



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—202X

特级初榨橄榄油中脂肪酸乙酯含量的测定 气相色谱-质谱法

Determination of the content of fatty acid ethyl esters in extra virgin
olive oil by gas chromatography-mass spectrometry

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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（SAC/TC 270）归口。

本文件起草单位：南京海关动植物与食品检测中心，国家粮食和物资储备局标准质量中心，国家粮食和物资储备局科学研究院，浙江省农业科学院，上海安谱实验科技股份有限公司，南京理工大学化学与化工学院，中国科学院兰州化学物理研究所。

本文件主要起草人：沈伟健，陆慧媛，段章群，章虎，王利娟，张艳，王红，汤永兴，黄新异，张弛中，朱静怡，裴栋。

特级初榨橄榄油中脂肪酸乙酯含量的测定 气相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了脂肪酸乙酯含量的气相色谱-质谱联用测定方法。
本文件适用于特级初榨橄榄油中脂肪酸乙酯含量的测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

COI/T.20/Doc. no.28 Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography.

(EEC) No 2568/91 On the characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis.

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脂肪酸乙酯 fatty acid ethyl esters

榨取橄榄油过程中，不当操作会导致油橄榄果发酵，发酵反应生成的乙醇与脂肪酸发生酯化反应，生成脂肪酸乙酯。此指标是特级初榨橄榄油的质量指标之一，可用于鉴别特级初榨橄榄油中是否掺入低等级的油（如初榨橄榄油、普通橄榄油、油橄榄灯油或某些脱臭的油类）。

4 方法提要

试样中脂肪酸乙酯用正己烷溶解，经硅胶固相萃取柱净化，气相色谱-质谱联用仪分析，内标法定量。

5 试剂和材料

实验用水应符合GB/T 6682中一级水的规定要求。

5.1 试剂

5.1.1 正己烷：色谱纯。

5.1.2 乙醚：色谱纯。

5.1.3 正庚烷：色谱纯。

5.2 溶液配制

正己烷-乙醚溶液（99+1，体积比）：量取 5 mL 乙醚与 495 mL 正己烷混合均匀后备用，现用现配。

5.3 标准物质

脂肪酸乙酯标准物质及内标物质的种类和化学信息参见附录 A 表 A.1, 纯度均大于等于 99.0 %, 或等同有证可溯源物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液

准确称取 4 种脂肪酸乙酯标准物质各 10 mg (精确到 0.01 mg) 于 10 mL 容量瓶中, 用正庚烷溶解并定容, 配制成 1.0 mg/mL 单种标准储备液。用玻璃移液管分别移取单标储备液各 0.5 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用正庚烷定容, 配制成 50 μ g/mL 混合标准溶液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 有效期 6 个月。

5.4.2 标准工作溶液

吸取 1 mL 50 μ g/mL 混合标准溶液至 10 mL 容量瓶中, 用正庚烷定容, 配制成 5 μ g/mL 混合标准中间液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 有效期 6 个月。吸取适量混合标准中间液, 用正己烷配制成浓度范围为 0.05 μ g/mL~0.8 μ g/mL 的系列标准工作溶液, 现用现配。

5.4.3 内标储备液

准确称取 2 种内标标准物质各 10 mg (精确到 0.01 mg) 于 10 mL 容量瓶中, 用正庚烷溶解并定容, 配制成 1.0 mg/mL 单种内标储备液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 有效期 6 个月。

5.4.4 内标工作溶液

用玻璃移液管分别移取 0.5 mL 1.0 mg/mL 的单种内标储备液至 10 mL 容量瓶中, 用正庚烷定容, 配制成 50 μ g/mL 混合内标中间液, 移取 1 mL 50 μ g/mL 的混合内标中间液至 10 mL 容量瓶中, 用正庚烷定容, 配制成 5 μ g/mL 混合内标工作液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 有效期 6 个月。

5.5 耗材

5.5.1 硅胶固相萃取柱: 规格为 1 g, 6 mL, 或相当者。

5.5.2 微孔滤膜: 0.45 μ m, 有机型。

5.5.3 色谱柱: 质谱专用石英毛细管柱, 30 m (长) \times 0.25 mm (内径) \times 0.25 μ m (膜厚), 固定相为 5 % 苯基-95 % 甲基聚硅氧烷, 或性能相当者。

