

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

植物油中甘油三酯的测定 高效液相色谱法

Triglycerides in vegetable oils by HPLC

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

2020-12-3

- XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件等同采用美国油脂化学家学会（AOCS）的AOCS Official Method Ce 5b-89《植物油中甘油三酯的测定 高效液相色谱法》英文版。

本文件的内容和结构与AOCS Official Method Ce 5b-89一致，做了下列编辑性修改：

- “本方法”一词改为“本标准”；
- 将国际标准中的“.” 替代为句号“。”；
- 增加了术语和定义；
- 增加了实验用具；
- 增加了结果表示。

本文件由国家粮食和物资储备局提出。

本文件由全国粮油标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：国家粮食和物资储备局科学研究院。

本文件主要起草人：

植物油中甘油三酯的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了高效液相色谱法测定植物油中甘油三酯的术语和定义、原理、试剂、仪器和用具、操作步骤、结果表示和方法的精密度。

本文件适用于包含长链脂肪酸甘油三酯的所有植物油，特别适用于检验富含亚油酸的半干性植物油，如以油酸为主要不饱和脂肪酸的橄榄油、棕榈油和花生油。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

甘油三酯

由1个甘油骨架和3个相同或不同的脂肪酸组成，是植物油的主要组成部分。

4 原理

根据甘油三酯分子量和饱和度与等价碳原子数（ECN）的关系，采用高效液相色谱法分离和定量测定液体植物油中甘油三酯。

5 试剂

所有试剂均为色谱级，流动相使用前应脱气，且在不影响分离效果的情况下循环使用。

5.1 三氯甲烷、丙酮和乙腈。

警告：三氯甲烷为已知致癌物。吸入可引起中毒，有麻醉特性。勿与皮肤接触。长期吸入或摄入可引起肝、肾损伤，严重可导致死亡。三氯甲烷不易燃，但长期暴露在火焰或高温环境下可燃烧。空气中临界危害值为10ppm。使用时应在通风厨中进行。

警告：丙酮为易燃溶剂，不可在明火附近使用，建议在通风厨中使用。

警告：乙腈易燃，皮肤吸收和吸入可引起中毒，空气中临界危害值为40ppm，使用时应在通风厨中进行。

5.2 HPLC 流动相：乙腈和丙酮，调节至合适的比例以达到满意的分离效果，以 50:50 (v/v) 的比例开始调整；流动相应脱气，在不影响色谱分离的情况下可循环使用。

5.3 增溶溶剂：丙酮或丙酮-氯仿混合物 (1:1, v/v)。

5.4 甘油三酯对照品：使用商品甘油三酯，或使用大豆油甘油三酯图谱 (图 1, 2)。

5.5 甘油三酯对照品溶液：称取 $0.5\text{g}\pm 0.01\text{g}$ 甘油三酯对照品至 10mL 容量瓶中，以增溶溶剂定容至 10mL (试剂 5.3)。

6 仪器和用具

6.1 高效液相色谱仪

配有柱温箱；流动相应脱气；在不影响色谱分离的情况下流动相可循环使用。

进样装置：可输送 $10\mu\text{L}$ 样品的进样器。

检测器：示差折光检测器、紫外检测器或蒸发光散射检测器。

6.2 色谱工作站或积分仪。

6.3 色谱柱：不锈钢色谱柱，规格 (250mm×4.6mm, $5\mu\text{m}$)，硅胶填料，载碳量 22-23%，以十八烷基二甲基硅形式。

6.4 容量瓶：10mL、25mL。

7 操作步骤

7.1 优化工作参数：打开泵使流动相 (试剂 5.2) 以 $1.5\text{mL}/\text{min}$ 流速流经色谱柱至少 30min，以得到稳定基线；调节流动相的相对比例及流速使甘油三酯各色谱峰按其 ECN 有效分离 (图 1)。

