

GB/T 17376—2008/ISO 5509:2000
代替 GB/T 17376—1998

动植物油脂 脂肪酸甲酯制备

Animal and vegetable fats and oils—
Preparation of methyl esters of fatty acids

前 言

本标准等同采用 ISO 5509:2000《动植物油脂 脂肪酸甲酯制备》(英文版)。

为便于使用,本标准对 ISO 5509:2000 进行了下列编辑性修改:

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

本标准是对 GB/T 17376—1998《动植物油脂 脂肪酸甲酯制备》的修订。

本标准与 GB/T 17376—1998 的主要差异如下:

- 用异辛烷(色谱纯)代替庚烷试剂;
- 用三甲基氢氧化硫(TMSH)法代替原标准中的“不用三氟化硼的替代方法”;
- 用酯交换法代替原标准中的“四碳或四碳以上脂肪酸甲酯的特殊制备方法”;
- 将各方法中常用到的一些主要分析程序及原标准的第 6 章内容放在附录 A 中;
- 增加了资料性附录 B。

本标准自实施之日起代替 GB/T 17376—1998。

本标准中附录 A 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

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。

本标准负责起草单位:国家粮食储备局西安油脂科学研究设计院。

本标准参与起草单位:陕西省产品质量监督检验所、安徽大平工贸(集团)有限公司。

本标准起草人:孟橘、夏天文、陈勇、王慧芳、朱文鑫、任春明。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

动植物油脂 脂肪酸甲酯制备

1 范围

本标准规定了脂肪酸甲酯的制备方法。

本标准包括了从动植物油脂、脂肪酸及脂肪酸盐制备脂肪酸甲酯的方法。规定了以下三种甲酯化方法：

a) 三氟化硼法(见第 3 章)：

c) 酯交换法(见第 5 章)。

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 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并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。

3.3.3 三氟化硼甲醇溶液:质量分数 12%~15%¹⁾(见附录 A 的第 A.1 章)。

3.3.4 异辛烷(2,2,4-三甲基戊烷):色谱纯(见附录 A 的第 A.2 章)。

警告:异辛烷易燃易爆,在空气中的爆炸极限为 1.1%~6.0%(体积分数)。异辛烷有毒,不要误食或吸入,操作应当在通风橱中进行。

3.3.5 氯化钠:饱和水溶液。

3.3.6 无水硫酸钠。

3.3.7 氮气:含氧量低于 5 mg/kg。

3.3.8 己烷:色谱纯,仅用于干酯制备。也可用石油醚:沸程 40 °C~60 °C,溴值低于 1,无残渣(见附录 A 的第 A.2 章)。

3.4 仪器

实验室常用仪器,以及下列仪器:

3.4.1 磨口烧瓶:50 mL 或 100 mL,具塞。

3.4.2 回流冷凝器:有效长度 200 mm~300 mm,具有与磨口烧瓶(3.4.1)配合的磨口接头。

3.4.3 沸石:脱脂。

3.4.4 移液管或自动加液器:至少 10 mL。

3.4.5 玻璃瓶:具螺旋盖,容量至少 4 mL。

3.4.6 分液漏斗:250 mL,用于干脂制备。

3.4.7 旋转蒸发器。

3.4.8 分析天平:分度值为 0.001 g。

3.5 试样制备

试样应为液体且无水、透明,按照 GB/T 15687 制备试样。如需加热样品,则采用刚好高于熔点的温度。

3.6 操作步骤

警告:三氟化硼有毒,以下操作需在通风橱里进行,玻璃器具用后,应立即用水冲洗。

3.6.1 试样

根据所需样品试样量,按表 1 选择合适的烧瓶及适量的试剂和溶液。

表 1 试样称取量

分析方法	试样质量/ mg	烧瓶 (3.4.1)/ mL	氢氧化钠甲醇 溶液 (3.3.2)/ mL	三氟化硼甲醇 溶液 (3.3.3)/ mL	溶剂 (3.3.4)或 (3.3.8)/ mL
GLC (气液色谱)	100~250	50	4	5	1~3
	250~500	50	6	7	2~5
IR/TLC (红外光谱分析)	500~750	100	8	9	4~8

