

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 5509:1978《动植物油脂——脂肪酸甲酯制备》制定的,为使其更具实用性将试剂“色谱纯庚烷(己烷)改为分析纯庚烷(己烷)”;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,同时将 ISO 5509:1978 第8章“关于试剂和操作步骤的说明”作为标准的组成部分列入附录 A。

本标准第3章(三氟化硼一般方法)和第4章适用于从各类动植物油脂和脂肪酸制备六碳或六碳以上的脂肪酸甲酯。对于大多数油脂,通常采用三氟化硼一般方法。

本标准第3章不适用于含有下列基团的脂肪酸甲酯的制备:

- 次氧化合物(如:羟基、氢过氧基、酮基、环氧基);
- 环丙烷和环丙烯基化合物;
- 共轭多不饱和化合物及炔类化合物;
- 蜡。

为此,可采用第4章所述方法。但如果油脂中仅含有少量的上述化合物(如棉籽油),仍可按第3章的一般方法进行酯化。

另见附录 A 中 A1。

本标准第5章适用于从中性油脂(酸价小于2)制备四碳或四碳以上的脂肪酸甲酯,用于气相色谱分析。

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:应珊红、李歆、郝希成。

ISO 前言

ISO(国际标准化组织)是由各国标准化协会(ISO 成员团体)组成的世界性联合会。制定国际标准工作通常由 ISO 的技术委员会完成,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。

由技术委员会正式通过的国际标准草案由 ISO 委员会批准为正式国际标准之前需提交各成员团体通过。

国际标准 ISO 5509:1978 是由 ISO/TC34 农产食品技术委员会制定的,于 1976 年 7 月分发给各成员团体。

由下列国家的成员团体通过:

澳大利亚	匈牙利	波兰
奥地利	伊朗	罗马尼亚
加拿大	以色列	南非
智利	朝鲜	西班牙
捷克斯洛伐克	墨西哥	泰国
埃塞俄比亚	荷兰	土耳其
法国	新西兰	英国
德国	秘鲁	南斯拉夫

没有成员团体对此文件表示不赞成。

1 范围

本标准规定了脂肪酸甲酯的制备方法。

本标准适用于气相色谱、薄层色谱、红外光谱等需要甲酯衍生物的各种分析过程。

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 15687—1995 油脂试样制备(eqv ISO 661:1989)

3 三氟化硼一般方法

警告:三氟化硼有毒,建议分析人员尽量不用甲醇和三氟化硼制取三氟化硼甲醇溶液(见附录 A 中 A2)。

方法中涉及到危险试剂的使用。应采取适当的防护措施以保护眼睛,并避免腐蚀性化学灼伤的危险。

3.1 原理

甘油酯皂化后,释出的脂肪酸在三氟化硼存在下进行酯化。

3.2 试剂

所有试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

3.2.1 氢氧化钠甲醇溶液:约 0.5 mol/L。

将 2 g 氢氧化钠溶于 100 mL 含水不超过 0.5%(*m/m*)的甲醇中。该溶液存放时间较长时,也许形成少量白色的碳酸钠沉淀,但不会影响甲酯的制备。

3.2.2 三氟化硼甲醇溶液:12%~15%(*m/m*),可购用 14%和 50%的溶液(见附录 A 中 A3)。

3.2.3 庚烷(或己烷)(见附录 A 中 A3 和附录 A 中 A4)。

3.2.4 重蒸石油醚:沸程 40~60℃,溴值低于 1,无残渣(见附录 A 中 A3)。

3.2.5 氯化钠:饱和水溶液。

3.2.6 无水硫酸钠。

3.2.7 甲基红:1 g/L,溶于 60%(*V/V*)的乙醇中。

3.2.8 氮气:含氧量低于 5 mg/kg。

3.3 仪器

3.3.1 磨口烧瓶:50 mL 或 100 mL。

3.3.2 回流冷凝器:有效长度 200~300 mm,具有磨口接头。

3.3.3 脱脂沸石。

3.3.4 移液管或自动加液器:至少 10 mL。

3.3.5 通氮导管。

3.3.6 试管:具磨口玻璃塞。

3.3.7 分液漏斗:250 mL。

3.4 试样制备

按 GB/T 15687 制备试样。

3.5 步骤

三氟化硼有毒,以下操作请在通风橱里进行,玻璃器具用后,应立即用水冲洗。

3.5.1 试样

试样的质量是为了按表 1 选择合适的烧瓶及适量的试剂和溶液,不需准确称量(见附录 A 中 A5)。

表 1 试样取样量

试样质量 mg	烧瓶 mL	氢氧化钠甲醇溶液(3.2.1) mL	三氟化硼甲醇溶液(3.2.2) mL	庚烷(3.2.3) mL
100~250	50	4	5	1~3
250~500	50	6	7	2~5
500~750	100	8	9	4~8
750~1 000	100	10	12	7~10

