



气相色谱法测定奶粉中的反式脂肪酸含量

一、方法提要

本实验室根据国标 GB 5413.36-2010 《婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定》中提供的方法对奶粉中反式脂肪酸含量进行测定。

实验中首先用有机溶剂对奶粉中的脂肪进行提取，然后再在碱性条件下对提取的脂肪进行甲酯化，形成脂肪酸甲酯。最后，再用配有氢火焰离子化检测器的气相色谱仪分离顺式脂肪酸甲酯和反式脂肪酸甲酯，并进行外标法定量。

二、试剂及标准溶液配制

石油醚：沸程 30 °C ~ 60 °C。

乙醚：分析纯。

95 % 乙醇：分析纯。

正己烷：色谱纯。

氨水：25 % ~ 28 %。分析纯。

氢氧化钾：分析纯。

甲醇：分析纯。

无水硫酸钠：分析纯。

脂肪酸甲酯标准品：反-9-十八碳一烯酸甲酯 (C18:1-9t)、反-9, 12-十八碳二烯酸甲酯 (C18:2-9t, 12t)，购自百灵威试剂有限公司。

4 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液：称取 26.4 g 氢氧化钾，溶于约 80 mL 甲醇中。冷却至室温，用甲醇定容至 100 mL，加入约 5 g 无水硫酸钠，充分搅拌后过滤，保留滤液。

标样配制：

反式脂肪酸甲酯标准贮备液：浓度分别为 10.0 mg/ mL。称取 100 mg（精确到 0.1 mg）反-9-十八碳一烯酸甲酯标准品和反-9, 12-十八碳二烯酸甲酯标准品，分别用正己烷溶解并定容至 10.0 mL。放入冰箱在-15 °C 以下保存。

反式脂肪酸甲酯标准中间液：浓度分别为 1.0 mg/ mL。分别吸取两种反式脂肪酸甲酯标准储备液 5.0 mL 加入同一 50 mL 容量瓶中并用正己烷定容。临用前



配制。亦作为标准曲线最高浓度。

反式脂肪酸甲酯标准工作液：临用前配制。分别吸取反式脂肪酸甲酯标准中间液，0、2.0、6.0、8.0、10.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用正己烷定容，此浓度即为 0、0.2、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的标准工作液。

三、仪器及工作条件

恒温水浴：40 °C ~ 80 °C

离心机：转速 ≥ 4000 转/分钟

分析天平：感量为 0.1 mg

涡旋振荡器

旋转蒸发器

毛氏抽脂瓶

GC4000A 气相色谱仪（北京东西分析仪器有限公司）

GC 仪器条件：

色谱柱：HP-88 0.25 mm × 100 m × 0.20 μm

汽化室温度：250 °C 柱箱温度：初时温度 120 °C 三阶程升到 230 °C. FID 检测器温度：300 °C

载气：高纯 N₂ 分流比：70:1 柱流速：1 mL/min 进样量：1 μL

程序升温条件：

表 1 GC 程序升温条件

升温速率 (°C/min)	温度 (°C)	保持时间 (min)
	120	0
10	175	10
5	210	5
5	230	5

四、分析步骤及分析结果

4.1 实验方法



称取混合均匀的固体试样约 1.5 g (精确到 0.1 mg) 于毛氏抽脂瓶中, 加入 10 mL $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水, 将试样洗入毛氏抽脂瓶的小球中, 充分混合, 直到试样完全散开, 冷却至室温。

脂肪的提取: 向毛氏抽脂瓶中加入 3.0 mL 氨水, 混匀。置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中 15 min~20 min, 冷却至室温。加入 10 mL 乙醇和 1 滴刚果红溶液, 混匀。再加入 25 mL 乙醚, 塞上瓶塞, 手动震荡 1 min。再加入 25 mL 石油醚, 震荡 1 min, 4000 转/分钟离心 10 min, 倾出上清液于圆底烧瓶 (与旋转蒸发仪配套) 中, 为第一次提取。在剩余试样液中再加入 5 mL 乙醇, 25 mL 乙醚, 25 mL 石油醚按上述操作步骤进行第二次提取。用离心机离心分层后倾出上清液与第一次的上清液合并。将圆底烧瓶置于旋转蒸发器上, 在 $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 通入氮气条件下旋转蒸发除去溶剂, 保留残渣, 即为脂肪。