5.6 气体

5.6.1 氢气: 纯度大于等于 99.999 %。

5.6.2 氦气: 纯度大于等于 99.999 %。

5.6.3 空气: 普通压缩空气或高纯空气。

5.6.4 氮气: 纯度大于等于 99.999 %。

6 仪器和设备

6.1 气相色谱-质谱仪, 配置有电子轰击 (EI) 源。

6.2 分析天平: 感量 0.0001 g、0.00001 g。

6.3 固相萃取装置。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 旋转蒸发器。

7 样品的制备和保存

振摇或颠倒混匀装有待测样品的密闭容器，使样品尽可能均匀。如样品出现凝固，可置于不超过 30 °C 的水浴中加热至样品融化，充分混匀后尽快称样。制备好的样品室温下避光密封保存。

8 试验方法

8.1 分析步骤

8.1.1 提取

准确称取 0.05 g（精确到 0.0001 g）样品，加入到 10 mL 玻璃试管中，向试管中加入混合内标工作溶液 0.2 mL。然后向试管中加入 1 mL 正己烷，涡旋混匀 30 s，待净化。

8.1.2 净化

预先用 6 mL 正己烷活化硅胶固相萃取柱，将待净化液转移至活化后的硅胶柱中（用 2 mL 正己烷分两次润洗试管，洗液一并加入硅胶柱中）。待样液全部流出后，用 5 mL 正己烷-乙醚溶液进行淋洗，弃去淋洗液，然后用 15 mL 正己烷-乙醚溶液进行洗脱，自然滴下或流速控制在每秒 1~2 滴，收集洗脱液，待浓缩。

8.1.3 浓缩

于旋转蒸发仪上 40 °C 减压浓缩至干，用 2 mL 正己烷充分溶解后，过 0.45 μm 微孔滤膜，滤液待测。

8.2 色谱条件

8.2.1 载气流速：1 mL/min。

8.2.2 进样口温度：300 °C。

8.2.3 进样模式：不分流进样，分流阀打开时间为 1.00 min。

8.2.4 载气：氦气（纯度≥99.999 %）。

8.2.5 柱温：初始温度 150 °C，以 20 °C/min 升至 200 °C，以 2.5 °C/min 升至 240 °C，保持 1.5 min，以 35 °C/min 升至 310 °C，保持 2 min。

8.2.6 进样量：1 μL。

8.3 质谱条件

8.3.1 电离方式：电子轰击电离源（EI 源，电子能量 70 eV）。

8.3.2 离子源温度：230 °C。

8.3.3 接口温度：280 °C。

8.3.4 溶剂延迟时间：5 min。

8.3.5 数据采集方式：选择离子检测（SIM）模式。定量离子、定性离子和保留时间参考值详见表 1。

表 1 脂肪酸乙酯的定量离子、定性离子和保留时间参考值

化合物	保留时间 min	定量离子 <i>m/z</i>	定性离子 <i>m/z</i>
棕榈酸乙酯	8.84	241	213, 255, 284
十七碳一烯酸乙酯	10.20	250	166, 208, 296
十七碳烷酸乙酯	10.57	255	213, 253, 298
亚油酸乙酯	11.89	262	178, 220, 308
油酸乙酯	12.01	222	180, 264, 310
硬脂酸乙酯	12.56	269	213, 283, 312

8.4 标准曲线的制作

将脂肪酸乙酯标准工作液按浓度由低到高分别注入气相色谱-质谱仪中，按照每种脂肪酸乙酯的定量离子，测得各脂肪酸乙酯和内标物质的峰面积，亚油酸乙酯和油酸乙酯以十七碳一烯酸乙酯为内标，棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯以十七碳烷酸乙酯为内标，分别以系列标准工作溶液中脂肪酸乙酯质量浓度为横坐标，以各脂肪酸乙酯和内标物的定量离子峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。

8.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入气相色谱-质谱仪中，依据 8.2 和 8.3 的条件对样品进行测定。