注:如果甲酯用于气相色谱分析,试样最好取 350 mg 左右,少于此量时,应确保样品具有代表性(见附录 A 中 A6)。

3.5.2 皂化(见附录 A 中 A1)

3.5.2.1 油脂

将试样置于烧瓶中,加入适量氢氧化钠甲醇溶液(3.2.1)及沸石,然后将冷凝管固定于烧瓶上。

注:在含有两个以上双键的脂肪酸存在时,建议导入氮气(3.2.8)将甲醇溶液里和烧瓶中的空气排掉。皂化时从冷凝器顶部持续通入氮气。

在水浴上回流直至油滴消失,通常需要 5~10 min(见附录 A 中 A7)。用移液管从冷凝器顶部加入适量的三氟化硼甲醇溶液(3.2.2)于沸腾的溶液里。

3.5.2.2 脂肪酸

将试样置于烧瓶中,用移液管加入适量的三氟化硼甲醇溶液(3.2.2),装上冷凝器并在水浴中煮沸。

3.5.3 甲酯制备

继续煮沸 2 min。

经冷凝器顶部加入适量庚烷(3.2.3)于沸腾混合物中(数量的准确性不影响反应),继续煮沸 1 min。

停止加热,冷却至室温后取下冷凝器。加入少量氯化钠溶液(3.2.5)并轻摇烧瓶数次,继续加入氯化钠溶液(3.2.5)至烧瓶颈部。

吸取上层溶液(庚烷层)约 1 mL 于试管中,加适量无水硫酸钠(3.2.6)去除溶液中痕量水,即可直接取一定量注入气相色谱仪分析。

3.5.4 回收干酯

如果需要回收全部干酯,可将氯化钠溶液和庚烷液移入分液漏斗中分层,保留庚烷液,氯化钠溶液用每次 50 mL 的石油醚(3.2.4)或己烷萃取两次。

将庚烷液和两次萃取物合并,然后用每份 20 mL 蒸馏水洗涤,直至用甲基红指示剂(3.2.7)检验不显酸性为止。用无水硫酸钠(3.2.6)干燥过滤,并在水浴上于氮气流(3.2.8)下蒸发溶剂(见附录 A 中 A8)。不足 500 mg 的试样,最好按比例减少溶剂和蒸馏水体积。

4 不用三氯化硼的替代方法

4.1 适用中性油脂的方法(酸价小于 2)

4.1.1 原理

甘油酯在碱性介质中酯化。

4.1.2 试剂

所有试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

4.1.2.1 甲醇:含水不超过 0.5%(m/m)。

4.1.2.2 氢氧化钾甲醇溶液:约 1 mol/L。

净 5.6 g 氢氧化钾溶于 100 mL 甲醇(4.1.2.1)中。

4.1.2.3 庚烷(或己烷)(见附录 A 中 A3 和附录 A 中 A4)。

4.1.2.4 无水硫酸钠。

4.1.2.5 氮气:含氧量低于 5 mg/kg。

4.1.3 仪器

4.1.3.1 高速搅拌器及适当的加热器(如:带加热器的电磁搅拌器)。

4.1.3.2 磨口烧瓶:100 mL。

4.1.3.3 氮气导管。

4.1.3.4 回流冷凝器:具有磨口接头。

4.1.3.5 脱脂沸石。

4.1.3.6 分液漏斗:250 mL。

4.1.3.7 细颈锥形瓶:50 mL。

4.1.4 试样制备

按 GB/T 15687 制备试样。

4.1.5 步骤

4.1.5.1 试样

称取试样约 4 g(见附录 A 中 A6)。

4.1.5.2 甲酯制备(见附录 A 中 A1)

将试样置于烧瓶中,加入约 40 mL 甲醇(4.1.2.1)、0.5 mL 氢氧化钾甲醇溶液(4.1.2.2)及沸石,装上冷凝器。

注:在含有两个以上双键的脂肪酸存在时,建议导入氮气(4.1.2.5)将甲醇溶液里和烧瓶中的空气排掉。皂化时从冷凝器顶部持续通入氮气。

煮沸溶液至变清,一般 5~15 min 后反应完全(见附录 A 中 A7)。

在流水中将烧瓶冷却,然后将溶液移入分液漏斗。

用 20 mL 庚烷(4.1.2.3)冲洗烧瓶并将溶液并入分液漏斗,加入 40 mL 蒸馏水,摇动使之分层。甲酯进入上层液(庚烷),将水层分离到第二分液漏斗中,再次用 20 mL 庚烷萃取。合并两次萃取物,并用每次 20 mL 蒸馏水冲洗两遍,分离甲酯溶液并用无水硫酸钠(4.1.2.4)干燥。经脱脂棉滤入 50 mL 锥形瓶中,在氮气(见附录 A 中 A8)保护下,于沸水浴上将溶液蒸发至约 20 mL。