脂肪酸甲酯的制备: 将上述脂肪用正己烷溶解并定容至 10.0 mL, 取出 3.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加入 0.3 mL 氢氧化钾-甲醇溶液。盖紧瓶盖, 涡旋振荡器上剧烈振摇 2 min, 4000 转/分钟离心 5 min 后将上清液转入气相色谱试样瓶中, 此为试样测定液。

4.2 校准曲线及线性范围

实验配制的反式脂肪酸标准工作液的浓度梯度如下:

表 2 标准工作液浓度梯度

标样名称	浓度 mg/mL
反-9-十八碳一烯酸甲酯	0 0.1814 0.5442 0.7256 0.9070
反-9, 12-十八碳二烯酸甲酯	0 0.1694 0.5082 0.6776 0.8470

在上述仪器条件下, 根据浓度和峰面积分别绘制两种反式脂肪酸甲酯的标准曲线, 见图 1 至图 3, 其中图 1 为标准液的色谱分离谱图。实验获得反-9-十八碳一烯酸甲酯在 0~0.9 mg/mL, 反-9,12-十八碳二烯酸甲酯在 0~0.85 mg/mL 时浓度和峰面积良好的线性关系, 它们分别的相关系数为 0.9981 和 0.9995。

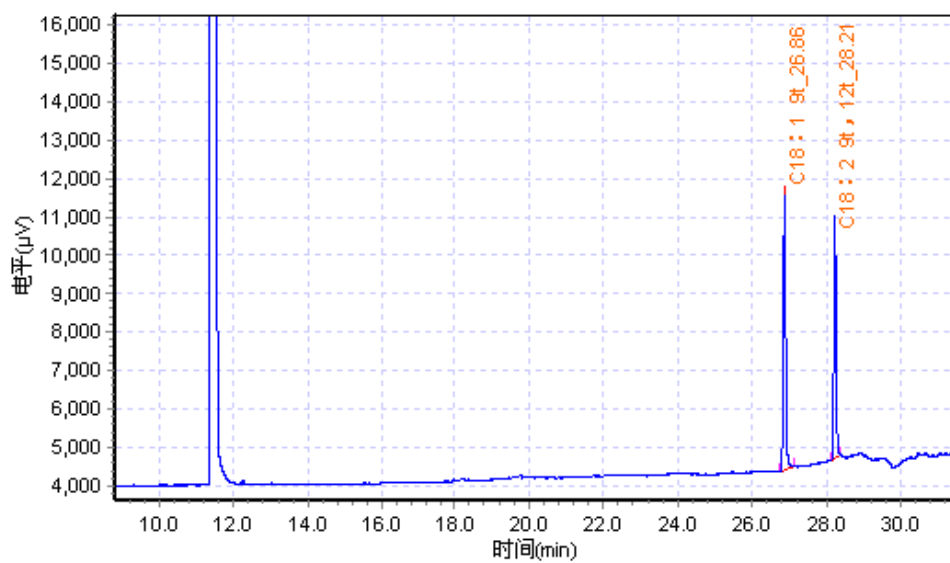


图 1 两种反式脂肪酸甲酯标准溶液的色谱图

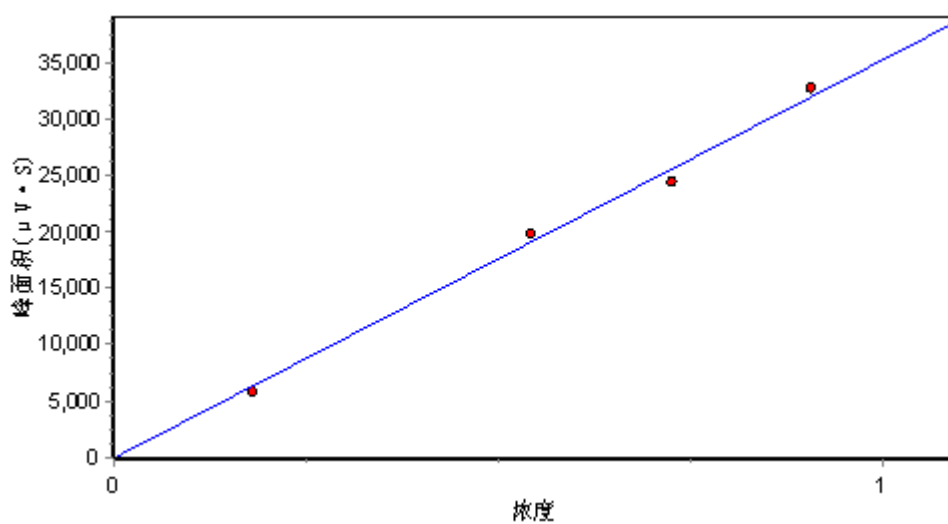


图 2 反-9-十八碳一烯酸甲酯的校准曲线

曲线方程: $y = 35223.966102x + 0.0000$; 相关系数: $r = 0.9981$

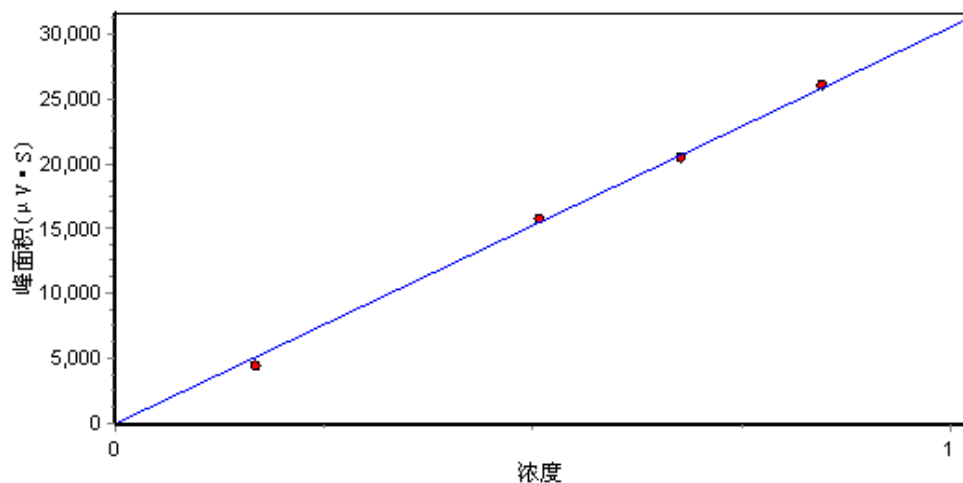


图3 反-9,12-十八碳二烯酸甲酯的校准曲线

曲线方程: $y = 30457.65138x + 0.0000$; 相关系数: $r = 0.9995$

4.3 样品测定结果

按照上述的实验方法对两个奶粉样品分别进行反式脂肪酸的提取及甲酯化, 并进行气相分析。根据奶粉样品中反-9-十八碳一烯酸甲酯和反-9,12-十八碳二烯酸甲酯的峰面积, 按各自的校准曲线, 利用外标法进行定量分析, 获得不同样品提取物中反-9-十八碳一烯酸甲酯和反-9,12-十八碳二烯酸甲酯的浓度。