8.5.1 定性测定

根据色谱峰的保留时间和表 1 中脂肪酸乙酯的定性离子进行定性分析，定性依据为：

- a) 在相同的测试条件下被测样品中待测物质的保留时间与标准工作溶液中对应的保留时间偏差在±0.5%之内；
- b) 每个组分至少选择监测 3 个特征离子，被测样液与标准品的质谱图相似，且所选择的全部监测离子均出现；被测样品监测离子的相对丰度与标准工作溶液的相对丰度两者之差应符合表 2 要求。

表 2 定性离子相对丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±10%	±15%	±20%	±50%

8.5.2 定量测定

取试样溶液和标准溶液，根据绘制的标准曲线进行多点校准，以定量离子的峰面积定量，内标法计算，4 种脂肪酸乙酯总离子流色谱图和质谱图信息参见附录 B。

8.6 平行试验

按以上步骤（8.1-8.3），对同一试样进行平行试验测定。

8.7 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤（8.1-8.3）进行。

8.8 结果计算

试样中单种脂肪酸乙酯的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X—试样中脂肪酸乙酯的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- c—从标准工作曲线上查出的试样液中脂肪酸乙酯的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；
- V—试样定容体积，单位为毫升（mL）；
- m—试样的质量，单位为克（g）。

计算结果应扣除空白值，以重复性条件下获得的两次独立测定结果算术平均值表示，结果修约到小数点后1位。试样溶液中待测物的响应值应在定量测定线性范围内，超过线性范围时，应根据测定浓度对样品进行适当稀释，按照8.1~8.4的步骤试验再进行分析。

根据国际标准COI/T.20/Doc. no.28和(EEC) No 2568/91，橄榄油中脂肪酸乙酯含量以棕榈酸乙酯（C_{16:0}E）、亚油酸乙酯（C_{18:2}E）、油酸乙酯（C_{18:1}E）和硬脂酸乙酯（C_{18:0}E）总和计。

9 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本文件的检出限，棕榈酸乙酯为 0.4 mg/kg，亚油酸乙酯为 0.5 mg/kg，油酸乙酯为 0.5 mg/kg，硬脂酸乙酯为 0.4 mg/kg。

本文件的定量限，棕榈酸乙酯为 1.2 mg/kg，亚油酸乙酯为 1.7 mg/kg，油酸乙酯为 1.6 mg/kg，硬脂酸乙酯为 1.3 mg/kg。

9.2 准确度

本文件在添加水平为 4.00 mg/kg~20.00 mg/kg 时，回收率范围为 90.7 %~106.6 %，参见附录 C。

9.4 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附 录 A
资 料 性
脂 肪 酸 乙 酯 化 学 信 息

表 A. 1 给出了脂肪酸乙酯化学信息。

表 A. 1 脂肪酸乙酯的化学信息

化合物	缩写	CAS NO.
棕榈酸乙酯	C _{16:0} E	628-97-7
十七碳一烯酸乙酯	C _{17:1} E (IS1)	150324-16-6
十七碳烷酸乙酯	C _{17:0} E (IS2)	14010-23-2
亚油酸乙酯	C _{18:2} E	544-35-4
油酸乙酯	C _{18:1} E	111-62-6
硬脂酸乙酯	C _{18:0} E	111-61-5