4.2 适用酸性油脂(酸价大于 2)和脂肪酸的方法

4.2.1 原理

对于酸性油脂,中和游离脂肪酸,并使甘油酯碱解后,脂肪酸在酸性介质中酯化。

对于脂肪酸,直接在酸性介质中酯化。

4.2.2 试剂

所有试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

4.2.2.1 甲醇钠甲醇溶液

将 1 g 金属钠溶于 100 mL 含水不超过 0.5%(*m/m*)的甲醇中。

4.2.2.2 盐酸无水甲醇溶液:约 1 mol/L。

注

1 少量的无水氯化氢气体可以在实验室制取,将市售浓盐酸($\rho_{20}=1.18\text{ g/mL}$)滴入浓硫酸($\rho_{20}=1.84\text{ g/mL}$)中通过置换反应产生,释出的气体通入硫酸中使其干燥。由于盐酸能迅速被甲醇吸收,在溶解时应适当采取防护措施;例如:可用一个倒置的、边缘刚好接触液面的小漏斗将气体导入。因为盐酸甲醇溶液可在有玻璃塞的瓶中于暗处贮存,故可事先制备大量溶液。

2 可用约 1 mol/L 的硫酸甲醇溶液代替盐酸甲醇溶液,但酯化时间至少需要 20 min,且形成的硫酸钠沉淀会妨碍沸腾,因而需要过滤或使用电磁搅拌器。

4.2.2.3 庚烷(或己烷),见附录 A 中 A3 和附录 A 中 A4。

4.2.2.4 无水硫酸钠。

4.2.2.5 甲基红:1 g/L,溶于 60%(*V/V*)乙醇中。

4.2.2.6 氮气:含氧量低于 5 mg/kg。

4.2.3 仪器

4.2.3.1 高速搅拌器及适当的加热器(如:带加热器的电磁搅拌器)。

4.2.3.2 磨口烧瓶:250 mL。

4.2.3.3 氮气导管。

4.2.3.4 回流冷凝器:具有磨口接头。

4.2.3.5 脱脂沸石。

4.2.3.6 分液漏斗:250 mL。

4.2.3.7 细颈锥形瓶:100 mL。

4.2.4 试样制备

按 GB/T 15687 制备试样。

4.2.5 步骤

4.2.5.1 试样

称取试样约 4 g(见附录 A 中 A6)。

4.2.5.2 甲酯制备(见附录 A 中 A1)

4.2.5.2.1 酸性油脂

将试样置于烧瓶中,加入 40 mL 甲醇钠溶液(4.2.2.1)及沸石,装上冷凝器。

注

1 也可以在加入试样前,先将 40 mL 甲醇和 0.4 g 金属钠置于烧瓶中,直接制备甲醇钠溶液。

2 在含有两个以上双键的脂肪酸存在时,建议导入氮气(4.2.2.6)将甲醇溶液里和烧瓶中的空气排掉。皂化时从冷凝器顶部持续通入氮气。

煮沸溶液至变清,一般 15 min 内反应完全(见附录 A 中 A7)。向烧瓶中至少加入 50 mL 盐酸甲醇溶液(4.2.2.2)。

注:由于溶液中的甲醇钠含量相当高,会出现氯化钠沉淀,继续煮沸时会导致过热(“暴沸”),所以可将沉淀物滤去。

但由于上述煮沸时间不长,故一般不需过滤。

4.2.5.2.2 脂肪酸

将试样置于烧瓶(4.2.3.2)中,加入 50 mL 盐酸甲醇溶液(4.2.2.2)及沸石,装上冷凝器。

注:在含有两个以上双键的脂肪酸存在时,建议导入氮气(4.2.2.6)将甲醇溶液里和烧瓶中的空气排掉。在随后的煮沸过程中继续从冷凝器顶部通入氮气。

4.2.5.3 甲酯制备

煮沸 10 min 后,将烧瓶放在流水中冷却加入 100 mL 蒸馏水,然后将溶液移入分液漏斗中,加入

30 mL 庚烷(4.2.2.3)(见附录 A 中 A4),用力振摇后静置至分层。收集庚烷层,用 30 mL 庚烷再次萃取水层,合并两次庚烷萃取物,并用每次 20 mL 的蒸馏水冲洗,直至用甲基红指示剂(4.2.2.5)检验不显酸性为止。用无水硫酸钠(4.2.2.4)将其干燥后经脱脂棉滤入 100 mL 锥形瓶中,并在氮气保护下,于沸水浴上(见附录 A 中 A8)将溶液蒸发至约 20 mL。

