



中华人民共和国国家标准

GB/T xxxx—2003/COI/T.20/Doc. no.18/ Rev. 2

粮油检验 橄榄油中蜡含量的测定 —气相色谱法

Inspection of grain and oil –Determination of wax content of olive oils by capillary
column gas chromatography

(2003/COI/T.20/Doc. no.18/ Rev. 2 , Method of analysis-

Determination of wax content by capillary column gas chromatography, IDT)

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2008年4月)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准等同采用2003/COI/T.20/Doc. no.18/ Rev. 2《分析方法 利用毛细柱气相色谱测定蜡含量》(英文版)。

本标准的内容和结构与2003/COI/T.20/Doc. no.18/ Rev. 2一致,做了下列编辑性修改:

——由于语言文字不同,本标准的页码与原文2003/COI/T.20/Doc. no.18/ Rev. 2不同;

——增加了本标准前言;

——“本方法”一词改为“本标准”;

——增加第3章 仪器导语“常用实验仪器及以下特殊仪器”;

——增加第4章 试剂导语“除另有说明,水为蒸馏水或相当纯度的水”;

——将“典型橄榄油蜡馏分气相色谱图”编排为附录A,将“原附录”编排为附录B,将“方法的精密度”编排为附录C;

——本标准的附录A、附录B、附录C均为资料性附录。

本标准由全国粮油标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:国家粮食局科学研究院

本标准起草人:张蕊、薛雅琳、赵会义

动植物油脂 橄榄油中蜡含量的测定-气相色谱法

1 范围

本标准适用于橄榄油中蜡含量的测定。依照碳原子数的不同而使蜡组分得到分离。本标准被推荐用来辨别机榨橄榄油与油橄榄果渣油。

2 原理

将适当的内标物添加至油中，然后用水合硅胶柱色谱进行分离。实验条件下（其比甘三酯极性略低）回收洗脱馏分，然后使用毛细柱气相色谱直接分析。

3 仪器

常用实验仪器及以下特殊仪器。

- 3.1 锥形瓶：25 mL。
- 3.2 玻璃柱：用于液相色谱，内径 15.0 mm，长（30-40）cm，配有合适的旋塞。
- 3.3 可装毛细管柱的气相色谱仪，有可进行柱头进样的进样系统。包括：
 - 3.3.1 可程序升温的柱箱。
 - 3.3.2 用于柱头进样的冷柱头进样器。
 - 3.3.3 火焰离子化检测器和放大变流器。
 - 3.3.4 记录积分仪（注1），与放大变流器一起使用（3.3.3），响应速率小于 1s，纸速可变。
 - 3.3.5 毛细管柱：玻璃或熔融石英，长（8-12）m，内径（0.25-0.32）mm，固定液（注2）涂层厚（0.10-0.30） μm 。
- 3.4 微量注射器：用于柱头进样，10 μL ，硬化针头。
- 3.5 电动振荡器。
- 3.6 旋转蒸发器。
- 3.7 马福炉。
- 3.8 分析天平：精确度 0.0001 g
- 3.9 常规实验室玻璃器具。

注1：也可使用计算机处理系统，气相色谱数据通过计算机输入到该系统中。

注2：符合色谱分离要求的市售液相，如SE52，SE54等。

4 试剂

除另有说明，水为蒸馏水或相当纯度的水。

- 4.1 硅胶：粒径（60-200） μm 。将硅胶放入 500°C 的马福炉中，灼烧至少 4 h。冷却，加入相当硅胶量 2%的水。摇动使其成为均匀的浆。使用前于暗处放置至少 12 h。

正己烷：色谱纯。

警告：蒸气可燃。应远离热源、火星、明火。确保盛装的瓶盖严。使用过程中要做好通风。防止蒸气积聚，移走可能燃烧的物品，例如，不是用防火材料制成的加热器或电气设备。正己烷有毒，吸入可能破坏神经系统细胞。应避免吸入挥发气体。如必要，使用适当的呼吸器。避免接触眼睛和皮肤。

- 4.2 乙醚：色谱纯

警告：高度易燃，中等毒性。刺激皮肤，吸入有害。能损坏眼睛。影响可能滞后。它能形成过氧化物的爆炸物。蒸气可燃。远离热源、火星、明火。确保盛装的瓶盖严。使用过程中要做好通风。防止蒸气积聚，移走可能燃烧的物品，例如，不是用防火材料制成的加热器或电器设备。不要蒸干或半干。加水或适当的还原剂可以减少过氧化物的形成。不要喝。避免在挥发气体中呼吸。避免长时间或反复接触皮肤。