7.2 测试样品溶液的准备：称取 $0.5\text{g}\pm 0.01\text{g}$ 样品至 10mL 容量瓶中，以增溶溶剂 (试剂 5.3) 定容至 10mL。进样 $10\mu\text{L}$ 该溶液。确定各甘油三酯色谱峰 (操作步骤 7.3)，记录甘油三酯和溶剂的保留时间，记录各甘油三酯峰面积。

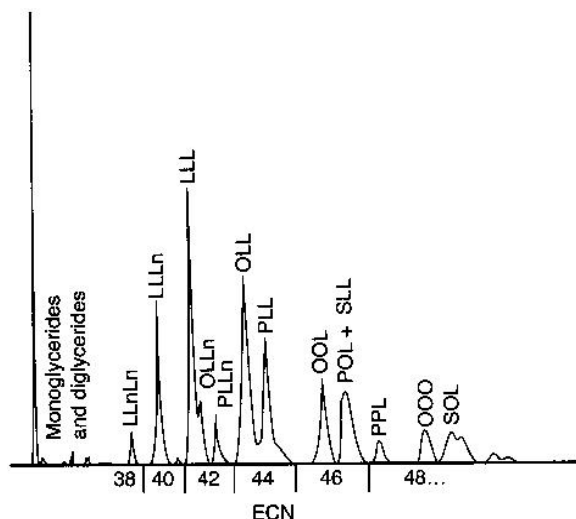


图1 大豆油样品色谱图。

注1：其中：O，油酸；P，棕榈酸；L，亚油酸；Ln，亚麻酸；OOO，三油酸甘油酯；LLL，三亚油酸甘油酯

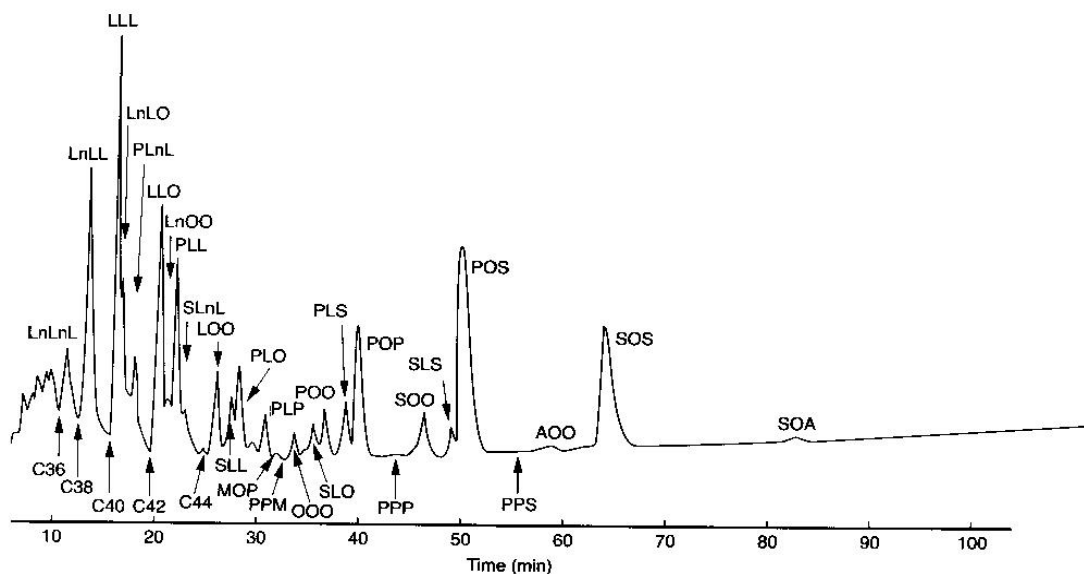


图2 采用紫外检测器的甘油三酯色谱图。

注1: 两根 Spherisorb S30DS-2 色谱柱 (150×4.5 mm) 串联, 流动相乙腈/四氢呋喃 (68/32), 流速 0.8mL/min, 进样量 10 μ L (样品溶解于四氢呋喃中, 浓度为 5%)。

注2: 缩写: M, 豆蔻酸 C14; P, 棕榈酸 C16; S, 硬脂酸 C18; O, 油酸 C18:1; L, 亚油酸 C18:2; Ln, 亚麻酸 C18:3; A, 花生酸 C20

