惰性气体(氮、氦、氩、氢等),干燥且氧气含量低于 10 mg/kg。

注:只有在采用毛细管柱进行分析时,作为载气的氢气能使分析速度加快一倍,但有危险。应配备安全装置。

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

纯脂肪酸甲酯的混合物或已知油脂组成的甲酯,其组成最好与欲分析之脂肪物质相似。

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。任何符合附录 A 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,尽可能有最小的死体积(在这种情况下进样口应可被加热至比柱温高 20~50℃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：在不含碳原子数少于 16 的脂肪酸时，可以使用移动针式进样器。

4.1.2 柱箱

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

建议在所有情况下，特别是在分析碳原子数少于 16 的脂肪酸时，采用程序升温。

4.1.3 填充柱

4.1.3.1 管柱：应由对被分析的物质惰性的材料制成（例如玻璃或不锈钢），具有如下尺寸：

a) 长度：1~3 m。当长链脂肪酸（碳原子数多于 20）存在时，应使用较短的柱子；当测定四或六碳的脂肪酸时，建议使用长度为 2 m 的管柱。

b) 内径：2~4 mm。

注

1 如果带有三个以上双键的多不饱和组分存在时，它们会在不锈钢管柱内分解。

2 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（粒度为 125~200 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 DEGS、丁二醇聚丁二酸酯 BDS、乙二醇聚己二酸酯等 EGA）、氰基硅酮或其他符合色谱分离要求的允许使用的溶剂。固定相用量为填充物的 5%~20% (m/m)。非极性固定相可用于某些分离。

4.1.3.3 柱的老化：

如果可能，将柱子与检测器脱开，以 20~60 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℃，在此温度下至少保持 16 h 后，再于 195℃ 的温度下继续通气 2 h。

4.1.4 毛细管柱

4.1.4.1 管柱：应由对被分析的物质惰性的材料制成（通常使用玻璃或熔融石英管）。内径为 0.2~0.8 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-2000），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（交联的）柱也是适用的。

注：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 0.1~0.2 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℃/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℃ 的温度，对柱子进行老化。保持此柱箱温度 1 h 至基线稳定。降至 180℃ 在恒温状态下进行工作。

注：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) 响应速率小于 1.5 s,最好小于 1 s(响应速率是当瞬间输入 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 25 cm。
- c) 记录纸速:在 0.4~2.5 cm/min 之间可调。

4.4 积分仪或计算器(任选)

可用电子积分仪或电子计算器进行快速、准确的计算。它应有灵敏度足够的线性响应,对基线偏移也应能作出令人满意的校正。

5 操作步骤

5.1~5.3 叙述的操作步骤与使用火焰离子化检测器有关。

作为替代,亦可使用热导检测器(根据热传导变化的工作原理)进行气相色谱分析。但要按第 7 章中所述修改操作条件。

5.1 试验条件:选择最佳操作条件。

5.1.1 填充性

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) 试验用量,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 中给出的数值将得出预期的结果,即对于硬脂酸甲酯理论塔板数不少于 2 000/(米柱长),并可在 15 min 内洗脱。

表 1

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

表 2

固定相浓度(m/m),%	柱温,℃
5	175
10	180
15	185
20	185

如仪器性能允许,进样口温度应为约 200℃,而检测器温度应等于或高于柱温。

作为一条规律,供给火焰离子化检测器的氢气流量与载气流量的比值应为 1:2~1:1,这取决于管柱的直径。氧气(助燃气)的流量则 5~10 倍于氢气的流量。

5.1.2 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。因此必须根据操作者希望改善分离还是进行快速分析,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。

5.2 进样量

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

在溶液不含酯的情况下,可配制一种在色谱纯庚烷中约为 100 mg/mL 的溶液,取此溶液 0.1~1 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

通常,按 5.1 条规定的条件操作。

不过,在测定碳原子数少于 12 的脂肪酸时可能需要降低柱温,而测定多于 20 碳的脂肪酸时可能需要升高柱温。有时在上述两种情况下,也可能采用程序升温。例如,若试样中含有低于 12 碳的脂肪酸甲酯,可在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下进样(如有丁酸存在,则可在 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 进样)并立即以 4~8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 和 195 $^{\circ}\text{C}$ 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成对的 C18:3 和 C20:0 或 C18:3 和 C18:2 的试样时,建议使用两种极性不同的固定相进行分析,以确认无被掩蔽的峰。

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),并测出各脂肪酸成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。

必须防止存在“隐蔽峰”,即在该处的分离度不足以分离两种组分。

6 结果表示

6.1 定性分析

由按 5.4 条绘制的曲线图上确定样品的甲酯峰,必要时可利用插入法。

6.2 定量分析

6.2.1 组成的测定

除意外情况外,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,此时应将记录过程所使用的衰减考虑在内。

6.2.2 计算方法

6.2.2.1 一般情况:

通过测定相应峰面积对所有峰面积总和的百分数来计算给定组分 i 的含量,用甲酯的质量百分比表示,公式如下:

$$\frac{A_i \times 100}{\Sigma A} \dots\dots\dots (1)$$

式中: A_i ——组分 i 的峰面积;

ΣA ——各峰面积的总和。

计算结果保留至小数点后一位。

注:一般情况下,由峰面积比计算的结果可被认为代表质量百分比。对于这个假设不成立的情况,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,必须使用校正因子将峰面积的百分数转换成组分的质量百分数。

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,成分 i 的质量百分比可由式(2)求出:

$$\frac{m_i \times 100}{\Sigma m} \dots\dots\dots(2)$$

式中: m_i ——参比混合物中组分 i 的质量,mg;