IS1: 亚油酸乙酯和油酸乙酯内标物。
IS2: 棕榈酸乙酯和硬脂酸乙酯内标物。

附录 B

资料性

脂肪酸乙酯混合标准溶液总离子流图

图B.1给出了根据标准推荐的色谱条件得到脂肪酸乙酯标准溶液中各组分分离的气相色谱质谱法总离子流图，图B.2至图B.7给出了各脂肪酸乙酯的质谱图。

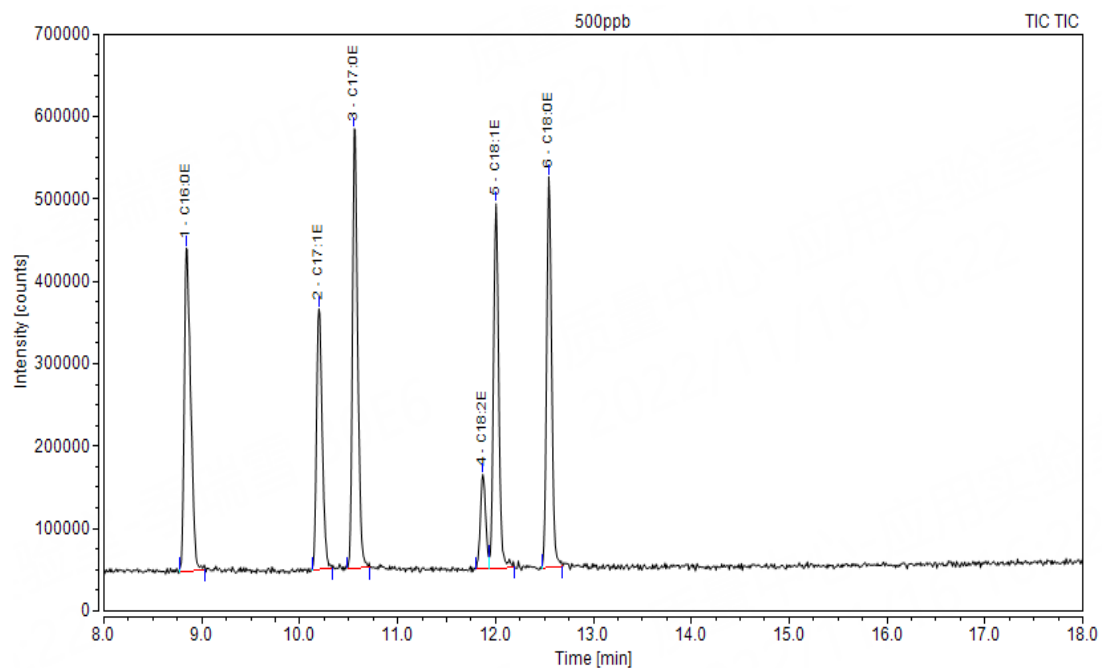


图 B.1 脂肪酸乙酯混合标准溶液总离子流图

- 1——棕榈酸乙酯 (C_{16:0} E)
- 2——十七烷酸乙酯 (C_{17:0} E) IS1
- 3——十七碳一烯酸乙酯 (C_{17:1} E) IS2
- 4——亚油酸乙酯 (C_{18:2} E)
- 5——油酸乙酯 (C_{18:1} E)
- 6——硬脂酸乙酯 (C_{18:0} E)

