

中华人民共和国国家标准

GB/T 21495—2008/ISO 7847:1987

动植物油脂 具有顺,顺 1,4-二烯结构的 多不饱和脂肪酸的测定

Animal and vegetable fats and oils—
Determination of polyunsaturated fatty acid
with a *cis,cis* 1,4-diene structure

(ISO 7847:1987, IDT)

2008-03-06 发布

2008-08-01 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 ISO 7847:1987《动植物油脂 具有顺,顺 1,4-二烯结构的多不饱和脂肪酸的测定》(英文版)。

为便于使用,本标准作了下列编辑性修改:

- a) 将“本国际标准”改为“本标准”;
- b) 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”;
- c) 删除国际标准的前言;
- d) 用符号“L”代替“l”表示“升”;
- e) 用 GB/T 15687 代替了 ISO 661。

本标准的附录 A 为规范性附录。

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。

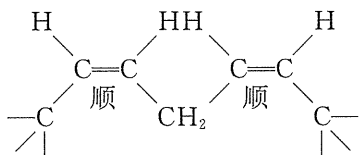
本标准起草单位:国家粮食局科学研究院。

本标准主要起草人:张蕊、薛雅琳、祖丽亚。

动植物油脂 具有顺,顺 1,4-二烯结构的 多不饱和脂肪酸的测定

1 范围

本标准规定了酶法测定动植物油脂中顺,顺 1,4-二烯结构多不饱和脂肪酸的方法,实际上就是指具有 $\omega 3$ 和 $\omega 6$ 型多不饱和结构的亚油酸(9,12-十八碳二烯酸)和亚麻酸(9,12,15-十八碳三烯酸)系列。其结构是:



本标准不适用于油脂中 $\omega 8$ 和 $\omega 9$ 型多不饱和脂肪酸及含有支链脂肪酸的测定。

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 15687 油脂试样制备(GB/T 15687—1995,eqv ISO 661:1989)

ISO 5555 动植物油脂 取样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

顺,顺 1,4-二烯脂肪酸 *cis,cis 1,4-diene fatty acids*

本标准规定的方法所测定的脂肪酸,以样品的质量分数表示。

4 原理

在室温条件下,样品皂化后产生脂肪酸,具有顺,顺 1,4-二烯结构的脂肪酸被酶促氧化,产生的氧化酸在最大吸收波长(约 235 nm)下测定吸光度,同时做样品空白试验,计算样品中多不饱和脂肪酸的含量。

5 试剂和材料

所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或同等纯度的水。

5.1 正己烷

5.2 盐酸溶液

$c(\text{HCl}) \approx 0.5 \text{ mol/L}$ 。

5.3 氢氧化钾-乙醇溶液 [$c(\text{KOH}) \approx 0.5 \text{ mol/L}$]

5.3.1 贮备液

称取 65 g 氢氧化钾(86%氢氧化钾)溶于约 80 mL 水中,冷却后稀释至 100 mL。

5.3.2 稀释液

吸取 5 mL 贮备液(5.3.1)用体积分数为 95% 的乙醇稀释至 100 mL。

此溶液应临用时现配。

5.4 硼酸钾缓冲液

$c(\text{K}_3\text{BO}_3) = 1.0 \text{ mol/L}$ ($\text{pH} = 9.0$)。

称取 61.9 g 硼酸和 25.0 g 氢氧化钾(86% 氢氧化钾) 加热搅拌溶于约 800 mL 水中, 冷却至室温, 测定 pH, 如有必要, 可用盐酸或氢氧化钾溶液调 pH 至 9.0, 然后用水稀释至 1 000 mL。

5.5 硼酸钾缓冲液

$c(\text{K}_3\text{BO}_3) = 0.2 \text{ mol/L}$ ($\text{pH} = 9.0$)。

将 200 mL 1.0 mol/L 的硼酸钾缓冲液(5.4)用水稀释至 1 000 mL, 用冰冷却。

5.6 脂肪氧化酶稀释液

5.6.1 脂肪氧化酶

酶的活力至少为 50 000 U/mg [一个酶的活力单位(U) 定义为实验条件下, 每分钟可氧化 $1.2 \times 10^{-4} \mu\text{mol}$ 亚油酸所需的酶量]。