4.3 正庚烷：色谱纯。

警告：易燃；吸入有害。远离热源、火星、明火。确保盛装的瓶盖严。在使用过程中要做好通风。避免长时间呼吸蒸气。避免长时间或反复接触皮肤。

4.4 花生酸月桂醇酯（注3）标准溶液，在己烷中浓度为0.1%（m/v）（内标物）

4.5 苏丹 I（1-苯基-2-萘酚）

4.6 载气：氢气或氦气，纯净，用于气相色谱

警告：

氢气，高度易燃，负压。远离热源、火星、明火或不是用防火材料制成的电器设备。确保不使用时，负压气瓶阀关闭。使用时，一定要用减压阀。打开气瓶阀前，释放减压阀的压力。当打开气瓶阀时，不要站在气瓶出口前。在使用过程中要做好通风。不要将氢气从一个气瓶导入另一个气瓶。不要在气瓶里混合气体。确保气瓶不被碰撞。气瓶要远离阳光和热源，放置于无腐蚀的环境。不要使用已损坏或未贴标签的气瓶。

氦气，高压下的压缩气。它减少可供呼吸氧气的数量。确保气瓶关闭。使用过程中要做好通风。不要进入放置区域，除非有很好的通风。要使用减压阀。打开气瓶阀前，释放减压阀的压力。不要将氦气从一个气瓶导入另一个气瓶。不要在气瓶里混合气体。确保气瓶不被碰撞。当打开气瓶阀时，不要站在气瓶出口前。气瓶要远离阳光和热源。放置于无腐蚀的环境。不可吸入，只用于工业用途。

注3：也可选用软脂酸十六醇酯或硬脂酸十四醇酯

4.7 辅助气

4.7.1 氢气，纯净，用于气相色谱

4.7.2 空气，纯净，用于气相色谱

警告：

空气，高压气体。由于空气中大部分有机化合物的自然温度在高压下相当的低，易燃物存在时使用要小心。不使用时确保气瓶关闭。要使用减压阀。打开气瓶阀前，释放减压阀的压力。当打开气瓶阀时，不要站在气瓶出口前。不要将气体从一个气瓶导入另一个气瓶。不要在气瓶里混合气体。确保气瓶不被碰撞。气瓶要远离阳光和热源。放在无腐蚀的环境里。不要使用已损坏或未贴标签的气瓶。空气只用于工业用途，不可用于呼吸或用作呼吸设备。

5 步骤

5.1 色谱柱的制备

向正己烷（4.2）中加入15 g硅胶（4.1）制成悬浮液，然后转移至柱中（3.2）。自然沉降。借助电动振荡器（3.5）来完成沉降，使色谱柱更加均匀。淋洗30 mL正己烷除去杂质。使用分析天平（3.8）准确称量500 mg样品，加到25 mL锥形瓶（3.1）中，加入适量的内标物（4.5）。加入内标物的量依据预计蜡的含量，如：橄榄油样品中加入0.1 mg十二醇花生酸酯，油橄榄果渣油样品中加入（0.25-0.50）mg十二醇花生酸酯。

用2次2 mL正己烷（4.2）将制备好的样品转移至色谱柱中。

放掉溶剂至吸收剂上面1 mm处，再用70 mL正己烷除去所有天然存在的烷烃。用180 mL正己烷/乙醚混合液（99：1）（注4）（注5）开始进行色谱洗脱，流速大约为每10秒钟15滴，收集流出液。样品洗脱时环境温度应保持在22℃±4℃。

用旋转蒸发器（3.6）浓缩上述分离得到的流出液，直至溶剂几乎除去。在弱的氮气流中除去最后剩余的2 mL溶剂，再加入（2-4）mL正庚烷。

注4：正己烷/醚（99：1）混合液应每天现配。

注5：可将100 μl的1%苏丹I染料的洗脱剂溶液加到样品溶液中，直观观察蜡质是否完全洗脱。

染料的保留值处于蜡和甘三酯之间，当染料到达色谱柱的底部，应停止洗脱，因为所有的蜡已经洗脱出来。

5.2 色谱分析

5.2.1 预处理

将色谱柱装到色谱仪(3.3)上，柱进口连接到柱头进样系统，柱出口连接到检测器。检查气相色谱仪(检查气路、检测器、记录仪等的性能)。

如果色谱柱是第一次使用，建议老化色谱柱。让小的气流通过色谱柱，开启气相色谱仪。大约用4 h慢慢升温至350℃。

在此温度至少保持2 h，然后调节仪器至操作条件(调节气流，点燃氢火焰，连接电子记录仪(3.3.4)，调节柱箱温度，调节检测器等)。记录高于两倍分析灵敏度以上的信号。基线应该是直线，没有任何峰，不应有任何漂移。

负的基线漂移表明柱子连接有误；正的基线漂移表明柱子还没有老化彻底。

5.2.2 操作条件的选择(注6)

色谱条件为：

-柱温：

20 °C/min 5 °C/min 20 °C/min

80 °C (1') —————> 240 °C —————> 325 °C (6') —————> 340 °C (10')