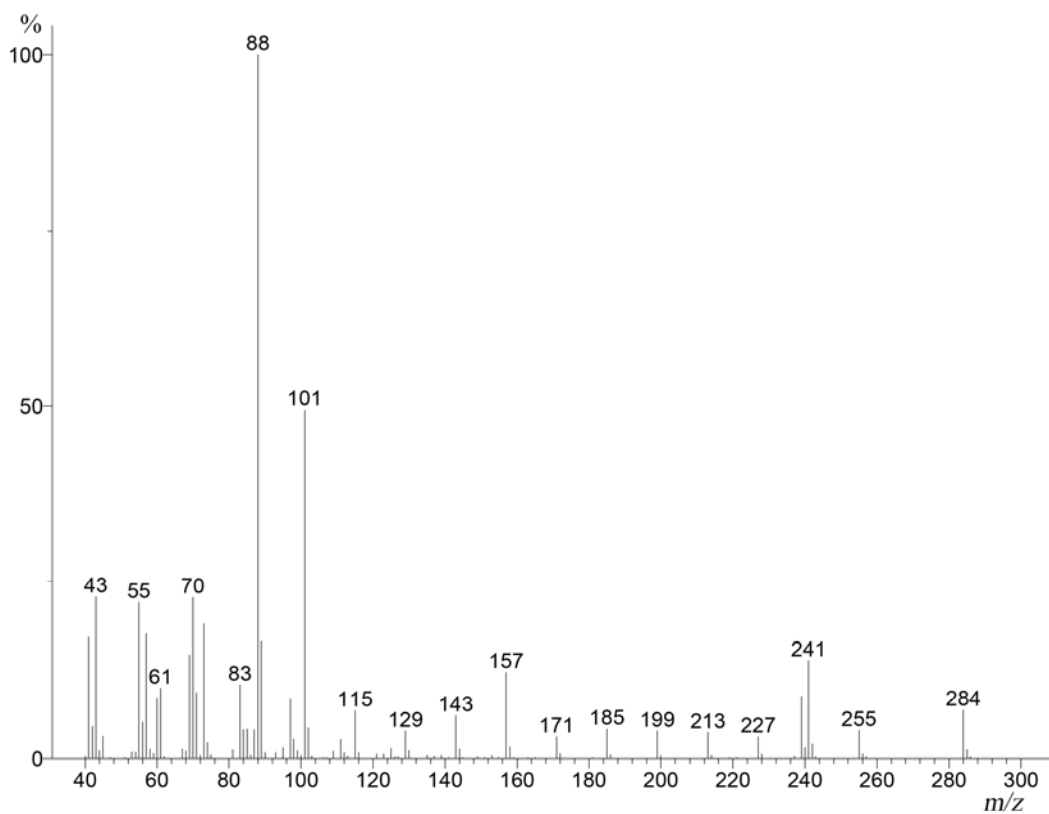


图 B.2 棕榈酸乙酯 (C_{16:0} E) 质谱图