在冻干状态下, 于 -18°C 或更低的温度保存时, 该酶在数年内均是稳定的。

注: 低活力的酶制剂会导致结果偏低, 过高活力的酶制剂不会比活力在 50 000 U/mg ~ 100 000 U/mg 范围内的酶制剂得到更好的结果。

5.6.2 贮备液

称取相当于 650 000 U 酶活的酶(5.6.1)溶于 10 mL 冰冷的 0.2 mol/L 硼酸钾缓冲液(5.5)中。

该贮备液在 -18°C 或更低的温度下可以长期保存。

5.6.3 工作液

将 2 mL 贮备液(5.6.2)和 8 mL 冰冷的 0.2 mol/L 硼酸钾缓冲液(5.5)混合。

5.7 脂肪氧化酶灭活液

吸取数毫升脂肪氧化酶稀释液(5.6)至试管中, 并保证无液滴粘附在试管壁上。将试管浸入沸水浴(6.6)中加热至少 5 min, 稀释液的液面应低于水浴的液面。

5.8 参比油

如葵花籽油或棉籽油, 已知多不饱和脂肪酸含量(用气相色谱法准确测得, 并以参比油的质量分数表示), 并假定其全为顺, 顺 1,4-二烯结构的脂肪酸。

注: 无位置异构和几何异构的甘油三亚油酸酯可作为参比。

5.9 氮气

纯度不低于 99.5% (质量分数)。

6 仪器

所用玻璃器皿应非常干净。

实验室常用仪器, 尤其是下列仪器。

6.1 具塞容量瓶: 100 mL。

6.2 单标移液管: 1 mL, 10 mL, 20 mL。

6.3 刻度移液管: 1 mL, 10 mL。

6.4 具塞试管: 10 mL, 干燥。可用具塞分光光度计比色杯(见 6.8)替代(见 9.6.2 的注 1)。

6.5 离心机: 10 mL 离心试管。

6.6 水浴: 沸腾。

6.7 水浴: 温度保持在 $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

6.8 分光光度计: 可于 235 nm 测量吸光度, 配有 10 mm 石英比色杯。

6.9 分析天平。

7 取样

按 ISO 5555 进行。

8 试样制备

按 GB/T 15687 进行。

9 分析步骤

9.1 验证实验

在分析试样时,建议与试样平行分析已知多不饱和脂肪酸(5.8)含量的参比油,以核对分析步骤。

9.2 试样

称取 50 mg~200 mg(取决于预期的多不饱和脂肪酸含量)试样(第 8 章),精确至 0.1 mg,于 100 mL 容量瓶 A(6.1)中。

注:当所取试样数量相当于 10 mg~80 mg 多不饱和脂肪酸时,所测之最大吸光度应在 0.07~0.5 之间。

9.3 皂化

用单标移液管(6.2)吸取 10 mL 氢氧化钾-乙醇溶液(5.3)至容量瓶 A,用氮气(5.9)置换容量瓶中的空气。加塞,放置暗处,皂化至少 4 h,间歇摇动容量瓶使内容物混匀。

如果样品的熔点高于室温,可将装有样品的容量瓶(加塞后)置于 $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的水浴(6.7)中加热数分钟,以加速皂化。

注:附录 A 中规定了一种特别适合于多样品重复性分析的替代皂化方法。

9.4 测试液的制备

皂化后,用适当的单标移液管(6.2)向容量瓶 A 中加入 20 mL 1.0 mol/L 硼酸钾缓冲液(5.4)和 10 mL 盐酸溶液(5.2)。加水稀释至刻度。加塞,轻轻来回颠倒容量瓶数次,尽量避免产生泡沫。如有必要,可于混合后重新定容到 100 mL。此阶段如有沉淀出现,可取数毫升混合液至离心试管中,离心分离除去沉淀。

用单标移液管(6.2)吸取容量瓶 A 中溶液 1 mL(或 1.0 mL 离心分离的上清液)至另一标为 B 的 100 mL 容量瓶(6.1)中,容量瓶 B 应事先用氮气(5.9)吹洗。如果预计试样中含有的多不饱和脂肪酸很少时,则应吸移 2 mL~4 mL 至容量瓶 B 中。

用单标移液管(6.2)吸取 20 mL 1.0 mol/L 硼酸钾缓冲液(5.4)至容量瓶 B,加水至刻度。加塞混匀,尽量避免产生泡沫(见注)。这个步骤中轻微的混浊不会干扰后续的测定。

注:皂化后,得到皂的稀释液。在容量瓶 A 中皂的浓度约为 1 mg/mL,容量瓶 B 中皂的浓度约为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。泡沫中皂的浓度要高于溶液本体中皂的浓度。当将溶液从一个容量瓶中转移到另一个容量瓶中时,如有泡沫粘附在移液管上,可能导致转移了未知过量的脂肪酸。

9.5 比对实验

测定(9.7)同时进行比对实验。采用同样分析步骤,但以 0.1 mL 脂肪氧化酶灭活液(5.7)代替脂肪氧化酶稀释液(5.6)来制备样品补偿溶液。

9.6 标准工作曲线

9.6.1 制备标准溶液

称取相当于含约 100 mg 多不饱和脂肪酸的参比油于 100 mL 容量瓶(6.1)中,精确至 0.1 mg。按照 9.3 及 9.4 的第一小节进行皂化并稀释至刻度。

用单标移液管(6.2)吸取 10 mL 上述溶液至第二个 100 mL 容量瓶(6.1)中,用刻度移液管(6.3)加入 18 mL 1.0 mol/L 硼酸钾缓冲液(5.4),用水稀释至刻度。