5 四碳或四碳以上脂肪酸甲酯的特殊制备方法

5.1 原理

甘油酯在氢氧化钾甲醇溶液中进行酯基转移反应。

5.2 试剂

所有试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

5.2.1 氢氧化钾甲醇溶液:约 2 mol/L。

将 11.2 g 氢氧化钾溶于 100 mL 含水不超过 0.5%(m/m)的甲醇中。

5.2.2 庚烷(或己烷)(见附录 A 中 A3 和附录 A 中 A4)。

5.2.3 参比溶液 I

称取约 1 g(精确至 0.1 mg)甲基戊酸盐置于 50 mL 容量瓶中,用庚烷(5.2.2)稀释至刻度。

5.2.4 参比溶液 II

称取约 200 mg(精确至 0.1 mg)甲基戊酸盐置于 100 mL 容量瓶中,用庚烷(5.2.2)稀释至刻度。

5.3 仪器

5.3.1 试管:20 mL,具磨口玻璃塞。

5.3.2 容量瓶:50 mL、100 mL。

5.3.3 移液管:1 mL 或稍大。

5.3.4 量筒:10 mL。

5.4 试样制备

按 GB/T 15687 制备试样。

5.5 步骤

5.5.1 试样

称取 1 g 试样置于试管中,精确至 1 mg。

注:如果不需要测定丁酸含量,则试样不必称量至规定的精确度。

5.5.2 甲酯制备

用量筒量取 10 mL 庚烷(5.2.2)置于试管中。

如果要用气相色谱准确测定丁酸含量,也仅是在此种情况下,需使用参比溶液。若估计丁酸含量高于 1%(m/m),可用移液管吸取 1 mL 的参比溶液 I(5.2.3)置于试管中。若估计丁酸含量低于 1%(m/m),可吸取 1 mL 参比溶液 II(5.2.4)置于试管中。

加入 0.5 mL 氢氧化钾甲醇溶液(5.2.1)后,塞住试管摇匀,直至溶液变清,此过程约需 20 s。澄清之后,由于甘油的离析,溶液重新变混,甘油将迅速沉析。

分离出含有甲酯的上层溶液。

6 甲酯贮存

6.1 应尽快分析甲酯溶液。

必要时,可将含甲酯的庚烷溶液在惰性气体保护下贮存于冰箱中。较长时间贮存时,可以加入一定浓度而不影响以后分析的抗氧化剂防止甲酯的自动氧化。例如:0.05 g/L 的 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)溶液。

含丁酸的甲酯只能贮存于密封的安瓿里,而且必须采取特殊的防护措施,以避免灌装和密封安瓿期

间的蒸发损耗。

6.2 不含溶剂的干酯应立即分析。必要时,可用惰性气体封存于冰箱中保存 **24 h**,或在真空密封管内于冰箱中保存更长的时间。

附录 A

(标准的附录)

关于试剂和操作步骤的说明

A1 如果油脂中含有不皂化物而且数量较大,可能会影响以后的分析。

可用蒸馏水稀释皂化液,并用乙醚、己烷或石油醚萃取除去不皂化物,然后将溶液酸化并分离脂肪酸。按照 3.5.2.2 或 4.2.5.2.2 制备甲酯。

A2 如果必须制备三氟化硼甲醇溶液,可按下法进行。

将一个装有 1 L 甲醇溶液的 2 L 烧瓶称重,并置于冰水浴中冷却而且保持在冰水浴中,让钢瓶中的三氟化硼通过玻璃管导入甲醇液中,直至吸收 125 g 三氟化硼为止。操作应在通风罩内进行,在玻璃管浸入甲醇之前至移去为止,都应通以三氟化硼气体,以避免液体回流到气体减压系统。不能让气体从烧瓶中逸散得太快而产生白烟。该试剂如在冰箱内保存,可在 2 年内保持稳定。

A3 各种试剂和溶剂在进行气相色谱分析时不得产生干扰脂肪酸甲酯峰的峰。特别是三氟化硼甲醇溶液,可能在色谱图的 20~22 碳脂肪酸区域内产生额外峰。因此,每批新试剂或溶剂都应制备纯油酸的甲酯,并进行色谱分析。如有额外峰出现,则这批试剂应当舍弃。

A4 若试样中不含 20 碳或 20 碳以上脂肪酸,己烷可代替庚烷。

A5 如果要用内标以气相色谱法定量测定脂肪酸,则必须准确地称取(即精确到 1 mg)试样。

A6 如果建议的试样量不合适,可取 10 mg 或更少,所用试剂的量及容器的大小也要按比例缩减。

A7 当油样(如海狸油)可溶于甲醇时,将看不到油滴。因而澄清与否就不能做为判断反应完全的标志。

A8 如果溶剂蒸发时间太长或氮气流太足,则甲酯中最易挥发的成分可能会损失。

做红外光谱分析时,必须将溶剂尽可能除尽。但做气相色谱分析时,如果有八碳或更少碳的脂肪酸存在时,就不应将溶剂除去。