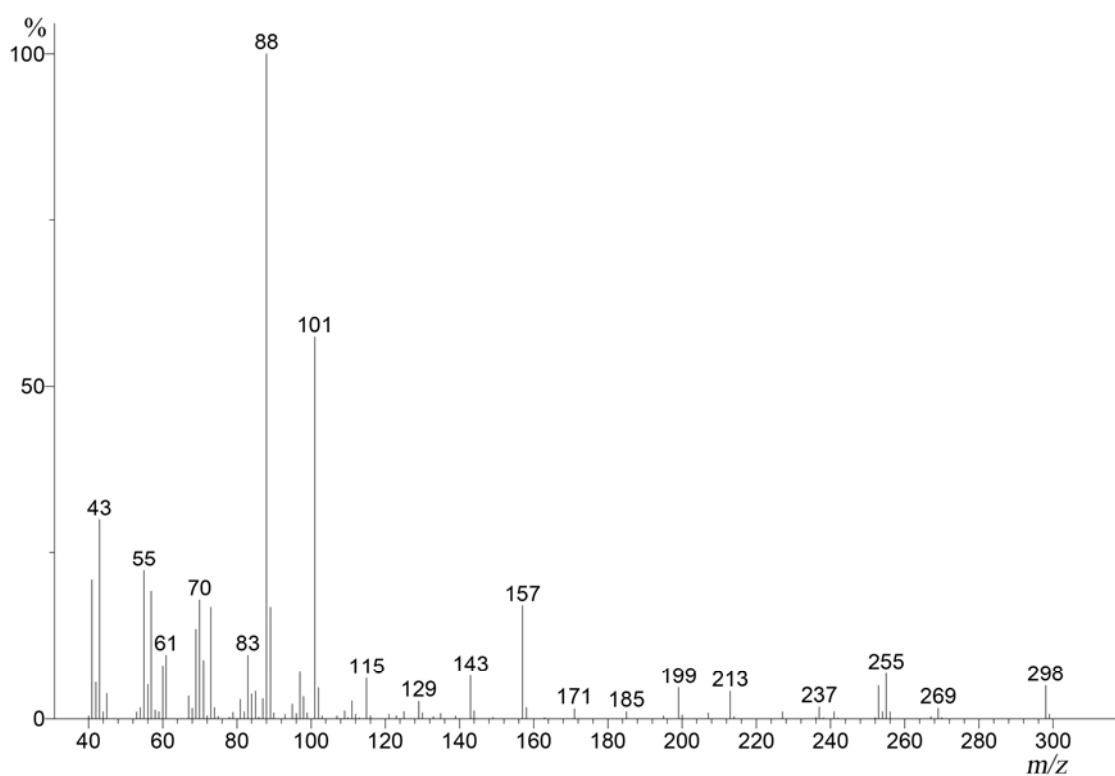