结果如表3所示。图4、图5分别为1#样品和2#样品的色谱分析谱图。

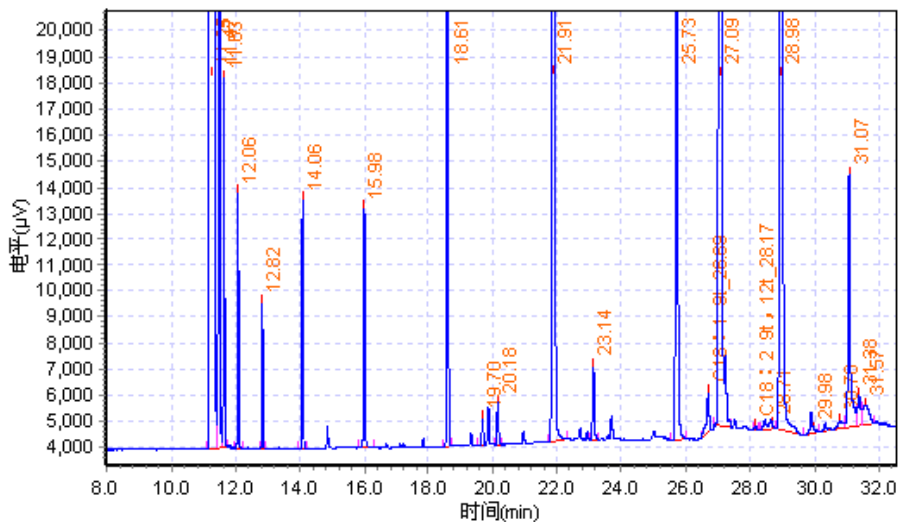


图4 1#样品色谱分析谱图

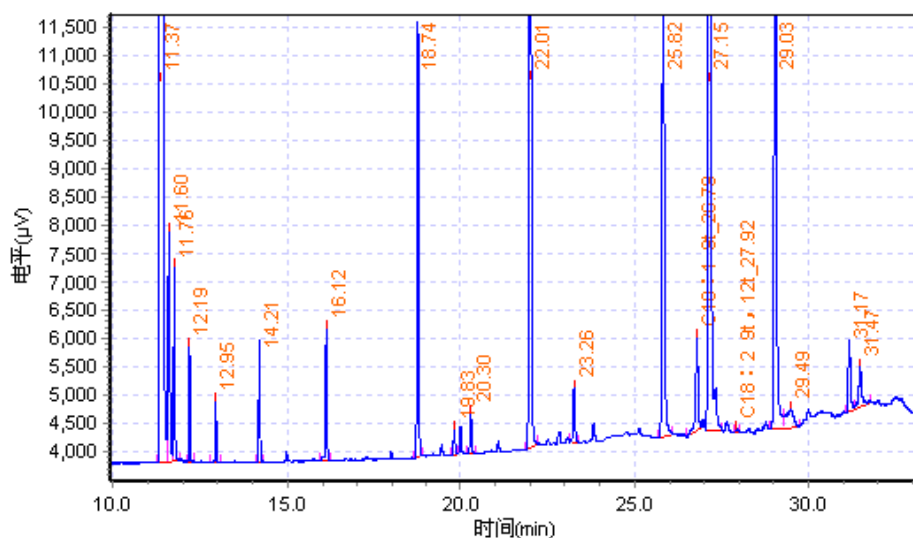


图 5 2#样品色谱分析谱图

表 3 样品提取物中反式脂肪酸甲酯的质量浓度

样品	浓度 mg/mL	
	反-9-十八碳一烯酸甲酯	反-9,12-十八碳二烯酸甲酯
1#样品	0.2198	0.02
2#样品	0.2263	0.01

上述得到的结果是样品提取物中反式脂肪酸甲酯的质量浓度，根据这个结果再结合公式 1 即可计算出样品中反-9-十八碳一烯酸和反-9,12-十八碳二烯酸的具体含量。再根据公式 2 计算出样品中反式脂肪酸的总含量。计算结果如表 4 所示。

$$X_{(1或2)} = \frac{c_i \times V \times M_{ai}}{m \times M_{bi}} \times 100 \quad \text{公式 1}$$

式中：

$X_{(1或2)}$ —— 样品中反十八碳一烯酸或反十八碳二烯酸含量，单位为 mg/100g；

V —— 样品的定容体积，单位为 mL；

m —— 样品质量，单位为 g；

c_i —— 试样测定液中反十八碳一烯酸甲酯或反十八碳二烯酸甲酯的质量浓度，单位为 mg/mL；

M_{ai} —— 反十八碳一烯酸或反十八碳二烯酸的分子量；



M_{bi} —— 反十八碳一烯酸甲酯或反十八碳二烯酸甲酯的分子量。

样品中反式脂肪酸的总含量 X ，按下式计算：

$$X = X_1 + X_2 \quad \text{公式 2}$$

式中：

X ——反式脂肪酸的总含量，单位为 $\text{mg}/100\text{g}$ ；

X_1 ——试样中反十八碳一烯酸的含量，单位为 $\text{mg}/100\text{g}$ ；

X_2 ——试样中反十八碳二烯酸的含量，单位为 $\text{mg}/100\text{g}$ 。

表 4 样品中反式脂肪酸的含量

样品	X_1 (mg/100g)	X_2 (mg/100g)	X (mg/100g)
1#样品	138.89	12.66	151.55
2#样品	143.59	6.34	149.93

4.4 精密度实验

在重复性条件下进行两次独立测定，根据测定结果，计算精密度。计算结果如表 5 所示。

表 5 精密度实验结果

样品		X_1	X_2
1#样品	第 1 次	136.62	12.28
	第 2 次	141.16	13.04
精密度		3.27%	6.0%

五、结论

本文采用气相色谱石英毛细柱外标法测定奶粉中的反式脂肪酸含量，两种反式脂肪酸在各自的浓度范围内都有良好的线性范围，相关系数 $r \geq 0.9995$ ，仪器和方法均具有良好的重复性和稳定性。对 2 个奶粉样品进行了检测分析，得到了 2 个奶粉样品中两种反式脂肪酸相应的含量，并且两个独立实验得到的结果间的精密度小于 10%，符合国标要求。