及沸石(3.4.3),然后接上冷凝器(3.4.2)。

如果存在两个以上双键的脂肪酸,在回流前,迅速向烧瓶中导入几分钟干燥氮气(3.3.7)将空气排掉。

在水浴上回流直至油滴消失,每30 s~60 s缓慢摇动烧瓶,以防止氢氧化钠形成固态附着在瓶壁上。

液管从冷凝器顶部加入适量(见表1)的三氟化硼甲醇溶液(3.3.3)于沸腾的溶液里。

接下来按照3.6.3或3.6.4步骤执行。

3.6.2.3 将试样置于合适的烧瓶中(见表1),加入适量(见表1)的三氟化硼甲醇溶液(3.3.3),然后接冷凝器(3.4.2)。

接下来按照3.6.3或3.6.4步骤执行。

3.6.3 甲酯溶液制备(主要用于气液色谱分析)

3.6.3.1 继续煮沸3 min。对于含长链脂肪酸的油脂,如鱼油,继续煮沸30 min。

3.6.3.2 从冷凝器顶部加入适量的异辛烷(3.3.4)于沸腾的混合溶液里。

3.6.3.3 取下冷凝器,拿出烧瓶。立即加入20 mL氯化钠溶液(3.3.5)。塞住烧瓶,猛烈振摇至少15 s。

3.6.3.4 继续加入氯化钠溶液(3.3.5)至烧瓶颈部,静置分层。

3.6.3.5 吸取1 mL~2 mL上层异辛烷溶液于玻璃瓶(3.4.5)中,加入适量无水硫酸钠(3.3.6)去除溶液中痕量的水,并按照以下几种方式注入气相色谱仪:

- a) 直接注入填充柱(见附录A的第A.5章);
- b) 先用异辛烷适度稀释再注入毛细管柱(见附录A的第A.6章);
- c) 对于毛细管柱,特殊情况可使用沸点更低的庚烷稀释。

3.6.4 干甲酯制备(用于薄层色谱或红外光谱分析)

3.6.4.1 继续煮沸3 min。

有乳脂的混合物,未发现有不饱和脂肪酸的异构化。

本法适用于含有 2.2 中所列化学基团的物质,但不能肯定甲酯化是否完全,游离脂肪酸只有

70%~80%被甲酯化。

含有羟基的脂类会部分生成相应的邻甲基醚衍生物,这可能会干扰甲酯的气液色谱分离。因此如

气液色谱分析时,柱温低则该方法不适用。另外,该方法不推荐使用极性固定相。

A.2章和附录A的第A.7章)。如果需要稀释,使用甲基叔丁醚(4.3.1)和甲醇混合液(9+1),以避免三甲基氢氧化硫(TMSH)析出。

5 酯交换法

警示: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,并避免腐蚀性化学物品灼伤的危险。氢氧化钾溶液有毒。

5.1 原理

将油脂溶解在异辛烷中,加入氢氧化钾溶液通过酯交换甲酯化,反应完全后,用硫酸氢钠中和剩余氢氧化钾,以避免甲酯皂化。

5.2 范围

本快速方法适用于四碳或四碳以上,游离脂肪酸(FFA)含量不大于2%的食用油脂,也适用于用内标-气相色谱法测定丁酸或己酸。

样品中如游离脂肪酸含量较高,应过量使用氢氧化钾溶液。由于游离脂肪酸及其盐不被氢氧化钾

酯化,所以本方法只能使样品中甘油酯部分生成甲酯。

本方法也适用于含有3.2中所列化学基团的物质,但不能肯定甲酯化是否完全。

5.3 试剂

除有特殊说明,均为分析纯试剂。

5.3.1 氢氧化钾甲醇溶液:约2 mol/L。将13.1 g氢氧化钾溶于100 mL无水甲醇中,可轻微加热,加入无水硫酸钠干燥,过滤,即得澄清溶液。溶液储存一段时间后,可能会形成少量沉淀,用上清液测定不影响使用。

5.3.2 异辛烷(2,2,4-三甲基戊烷):色谱纯,见附录A的第A.2章。

5.3.3 硫酸氢钠。

5.3.4 内标储备液:仅用于丁酸或己酸测定。称取大约250 mg(精确至0.1 mg)戊酸甲酯于50 mL容量瓶中,用异辛烷(5.3.2)溶解并稀释至刻度。

5.3.5 内标参比液:仅用于丁酸或己酸测定。取10 mL储备液(5.3.4)于100 mL容量瓶中,用异辛烷

5.6.2.3 向溶液中加入约 1 g 硫酸氢钠(5.3.3),猛烈振摇,中和氢氧化钾。

5.6.2.4 待盐沉淀后,将含有甲酯的上层溶液倒入 4 mL 玻璃瓶(5.4.4)中,得到的异辛烷溶液中甲酯含量约为 15 mg/mL,并按照以下几种方式注入气相色谱仪:

- a) 直接取一定量注入填充柱(见附录 A 的第 A.5 章);
- b) 先用异辛烷适度稀释再注入毛细管柱(见附录 A 的第 A.6 章);
- c) 对于毛细管柱,特殊情况可使用沸点更低的庚烷稀释。

6 精密度

附录 B 中给出了国际实验室间对 3 种甲酯化法的比对测试数据,因为甲酯制备过程、色谱柱的选择、气相色谱条件及气相色谱仪器对重复性值和再现性值有影响,所以重复性值和再现性值并未计算出。

附录 A
(规范性附录)
主要的分析程序

A.1 三氟化硼的制备

如果必须制备三氟化硼甲醇溶液,过程如下:

警告:操作在通风橱中进行。

在 2 L 烧瓶中加入 1 L 甲醇溶液,称取质量后放在冰水浴中冷却。保持烧瓶在冰水浴中,让钢瓶中的三氟化硼通过玻璃管导入甲醇溶液中。为避免液体回流到气体系统,在玻璃管浸入甲醇溶液之前至移去为止,都应通以三氟化硼气体。气体流速不能太大,不能产生白烟。

该试剂可在冰箱内保存 2 年。

A.2 试剂

各种试剂不能对气相色谱仪中的检测器造成任何干扰

为了防止堵塞,毛细管柱的分流口内径应较宽。如堵塞,可加热或用溶剂冲洗清洁。
如果用戊酸甲酯做内标物,可用甲基叔丁醚(0.5 mg/mL ~1.0 mg/mL)溶解。

A.8 甲酯的量

如果用内标-气液色谱法定量测定脂肪酸,必须精确称量试样的质量(精确到0.1 mg)。结果将以油脂脂肪酸组分占据油脂的质量分数表示,这与从内标归一化法获得的结果是不一致的。

附录 B

(资料性附录)

联合实验室的测试结果

1995 年开展了一项国际合作研究。在这次测试中,有 8 个实验室参与测定 8 份不同的游离脂肪酸样品。这个实验的目的是确定制备甲酯的 3 种方法对于品种不同和游离脂肪酸含量不同的油脂的适用性。表 B.1 至 B.8 列出了测试结果,包括各实验室所测主要脂肪酸的最小值、最大值、平均值及标准偏差。

表 B.1 精炼椰子油(游离脂肪酸含量 0.03%)

三氟化硼法(7 个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差

表 B.1 (续)

酯交换法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 6 : 0	0.5	0.7	0.6	0.1
C 8 : 0	6.5	9.3	7.4	0.6
C 10 : 0	5.4	7.1	5.9	0.3
C 12 : 0	45.8	52.0	46.8	0.7
C 14 : 0	16.7	18.6	18.0	0.4
C 16 : 0	6.6	9.5	9.1	0.3
C 18 : 0	1.7	3.0	2.8	0.2
C 18 : 1	4.7	8.0	7.5	0.3
C 18 : 2	1.1	2.2	1.9	0.1
C 20 : 0	0.0	0.1	0.1	0.0
C 20 : 1	0.0	0.1	0.0	0.0
总计	89.1	110.7	100.0	3.1

表 B.2 精炼大豆油(游离脂肪酸含量 0.06%)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 14 : 0	0.0	0.1	0.0	0.0
C 16 : 0	10.4	11.0	10.6	0.2
C 16 : 1	0.0	0.1	0.1	0.0
C 17 : 0	0.1	0.2	0.1	0.0
C 18 : 0	3.6	3.9	3.7	0.1
C 18 : 1	20.7	21.0	20.9	0.1
C 18 : 2	54.5	55.7	55.2	0.4
C 18 : 3	7.9	9.0	8.4	0.4

表 B.2 (续)

—

表 B.3 (续)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 18 : 1	0.1	0.8	0.5	0.3
C 18 : 2	0.0	0.2	0.1	0.1
C 20 : 0	0.6	0.7	0.6	0.0
C 22 : 0	0.3	0.4	0.3	0.1
C 24 : 0	0.0	0.1	0.1	0.1
总计	96.9	102.4	100.0	1.9
三甲基氢氧化硫(TMSH)法(6个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 8 : 0	0.3	0.9	0.6	0.2
C 10 : 0	0.4	0.6	0.5	0.1
C 12 : 0	5.2	7.0	5.7	0.7
C 14 : 0	3.1	3.3	3.2	0.1
C 16 : 0	47.8	50.1	49.2	0.8
C 17 : 0	0.0	1.0	0.3	0.4
C 18 : 0	37.5	39.2	38.3	0.7
C 18 : 1	0.2	1.0	0.7	0.3
C 18 : 2	0.0	0.9	0.3	0.4
C 20 : 0	0.5	0.7	0.6	0.1
C 22 : 0	0.3	0.7	0.4	0.2
C 24 : 0	0.0	0.1	0.0	0.0