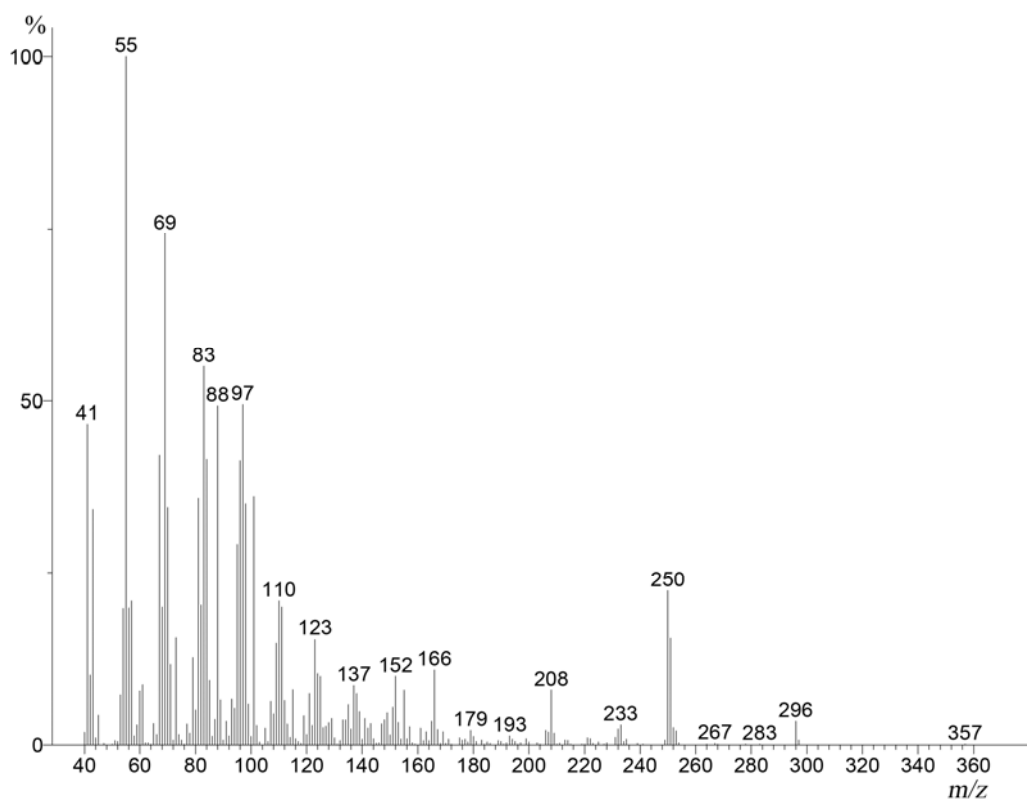
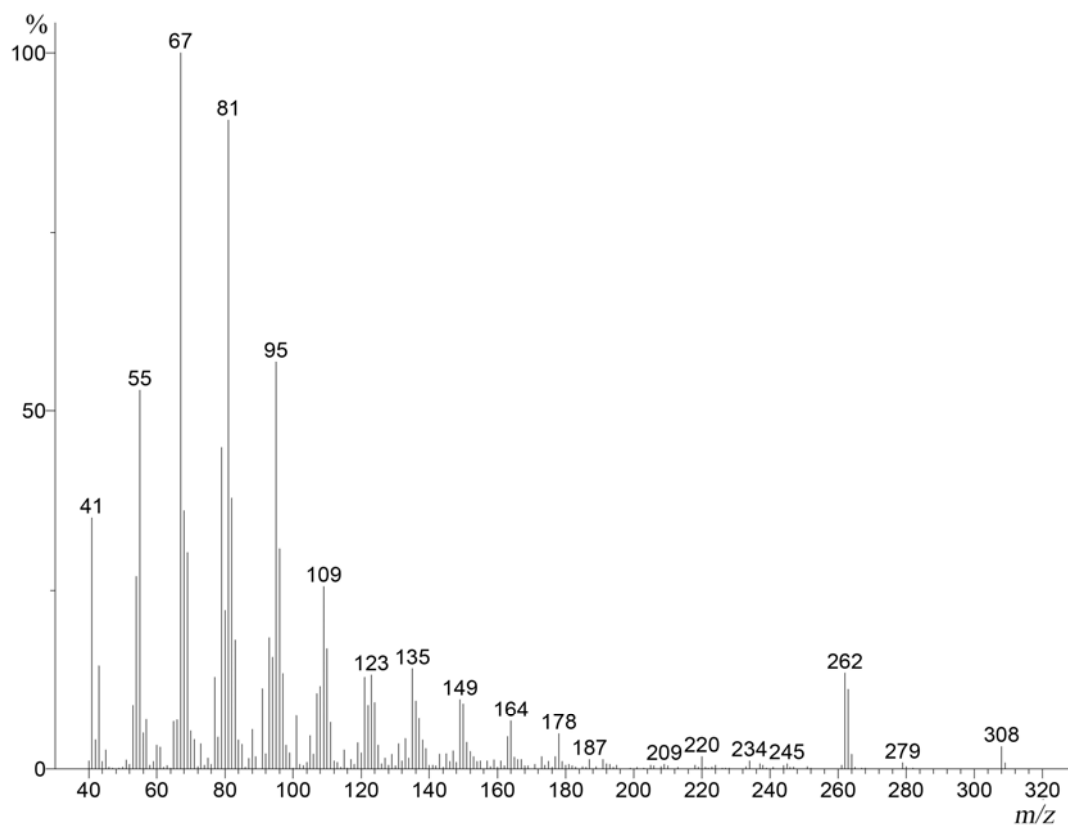