- 检测器温度：350℃

- 进样量：1 μL正庚烷溶液(2mL-4mL)

- 载气：氦气或氢气，选择气体最佳的线性速度(参见附录B)

- 仪器灵敏度：可实现上述色谱条件

可依据柱子和气相色谱仪的特性对上述条件进行适当调整，使得所有的蜡得到分离，获得满意的峰分离，见附录A.1。内标物的保留时间必须在(18±3) min，最典型蜡的峰必须超过满量程的60%。

确定色谱峰的积分参数，以获得正确的峰面积。

注6：由于终温高，正漂移是允许的，但不能超过满量程的10%。

5.3 分析

用10 μL微量进样器吸取1 μL的溶液；向后抽动针芯至针头放空。把针插入进样系统，(1-2) S后快速注入。大约5 S，轻轻的抽出注射针头。

蜡完全馏出后，停止记录。

基线必须满足上述条件。

5.4 峰鉴定

将各个蜡的峰保留时间与同等分析条件下已知蜡混合物的保留时间相比较，进行鉴定。

图给出了机榨优质橄榄油中蜡的色谱图。

5.5 定量分析

通过积分仪，测定相应的内标物及C40至C46脂肪族酯的峰面积。

测定每一种蜡的含量按下列公式：

$$X = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

式中：

X ——每一种蜡的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

A_x ——每个酯的峰面积，单位为平方毫米(mm²)；

A_s ——内标物的峰面积，单位为平方毫米(mm²)；

m_s ——加入的内标物的质量，单位为毫克(mg)；

m ——测试样品的质量，单位为克(g)。

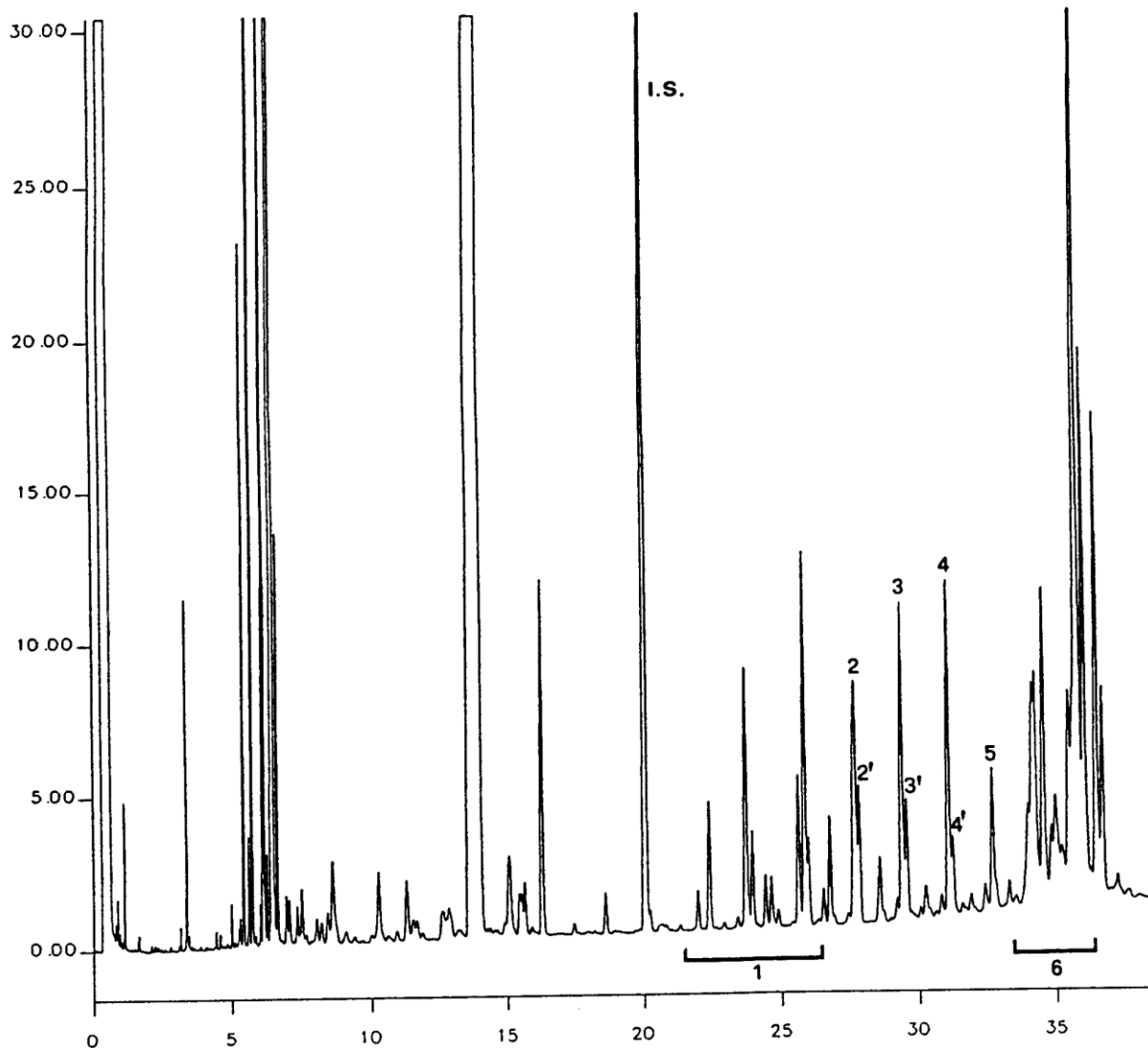
6 结果表示

报告C40至C46各个蜡（注 7）的总含量，单位为毫克每千克油脂(mg/kg)。

结果保留一位小数。

注7：依据附件提供的橄榄油中蜡的特征色谱图，对C40-C46偶碳数酯的组份进行定量。如C46酯色谱峰是分裂的，推荐分析油橄榄果渣油的蜡馏分，对其进行定性。油橄榄果渣油中C46峰非常明显，可以被鉴别出来。

附录 A

(资料性附录)
典型橄榄油蜡馏分气相色谱图

图A.1 橄榄油蜡馏分气相色谱图范例(*)

I. S. = 花生酸月桂醇酯

1 = 二萜酯

2+2' = C40酯

3+3' = C42酯

4+4' = C44酯

5 = C46酯

6 = 甾醇酯和三萜醇

(*) 在甾醇酯峰馏出后, 气相色谱图应不再有明显的其他峰(甘三酯)馏出

附 录 B

(资料性附录)

测定气体线性速度

调节气相色谱仪至正常操作条件下，进1-3 μL 甲烷（或丙烷）。测定气体从进样至出峰通过色谱柱的时间（ t_M ）。

线速度由公式 L/t_M 算出，单位为厘米每秒（ cm/sec ）。 L 为柱长度，单位为厘米（ cm ）， t_M 为测定的时间，单位为秒（ sec ）。

附 录 C
(资料性附录)
方法的精密度

1. 协同试验结果分析

方法的精密度值列于本页表中。

1999年由执行秘书安排IOOC认可的19家实验室参与协同实验。实验室来自八个国家。

测试五个样品:

A: 特级初榨橄榄油 (extra virgin olive oil)

B: 初榨橄榄油+精炼葵花籽油 (virgin olive oil + refined sunflower oil)

C: 初榨橄榄油+精炼橄榄果渣油 (virgin olive oil + refined olive-pomace oil)

