

# 特异性定量测定油脂和含油食品酸价的新铜皂比色法

薛斌<sup>1,2</sup>, 徐斐<sup>3</sup>, 曹文明<sup>3,4</sup>

(1. 月旭科技(上海)股份有限公司, 上海 201613; 2. 贝雷(上海)生物科技有限公司, 上海 201203;

3. 上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海食品快速测定工程技术研究中心, 上海 200093;

4. 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司, 上海 200137)

**摘要:**建立了一种可特异性测定食用油脂及含油食品中游离脂肪酸(FFA)的新铜皂比色法。优化了铜皂比色法的最佳测定波长,研究了有机相溶剂对显色强度和油脂溶解稳定性的影响,以及不同种类 FFA 对铜皂反应显色强度的影响。此外,研究了食用油脂样液水洗、酸性食品添加剂和酸性食用香精香料对铜皂比色法测定的影响。结果表明:新铜皂比色法的最佳测定波长为 710 nm, 环己烷是理想的有机相溶剂;新铜皂比色法能有效排除酸性食品添加剂等非 FFA 的酸性物质干扰;该法采用油酸显色,外标法定量,可实现 0.1 ~ 5.0 mg/g 的液态油和 0.2 ~ 10.0 mg/g 的固态脂酸价的定量测定;对于无酸性物干扰的食用油脂,其测定结果与传统酸碱滴定法相关性良好( $R^2 > 0.996$ ),回收率为 91.3% ~ 93.8%,重复性实验相对标准偏差小于 3%,单次测定仅需 1 g 油脂样品。因此,新铜皂比色法是一种准确而便捷的酸价测定技术,适用于油脂和含油食品的酸价测定。

**关键词:**酸价;铜皂比色法;酸碱滴定;游离脂肪酸;食用油脂;含油食品

中图分类号:TS207;TS227

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)08-0110-09

## Cupric acetate – pyridine colorimetric method for specific quantitative determination of acid value of oils, fats and oily foodstuffs

XUE Bin<sup>1,2</sup>, XU Fei<sup>3</sup>, CAO Wenming<sup>3,4</sup>

(1. Welch Materials(Shanghai) Inc., Shanghai 201613, China; 2. Beilei (Shanghai) Biotechnology

Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Engineering Research Center for Food Rapid

Detection, School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for

Science and Technology, Shanghai 200093, China; 4. Wilmar (Shanghai) Biotechnology

Research & Development Center Co., Ltd., Shanghai 200137, China)

**Abstract:** A new cupric acetate – pyridine colorimetric method used for specific determination of FFA in oils, fats and foodstuffs was established. The optimal detection wavelength of the new method was optimized, the effects of solvents on the color intensity and the solubility stability of oils and fats were studied, and the effects of different kinds of FFA on the color intensity were also studied. In addition, the influences of edible oil sample washing, acidic food additives and acidic food flavors on the determination of the new method were also studied. The results showed that the best detection wavelength was 710 nm, and cyclohexane was the ideal solvent. Cupric acetate – pyridine colorimetric method could effectively eliminate the interference of acidic food additives and other non – FFA acids. The determination of acid value in liquid oil (0.1 – 5.0 mg/g) and solid fat (0.2 – 10.0 mg/g) was achieved by using oleic acid as colorimetric calibration. For edible oils without acid interference, the detection results

收稿日期:2021-03-12;修回日期:2021-06-13

基金项目:食品安全国家标准制修订项目(spaq-2020-40)

作者简介:薛斌(1981),男,高级工程师,研究方向为食品测定及其样品预处理技术(E-mail)xuebin250@163.com。

通信作者:曹文明,研究员,博士(E-mail)caowenming@cn.wilmar-intl.com。

correlated well with the traditional acid – base titration method ( $R^2 > 0.996$ ). Overall, the recovery was 91.3% – 93.8% and the relative standard deviation of reproducibility test was less than 3%. Each test only required 1 g of oil and fat sample. In conclusion, the cupric acetate – pyridine

colorimetric method served as an efficient, accurate, and convenient alternative for the determination of acid values of oils, fats, and foodstuffs as well.