图 B.3 十七烷酸乙酯 (C_{17:0} E) 质谱图

图 B.4 十七碳一烯酸乙酯 ($C_{17:1}$ E) 质谱图图 B.5 亚油酸乙酯 ($C_{18:2}$ E) 质谱图

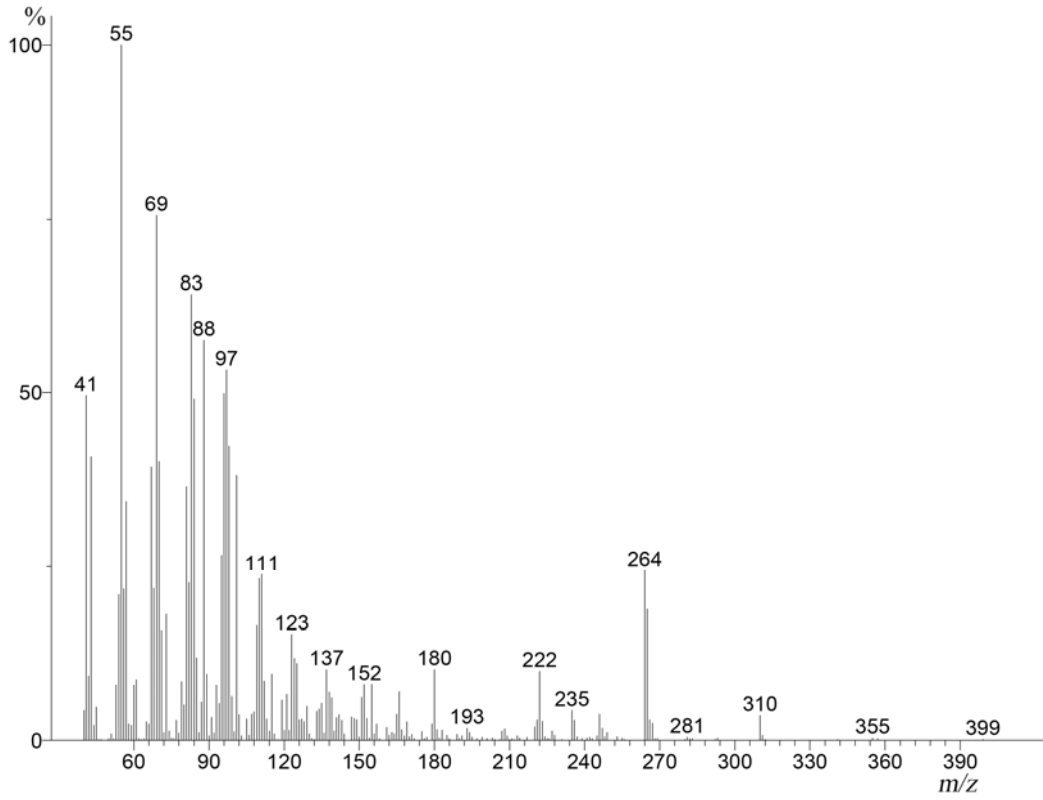


图 B. 6 油酸乙酯 (C_{18:1} E) 质谱图

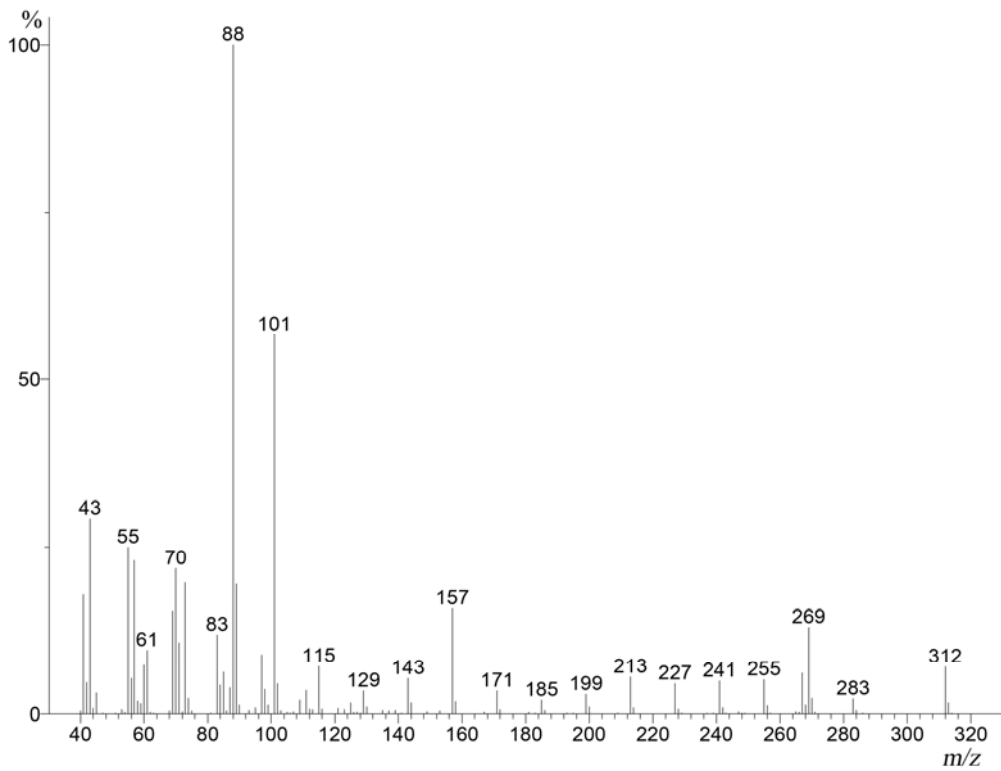


图 B. 7 硬脂酸乙酯 (C_{18:0} E) 质谱图

附录 C

资料性

脂肪酸乙酯的回收率数据

表 C.1 给出了特级初榨橄榄油中脂肪酸乙酯在 3 个不同添加水平条件下的回收率范围。

表 C.1 特级初榨橄榄油中不同添加水平的脂肪酸乙酯回收率范围

添加水平 mg/kg	回收率范围/%			
	棕榈酸乙酯	亚油酸乙酯	油酸乙酯	硬脂酸乙酯
4.0	99.9~105.3	91.9~94.2	91.6~99.4	91.4~97.3
8.0	101.8~106.2	90.7~96.8	91.0~98.1	90.9~92.0
20.0	103.2~106.6	100.7~103.8	91.3~93.7	95.7~98.2