D: 初榨橄榄油+精炼大豆油+精炼葵花籽油 (virgin olive oil + refined soybean oil + refined sunflower oil)

E: 精炼橄榄油+精炼橄榄果渣油+精炼大豆油+初榨油橄榄灯油 (refined olive oil + refined olive-pomace oil + refined soybean oil + lampante virgin olive oil)

由IOOC执行秘书组织协同试验结果, 遵循国际标准ISO 5725 测定方法和结果的准确度 (Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results) 中给定的原则进行统计。对实验室每个测定结果 (双实验a和b) 和每个样品的结果通过Cochran检验和Grubbs检验进行离散值检验。

表格清单:

n	参加实验室的数目
outliers	具有离群值的实验室个数
mean	可接受结果的平均值
r	一个数值, 在同一实验室, 由同一个操作员使用相同的设备, 按相同的测试方法, 在短时间内对同一被测对象相互独立进行的测试条件下, 两个测试结果的绝对差小于或等于此数的概率为95%
S_r	重复性标准差
RDS_r (%)	重复性变异系数 ($S_r \times 100/\text{平均值}$)
R	一个数值, 在不同的实验室, 由不同的操作员使用不同设备, 按相同的测试方法, 对同一被测对象相互独立进行的测试条件下, 两个测试测试结果的绝对差小于或等于此数的概率为95%
S_R	再现性标准差
RDS_R (%)	再现性变异系数 ($S_R \times 100/\text{平均值}$)

蜡含量 (mg/kg)

	D	E	A	B	C
n	19	19	19	19	19
utliers	5	5	4	3	5
mean	120.32	123.14	222.41	174.1	345.93
r	9.51	12.56	10.51	12.22	14.91
S_r	3.39	4.48	3.75	4.72	5.32

RSD_r (%)	2.82	3.64	1.69	2.71	1.54
R	38.83	48.89	58.93	25.65	44.39
S_R	13.86	17.46	21.04	9.16	15.85
RSD_R (%)	11.53	14.18	9.46	5.26	4.58

2. 参考文献

- ISO 5725-1: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions
- ISO 5725-2: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of the repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- ISO 5725-5: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method
- ISO 5725-6: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values
-

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/046101155051010211>