Σm ——参比混合物中各组分的总质量,mg。

按式(3)由参比混合物的色谱图(5.4)计算组分 i 的百分比(面积/面积):

$$\frac{A_i \times 100}{\Sigma A} \dots\dots\dots(3)$$

式中: A_i ——组分 i 的峰面积;

ΣA ——所有峰面积的总和。

则校正因子可按式(4)进行计算:

$$K_i' = \frac{m_i \times \Sigma A}{A_i \times \Sigma m} \dots\dots\dots(4)$$

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:

$$K_i' = K_i / K_{c16} \dots\dots\dots(5)$$

因此,试样中每种组分 i 的含量表示为甲酯的质量百分比:

$$\frac{K_i' \times A_i \times 100}{\Sigma(K_i' \times A_i)} \dots\dots\dots(6)$$

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。必须测定该内标的校正因子。

以甲酯表示的组分 i 的质量百分比可由式(7)求出:

$$\frac{m_s \times K_i' \times A_i \times 100}{m \times K_s' \times A_s} \dots\dots\dots(7)$$

式中: 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_s' ——内标物的校正因子(相对于 K_{c16});

m ——进样试样质量,mg;

m_s ——内标物质量,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得出重复性和再现性值。此值已被公认。

6.2.3.1 重复性:

同一操作者使用同一仪器对同一试样连续进行两次测定的误差,对于含量大于 5%(m/m)的组分,相对偏差应不大于 3%,绝对误差应不超过 1%(m/m);对于含量较低的组分,绝对误差应不大于 0.2%(m/m)。

6.2.3.2 再现性:

两个不同实验室用同一方法对同一实验室样品进行分析获得的最终结果的误差,对于含量大于5%(m/m)的组分,相对偏差应不超过10%,绝对误差应不超过3%(m/m);对于含量较低的组分,绝对误差应不超过0.5%(m/m)。

7 特殊情况——使用热导检测器(根据热传导变化的工作原理)

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。

表 3

变量	范围值
柱管	柱长:2~4 m,内径:4 mm
载体, μm	粒度:160~200
固定相浓度(m/m),%	15~25
载气	氦气,若无氦气则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 40~60
柱温, $^{\circ}\text{C}$	180~200
载气流速, mL/min	60~80
进样量, μL	0.5~2

定量分析时,应使用6.2.2.2条中定义的校正因子。

8 实验报告

实验报告应指明为制备脂肪酸甲酯和进行气相色谱分析所采用的方法及测定结果。亦应提及本标准未规定的或自选的全部操作细节,以及可能影响测定结果的附带情况的细节。

实验报告应包括完成样品鉴定所需的全部信息。

附录 A
(标准的附录)

理论塔板数(有效率)和分离度的测定

以分析由硬脂酸甲酯和油酸甲酯按当量比例组成的混合物(例如,由可可脂制得的甲酯)为例。
合理选择进样量、柱温和载气流量,使硬脂酸甲酯峰的最大值在溶剂峰出现后 15 min 内出现且达到满标的 3/4。见图 A1。

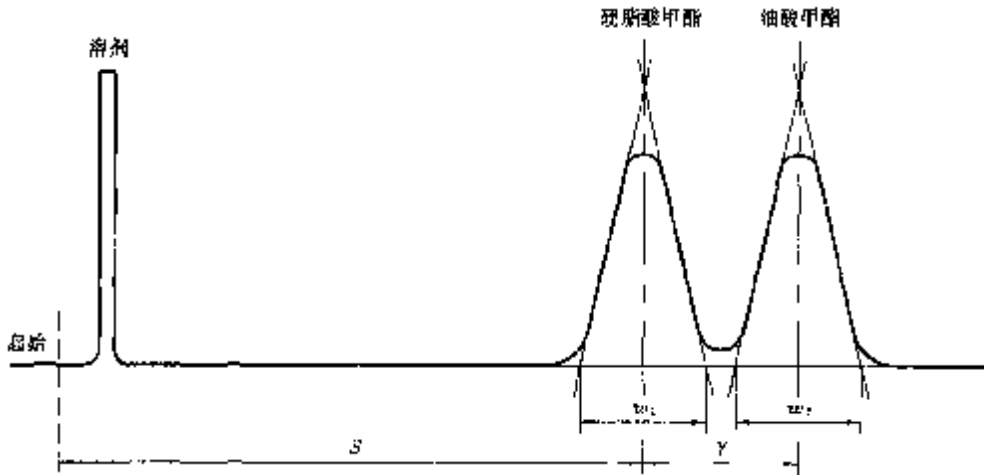


图 A1 理论塔板数(有效率)和分离度的测定

理论塔板数(有效率) n 由下式计算:

$$n = 16 \times \left(\frac{S}{w_1}\right)^2 \quad \dots\dots\dots(A1)$$

分离度 R 的计算:

$$R = \frac{2 \times Y}{w_1 + w_2} \quad \dots\dots\dots(A2)$$

- 式中: n ——理论塔板数;
 R ——分离度;
 S ——保留距离,mm,从色谱图起点到硬脂酸甲酯最大峰间的距离;
 w_1 ——硬脂酸甲酯的峰宽,mm,是从曲线两个拐点作切线与基线的交点间的距离;
 w_2 ——油酸甲酯的峰宽,mm,是从曲线两个拐点作切线与基线的交点间的距离;
 Y ——硬脂酸甲酯与油酸甲酯最大峰间的距离,mm。