表 B.4 植物原油(游离脂肪酸含量 6.4%)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 12:0	0.1	0.2	0.1	0.0
C 14:0	1.0	1.1	1.0	0.0
C 16:0	43.3	45.1	43.8	0.6
C 16:1	0.0	0.2	0.1	0.1
C 17:0	0.1	0.1	0.1	0.0
C 18:0	4.5	4.8	4.7	0.1
C 18:1	38.4	39.3	38.9	0.4
C 18:2	9.9	10.8	10.3	0.3
C 18:3	0.2	0.5	0.3	0.1
C 20:0	0.4	0.5	0.4	0.0
C 20:1	0.1	0.2	0.1	0.0

三甲基硅烷化法(TMSH)法(6个实验室)

表 B.4 (续)

酯交换法(8个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 17:0	0.0	0.2	0.1	0.1
C 18:0	4.4	4.9	4.7	0.2
C 18:1	38.3	39.6	39.1	0.5
C 18:2	9.9	10.8	10.3	0.3
C 18:3	0.0	0.5	0.4	0.0
C 20:0	0.3	0.5	0.4	0.0
C 20:1	0.0	0.2	0.1	0.0
C 22:0	0.0	0.1	0.0	0.0

表 B.5 未经加工的鱼油(游离脂肪酸含量 3.8%)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 12:0	0.0	1.0	0.2	0.4
C 14:0	7.0	8.7	7.9	0.6
C 14:1	0.0	0.5	0.4	0.2
C 15:0	0.0	0.5	0.4	0.2
C 16:0	15.9	20.4	18.2	1.6
C 16:1	8.2	9.7	8.9	0.5
C 16:2	0.0	2.1	0.8	1.1
C 16:3	0.0	1.7	0.7	0.9
C 16:4	0.0	2.6	1.0	1.3
C 17:0	0.0	1.6	0.8	0.6
C 17:1	0.0	1.6	0.3	0.6
C 18:0	3.3	6.0	4.1	0.9

表 B.5 (续)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 22:0	0.0	0.8	0.2	0.3
C 22:1	2.1	2.6	2.4	0.2
C 22:2	0.0	0.8	0.2	0.4
C 22:4	0.0	0.8	0.2	0.4
C 22:5	2.2	2.5	2.3	0.1
C 22:6	9.8	10.9	10.4	0.3
C 24:0	0.0	0.3	0.1	0.1
C 24:1	0.0	0.5	0.3	0.3
总计	80.8	123.0	100.0	16.1
三甲基氢氧化硫(TMSH)法(6个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 12:0	0.0	0.2	0.1	0.1
C 14:0	7.4	9.6	8.6	0.9
C 14:1	0.0	0.6	0.2	0.2
C 15:0	0.0	0.2	0.4	0.2
C 16:0	16.2	21.5	18.8	1.9
C 16:1	8.5	10.2	9.2	0.6
C 16:2	0.0	1.8	0.8	0.9
C 16:3	0.0	1.8	0.6	0.9
C 16:4	0.0	2.1	0.4	0.9
C 17:0	0.4	1.6	0.9	0.5
C 17:1	0.0	1.2	0.2	0.5
C 18:0	3.6	6.5	4.3	1.1
C 18:1	12.9	14.3	13.6	0.5
C 18:2	1.3	1.7	1.5	0.2
C 18:3	0.6	2.4	1.3	0.8
C 18:4	0.0	2.6	2.0	1.0
C 20:0	0.2	1.9	0.6	0.6
C 20:1	0.0	2.6	1.8	0.9
C 20:2	0.0	0.8	0.2	0.3
C 20:3	0.0	0.8	0.2	0.3

表 B.5 (续)

三甲基氢氧化硫(TMSH)法(6个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 22 : 1	0.0	3.0	1.9	1.1
C 22 : 2	0.0	2.3	0.7	0.9
C 22 : 4	0.0	0.3	0.1	0.1
C 22 : 5	1.9	2.6	2.3	0.3
C 22 : 6	8.9	11.1	9.9	0.9
C 24 : 0	0.0	0.3	0.1	0.1
C 24 : 1	0.0	0.9	0.2	0.4
总计	79.4	127.4	100.0	19.1
酯交换法(8个实验室)				
	最小值	最大值	平均值	标准偏差