7.3 甘油三酯色谱峰的确定: 采用与分析样品溶液相同的条件分析甘油三酯对照品溶液 (试剂 5.4), 进样量 10 μ L (操作步骤 7.2), 记录样品色谱峰保留时间和峰面积 (操作步骤 7.2)。如果可能的情况下, 通过与已知甘油三酯组成的植物油色谱峰或对照品甘油三酯比较确定样品中各甘油三酯色谱峰。

剩余甘油三酯的确定通过:

(a) 通过以下公式计算甘油三酯*i*的相对保留时间 (α_i)

$$\alpha_i = \frac{RT'_i}{RT_{\text{三油酸甘油酯}}}$$

式中:

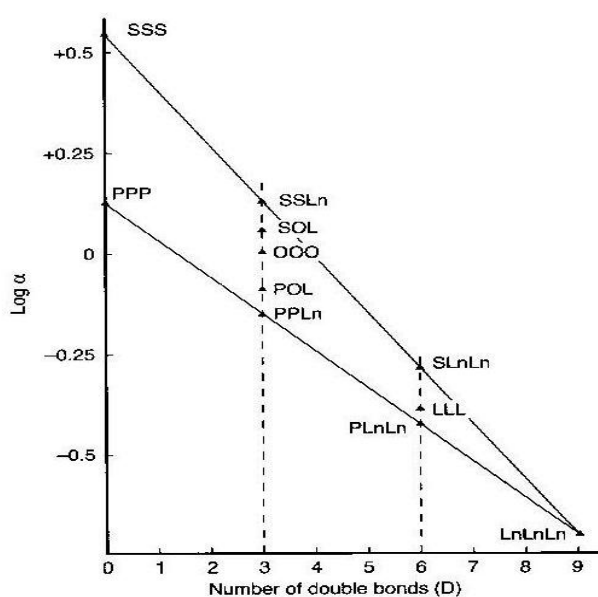
RT'*i*——甘油三酯*i*扣除死时间后的保留时间;

RT'三油酸甘油酯——和三油酸甘油酯扣除死时间后的保留时间。

$$RT'_i \text{ 或 三油酸甘油酯} = RT_i \text{ 或 三油酸甘油酯} - RT_{\text{溶剂}}$$

(b) 以甘油三酯对照品的 log α 和双键数量 (n) 做图。通过图可得到样品中所有甘油三酯的相对保留时间, 而构成这些甘油三酯的脂肪酸都应存在于甘油三酯对照品中 (图3)。

由确定的所有甘油三酯色谱峰计算各甘油三酯 ECN 数。在色谱图上, 根据图1样品所示 ECN 数将甘油三酯分组。

图3 $\log \alpha=f(n)$ 图。缩写见图1标题

8 计算

采用归一化法，即假设所有甘油三酯峰面积总和相当于100%。具有相同ECN数甘油三酯的相对百分含量（ T_i ）可通过下式计算得出：

$$T_i = \frac{i_{ECN} \text{峰面积}}{\text{所有甘油三酯峰面积总和}} \times 100$$

式中：

i_{ECN} ——相同ECN数的甘油三酯；

结果保留一位小数。

9 紫外检测器的操作步骤

9.1 试剂

9.1.1 乙腈，色谱级。

9.1.2 四氢呋喃，色谱级。

警告：四氢呋喃为易燃溶剂，空气中浓度达到2-11%，可引起燃烧。吸入或摄入可引起中毒，空气中临界危害值为200ppm。

9.2 仪器和用具

9.2.1 高效液相色谱仪：同6.1。

9.2.2 色谱柱：两根规格为150mm×4.6 mm i.d. 的 Spherisorb S30DS-2 色谱柱串联（Phase Separations Ltd.），该色谱柱填充3- μ m C18 键合硅胶颗粒。色谱柱柱温应恒定在20℃±0.05℃。