用刻度移液管(6.3)从第二个容量瓶中依次吸取 1 mL,2 mL,4 mL,6 mL,8 mL 和 10 mL 溶液,分

别置于 6 个 100 mL 容量瓶(6.1)中,均用 0.2 mol/L 硼酸钾缓冲液(5.5)稀释至刻度。

9.6.2 酶促氧化

用 1 mL 刻度移液管(6.3)分别吸取 0.1 mL 脂肪氧化酶稀释液(5.6)置于 6 支试管(6.4)中(见注 1)。在每支试管中分别添加 3 mL 相应的标准溶液(每支试管一个稀释度),轻轻震荡使溶液混匀(见注 2)。

将试管静置 20 min~30 min。

注 1: 氧化过程可在具塞分光光度计比色杯(见 6.8)中进行,以免在测量吸光度前再将溶液转移到比色杯中。

注 2: 试管中样品的处理很重要。将内容物初次混合后,不要再进一步混合。进一步混合将导致标准溶液、样品补偿溶液及测试溶液的吸光度增加。此外如果比色杯中溶液一旦被倒掉,并装入其他溶液,则不能核对该测量值是否正确。溶液处理过程中造成吸光度增加的原因尚无法解释。因此每个实验室要确保分析步骤一致。

9.6.3 分光光度计测量

将每个试管中的内容物转移到石英比色杯(见 6.8)中。使用分光光度计(6.8),于最大吸光波长(约 235 nm)下测量每个标准溶液的吸光度,以样品补偿溶液(见 9.5)调节仪器零点。取每个标准溶液两个吸光度读数的平均值。

9.6.4 绘制标准曲线

以吸光度的平均值对由已知组成的参比油计算所得多不饱和脂肪酸的质量作图。

绘出一条通过所有作图点的直线,该直线应通过原点。

9.7 测定

9.7.1 酶促氧化

用 1 mL 移液管(6.3)吸移 0.1 mL 脂肪氧化酶稀释液(5.6)至试管(6.4)中(见 9.6.2 的注 1)。再从容量瓶 B 中吸取 3 mL 测试溶液(9.4)加至试管中,轻轻震荡使溶液混匀(见 9.6.2 的注 2)。

将试管静置 20 min~30 min。

9.7.2 分光光度计测定

将试管中的样品转移至石英比色杯(见 6.8)中,用分光光度计(6.8),于最大吸收波长(约 235 nm)下测量测试溶液的吸光度,用样品补偿溶液(见 9.5)调节仪器零点。取两个吸光度读数的平均值,从标准工作曲线(9.6.4)中读出脂肪酸的质量。

注: 以补偿溶液调节零点可以补偿由于样品中原有的共轭二烯酸产生的吸光度。样品补偿溶液的吸光度应以水为参比进行核对,如果与测试溶液相比,此值太高,将使精密度降低。

9.8 测定次数

同一个试样测定两次。

10 结果计算

10.1 计算方法

试样中多不饱和脂肪酸的含量(X),数值以质量分数(%)表示,按下列公式计算:

$$X = \frac{m_1}{Vm_0} \times 100$$

式中:

X——试样中多不饱和脂肪酸的含量,单位为克每百克(g/100 g);

m_0 ——试样的质量,单位为毫克(mg);

m_1 ——从标准工作曲线上读取的多不饱和脂肪酸的质量,单位为毫克(mg);

V——从容量瓶 A 中所吸取液体(通常为 1 mL)的毫升数值。

注: 按此法得到的结果是整个油脂中多不饱和脂肪酸的含量,而非油脂中脂肪酸总量中多不饱和脂肪酸的含量。

10.2 重复性

当多不饱和脂肪酸含量在 10%~70% (质量分数)范围内时,同一分析者,在同一个实验条件下,对

同一样品,快速连续进行两次独立测试,结果相差不能超过 3.5% (质量分数)。

11 试验报告

测定报告应详细说明使用的方法及测试结果,清楚标明结果的表示方法。应注明本标准中未规定的任何操作细节,或可选择的操作细节,及可能影响实验结果的任何意外情况的细节。

测定报告应包括完整识别样品所需的全部信息。

附 录 A
(规范性附录)
替代的皂化方法

用数毫升正己烷(5.1)溶解试样(9.2),用同样的溶剂稀释至刻度,并混匀。用单标移液管(6.2)吸取 1.0 mL 该溶液至已事先用氮气吹洗的 100 mL 容量瓶 B(6.1)中。如预期样品中多不饱和脂肪酸的含量很低,则吸取 2 mL~4 mL 溶液至容量瓶 B 中。在缓和的氮气流中使溶剂完全蒸发。

向容量瓶 B 内的无溶剂样品中加 2 mL 氢氧化钾-乙醇溶液(5.3),然后加塞。将容量瓶置于暗处,皂化至少 4 h,以后按 9.7 进行。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
动植物油脂

具有顺,顺 1,4-二烯结构的
多不饱和脂肪酸的测定

GB/T 21495—2008/ISO 7847:1987

*

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

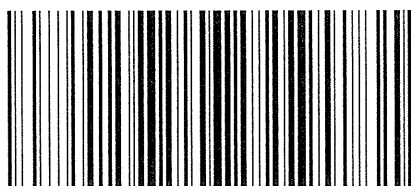
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2008 年 5 月第一版 2008 年 5 月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-31306 定价: 12.00 元



GB/T 21495-2008

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