酯交换法(8个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 22:2	0.0	2.3	0.5	0.8
C 22:4	0.0	0.8	0.3	0.4
C 22:5	1.9	2.6	2.3	0.2
C 22:6	8.9	15.3	10.7	1.9
C 24:0	0.0	0.3	0.0	0.1
C 24:1	0.0	0.8	0.2	0.3
总计	73.7	132.1	100.0	20.6

表 B.6 油和脂肪酸混合物(游离脂肪酸含量 70%)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 6:0	0.2	0.4	0.3	0.1
C 8:0	3.0	3.8	3.5	0.3
C 10:0	2.9	3.3	3.1	0.1
C 12:0	27.3	30.7	28.3	1.2
C 14:0	10.1	11.1	10.5	0.3
C 16:0	20.2	21.3	20.8	0.4
C 16:1	0.0	0.4	0.3	0.1
C 18:0	4.9	5.6	5.3	0.2
C 18:1	18.6	21.1	20.2	0.9
C 18:2	5.9	7.0	6.4	0.4
C 18:3	0.2	0.3	0.2	0.0
C 20:0	0.3	0.4	0.3	0.1
C 20:1	0.2	0.5	0.3	0.1
C 22:0	0.0	0.4	0.2	0.1
C 22:1	0.0	0.4	0.2	0.1
总计	93.9	106.7	100.0	4.6

三甲基氢氧化硫(TMSH)法(5个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 6:0	0.0	0.6	0.5	0.1
C 8:0	0.3	4.8	4.4	0.4
C 10:0	2.1	3.7	3.5	0.2
C 12:0	10.0	30.2	29.0	0.9
C 14:0	7.7	10.6	10.1	0.4
C 16:0	19.8	26.4	20.5	0.6

表 B.6 (续)

三甲基氢氧化硫(TMSH)法(5个实验室)				
吡啶甲酸酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差

表 B.7 (续)

三甲基氢氧化硫(TMSH)法(6个实验室)

表 B.8 可可黄油和奶油混合物(9:1)

三氟化硼法(7个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 4:0	0.0	0.2	0.1	0.1
C 6:0	0.1	0.2	0.2	0.1
C 8:0	0.1	0.1	0.1	0.0
C 10:0	0.2	0.3	0.2	0.1
C 12:0	0.3	0.4	0.3	0.0
C 14:0	1.1	1.6	1.2	0.2
	0.0	0.1	0.1	0.0

表 B.8 (续)

三甲基氢氧化硫(TMSH)法(6个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 18 : 2	2.8	5.3	3.5	1.0
C 18 : 3	0.2	0.5	0.3	0.1
C 20 : 0	0.9	1.3	1.0	0.2
C 20 : 1	0.0	0.1	0.1	0.1
C 22 : 0	0.0	0.3	0.2	0.1
总计	92.3	107.6	100.0	5.8
酯交换法(8个实验室)				
脂肪酸甲酯	最小值	最大值	平均值	标准偏差
C 4 : 0	0.0	0.4	0.2	0.2
C 6 : 0	0.1	0.3	0.2	0.1
C 8 : 0	0.0	0.2	0.1	0.1
C 10 : 0	0.2	0.4	0.3	0.1
C 12 : 0	0.3	0.7	0.4	0.1
C 14 : 0	1.1	1.7	1.2	0.2
C 14 : 1	0.0	0.2	0.1	0.1
C 15 : 0	0.0	0.2	0.1	0.1
C 16 : 0	25.5	27.9	26.4	0.8
C 16 : 1	0.3	0.7	0.4	0.1
C 17 : 0	0.0	0.4	0.3	0.1
C 18 : 0	31.4	33.8	32.9	0.8
C 18 : 1	32.4	33.5	33.2	0.4
C 18 : 2	2.7	3.6	2.9	0.3
C 18 : 3	0.0	0.3	0.2	0.1
C 20 : 0	0.0	1.1	0.8	0.3
C 20 : 1	0.0	0.1	0.0	0.0
C 22 : 0	0.0	0.7	0.2	0.2
总计	93.9	106.4	100.0	4.2

参 考 文 献

- [1] Bannon, Craske *et al.* 1985. *J. Am. Oil Chem. Soc.* ,62:150.
 - [2] Bannon, Craske *et al.* 1987. *J. Am. Oil Chem. Soc.* ,64:1413.
 - [3] Schulte and Weber. 1989. *Fat Sci. Technol.* ,91:181.
-