9.2.3 检测器：紫外检测器，检测波长为220nm（图2和参考文献3）。

9.2.4 流动相：乙腈和四氢呋喃（73:27，v/v）。将流动相置于功率为10瓦的超声水浴中脱气，且分析过程中流动相应连续脱气；流速1.0mL/min。

9.3 操作步骤

9.3.1 仪器优化同7.1

9.3.2 溶液的制备：准确称取40–60mg（2–3滴）溶解后的样品于小的玻璃容器中，如果必要，轻微加热玻璃容器已使样品溶解。用移液器加入四氢呋喃配制成约5%浓度的样品溶液。为防止颗粒物污染色谱柱，样品溶液应经0.45μm过滤膜过滤。

9.3.3 甘油三酯色谱峰的确定同7.3。

10 计算

采用归一化法，即假设所有甘油三酯峰面积总和相当于100%。计算每种甘油三酯的相对百分含量，结果保留小数点后一位：

$$\text{甘油三酯}\% = \frac{\text{峰面积}}{\text{所有甘油三酯峰面积总和}} \times 100$$

11 蒸发光散射检测器的操作步骤

11.1 试剂

11.1.1 乙腈，色谱级

11.1.2 异丙醇，色谱级。

警告：乙腈易燃，皮肤吸收和吸入可引起中毒，空气中临界危害值为40ppm，使用时应在通风厨中进行。

警告：异丙醇为易燃溶剂，不可在明火附近使用，建议在通风厨中使用。9.2 仪器和用具

11.1.3 高效液相色谱仪：同6.1。

11.1.4 色谱柱：同6.3。色谱柱柱温应恒定在45°C±0.05°C。

11.1.5 检测器：蒸发光散射检测器，漂移管温度80°C，N₂压力40psi，增益80–135。（缺少图和参考文献）

11.1.6 流动相：A相为异丙醇，B相为乙腈；洗脱条件：0~14min，20%A；14~35min，20~70%A；35~45min，20%A；流速为1.2mL/min；进样量5μL或10μL。

11.2 操作步骤

11.2.1 仪器优化同7.1

11.2.2 溶液的制备同7.2。

11.2.3 甘油三酯色谱峰的确定同7.3。

12 计算

采用归一化法，即假设所有甘油三酯峰面积总和相当于100%。计算每种甘油三酯的相对百分含量，结果保留小数点后一位：

$$\text{甘油三酯}\% = \frac{\text{峰面积}}{\text{所有甘油三酯峰面积总和}} \times 100$$

13 精密度

13.1 重复性：在同一实验室，有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获得的两次独立测定结果的绝对差值不应大于表 1 和表 2 给出的重复性限值 r 。

13.2 再现性：在不同实验室，由不同的操作者使用不同的设备，按相同的测试方法，并对同一被测对象获得的两次独立测定结果的绝对差值不应大于表 1 和表 2 给出的再现性限值 R 。

13.3 实验室间测试结果：1987-1988 年国际纯粹和应用化学会（IUPAC）油脂及衍生物分会组织了两次实验室间测试（分别有 18 和 16 个实验室参与，每个样品均有两个测试结果），统计结果（根据国际标准方法 ISO-5725）见表 1 和表 2，RSD r 和 RSD R 见表 3。

表1 样品 C（葵花籽油）的统计分析结果

甘油三酯分组, ECN	40	42	44	46	48	50
参加实验室数量	18	18	18	18	18	18
结果数量	36	36	36	36	36	34
接受的实验室数量 ^a	16	17	16	14	17	16
接受的结果数量	32	34	32	28	34	32
平均值, %m/m	0.3	29.4	38.4	22.5	8.2	1.3
重复性						
标准偏差 (S r)	0.1	0.5	0.4	0.4	0.9	0.5
变异系数 (RSD r), %	21.4	1.8	1.2	1.6	10.7	37.0
重复性限值 (r)	0.2	1.5	1.3	1.0	2.5	1.4
再现性						
标准偏差 (S R)	0.2	0.95	1.3	0.55	1.0	1.2
变异系数 (RSD R), %	70.4	3.2	3.4	2.4	11.7	92.6
再现性限值 (R)	0.6	2.7	3.65	1.55	2.7	3.4

注：数据剔除依据Cochran和Dixon检验。

表2 样品 B（橄榄油）的统计分析结果

甘油三酯分组, ECN	42	44	46	48	50
参加实验室数量	16	16	16	16	16
结果数量	31	31	31	31	31
接受的实验室数量 ^a	12	13	14	14	14
接受的结果数量	24	26	28	28	28
平均值, %m/m	0.6	5.85	21.2	64.7	7.15
重复性					
标准偏差 (S r)	0.09	0.09	0.28	0.52	0.26

变异系数 (RSDr), %	16.2	1.5	1.3	0.8	3.6
重复性限值 (r)	0.26	0.25	0.78	1.49	0.74
再现性					
标准偏差 (SR)	0.12	0.18	0.34	1.01	0.61
变异系数 (RSDR), %	21.1	3.0	1.6	1.6	8.5
再现性限值 (R)	0.34	0.50	0.95	2.85	1.73

表3 其它品种植物油的 RSDr (%) 和 RSDR (%) 值

测试样品		ECN					
		40	42	44	46	48	50
大豆油	\bar{x} , %	8.2	25.5	31.0	21.6	10.7	1.5
	RSDr, %	3.4	1.8	1.3	3.5	7.3	14.5
	RSDR, %	6.7	3.5	3.9	4.3	9.5	71.7
杏仁油	\bar{x} , %	0.1	2.2	13.0	30.7	50.4	4.4
	RSDr, %	-	18.8	4.4	1.7	1.6	5.4
	RSDR, %	-	27.8	6.9	2.3	2.7	9.1
菜籽油	\bar{x} , %	3.1	9.8	22.9	28.7	31.2	3.0
	RSDr, %	5.3	1.8	0.7	1.7	1.7	13.2
	RSDR, %	8.5	2.3	2.8	2.4	2.5	40.8
棕榈油	\bar{x} , %	-	-	3.3	22.1	64.7	9.4
	RSDr, %	-	-	8.1	2.3	1.2	9.6
	RSDR, %	-	-	16.2	2.8	2.3	9.6

注3: 通过计算等价碳原子数 (ECN) 可确定甘油三酯流出顺序, 等价碳原子数通常表示为 $ECN=CN-2n$, 其中 CN 表示碳原子数, n 表示双键数。如果 n_b , n_m 和 n_n 分别表示油酸、亚油酸和亚麻酸的双键数, 等价碳原子数可以以下公式计算得出:

$$ECN=CN-d_b n_b-d_m n_m-d_n n_n$$

式中: 因子 d_b , d_m 和 d_n 可通过标准甘油三酯对照品计算得出。在本方法给定的条件下, 上式可近似为:

$$ECN=CN-[2.60n_b]-[2.35n_m]-[2.17n_n]$$

注4: 色谱柱, 例如: Lichrosorb (Merk) RP18 Art 50333; Lichrosphere (Merk) 100CH18 Art 50377。

注5: 利用甘油三酯对照品 (i), 可计算得出分辨率 α :

$$\alpha_i=RT'_i/RT'_{\text{triolein}}$$

扣除死时间后的保留时间 RT'_i

$$RT'_i=RT_i-RT_{\text{solvent}}$$

注6: $\log \alpha$ 对 n (双键数) 做图, 通过图可得到样品中所有甘油三酯的相对保留时间, 而构成这些甘油三酯的脂肪酸都应存在于甘油三酯对照品中 (图 3)。

注7: 采用紫外检测器的操作步骤不包含在 IUPAC 方法 2.324 内容中。

参考文献

- 1.AOCS Official Method Ce 5b-89 was adopted from *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th edn., Blackwell Scientific Publications,1987, IUPAC Method 2.324.
 - 2.Perrin and Naudet, *Rev. Fr. Corps Gras*30:279(1983).
 - 3.Inclusion of UV detector option based on method developed by Dr. V. K. S. Shukla.
 - 4.Collaborative study results published in *Pure Appl. Chem.* 63:173(1991).
-