**Key words:** acid value; cupric acetate – pyridine colorimetric method; acid – base titration; free fatty acid; edible oils and fats; oily foodstuffs

酸价是反映食用油脂中游离脂肪酸(FFA)总含量的食品安全指标<sup>[1]</sup>。目前国内外酸价测定的标准技术是酸碱滴定技术,包括指示剂滴定法和自动电位滴定法,都是 FFA 的非特异性测定技术,即无法区分 FFA 与非 FFA 类的有机酸和无机酸<sup>[1]</sup>。尤其是当试样的酸价小于 1 mg/g 时,单次测定需要至少 20 g 的油脂样品<sup>[1-2]</sup>,这对于以提取的油脂为酸价测定对象的含油食品,经常不具有可操作性。酸价测定中的非特异性干扰与大称样量要求,严重干扰含油食品酸价的测定。然而,一种传统的铜皂络合比色技术在特异性定量分析 FFA 方面显示了其优势。

铜皂比色技术于 20 世纪 60 年代初具雏形,用于测定植物油中 FFA 的总含量<sup>[3]</sup>,后经不断改进<sup>[4-5]</sup>,逐渐在脂质组学<sup>[6]</sup>、食品储藏<sup>[7-9]</sup>、脂肪酶<sup>[10-11]</sup>等领域用于 FFA 测定。但是,传统的铜皂比色法需使用高毒的苯作为有机相,一定程度上限制了其在食品测定领域的应用,虽然有研究报道用低毒的异辛烷替代苯<sup>[5]</sup>,但异辛烷对固体油脂溶解

稳定性明显下降。基于此,一直以来从未有将铜皂比色技术作为油脂酸价测定的方法学研究。本文针对铜皂比色法的关键有机相溶剂开展比较实验,对铜皂技术的特异性、稳定性以及用于酸价测定的方法标准化进行研究,并与传统酸碱滴定测定酸价的标准技术进行对比分析,建立可特异性定量测定油脂和含油食品酸价的新铜皂比色法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

40 个食用动植物油脂样品(见表 1)和 26 个含油食品样品(见表 2),购于上海市超市及网店。固态食用氢化油样品,上海海融食品科技有限公司。丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生酸标准品,纯度 >97.0%,购自 TCI 公司; $\alpha$ -亚麻酸(纯度 $\geq$ 99.0%),购自 Sigma 公司;山梨酸、苯甲酸,纯度 $\geq$ 99.0%,购自上海泰坦科技公司。

表 1 40 个食用动植物油脂样品的信息

编号	名称	品牌	工艺	等级	编号	名称	品牌	工艺	等级
EO01	调和油	福临门	-	-	EO21	芥花籽油(加拿大进口)	Canayiyi	-	-
EO02	葵花籽油	多力	压榨	一级	EO22	高谷维稻米油	长寿花	浸出	-
EO03	葵花籽油	葵王	压榨	一级	EO23	花生油	五羊	压榨	一级
EO04	大豆油	日清	浸出	一级	EO24	花生油	龙大	压榨	一级
EO05	大豆油	优稼得	浸出	一级	EO25	芝麻香油	李锦记	-	-
EO06	大豆油	九三	浸出	三级	EO26	芝麻油	燕庄	冷榨	-
EO07	大豆油	桂清源	冷榨	三级	EO27	芝麻香油	福临门	压榨	一级
EO08	花生油	胡姬花	小榨	-	EO28	花椒油	友加	-	-
EO09	调和油	金龙鱼	-	-	EO29	花椒油	厨巍	-	-
EO10	菜籽油	福临门	压榨	三级	EO30	辣椒油	富运	-	-
EO11	菜籽油	道道全	压榨	四级	EO31	辣椒油	川北	-	-
EO12	菜籽油	逸飞	压榨	四级	EO32	香葱油	皇牌	-	-
EO13	亚麻籽油	陇上农庄	压榨	二级	EO33	橄榄油(意大利进口)	乐芙娜	-	-
EO14	调和油	金龙鱼	-	-	EO34	橄榄油	渝江源	压榨	特级初榨
EO15	调和油	福临门	-	-	EO35	橄榄油	田园	压榨	特级初榨
EO16	调和油	楚星	-	-	EO36	山茶油	湘纯	压榨	一级
EO17	玉米油	金龙鱼	压榨	一级	EO37	米糠油	一江秋	浸出	一级
EO18	谷维多稻米油	金龙鱼	浸出	-	EO38	花生油	万家泉	冷榨	-
EO19	食用猪油	百钻	-	二级	EO39	亚麻籽油	索米亚	压榨	二级
EO20	食用棕榈油	聚龙	压榨	-	EO40	亚麻籽油	红井源	压榨	一级

表 2 26 个含油食品样品的信息

编号	名称	品牌	编号	名称	品牌
FD01	红烧牛肉面(油炸方便面)	康师傅	FD14	地瓜脆片	百草味
FD02	辣白菜拉面(油炸方便面)	农心	FD15	麻辣味锅巴	百草味
FD03	藤椒牛肉面(油炸方便面)	统一	FD16	原味薯片	乐事
FD04	炸酱面(油炸方便面)	统一	FD17	牛肉豆豉辣椒酱	老干妈
FD05	香菇牛肉面(油炸方便面)	农心	FD18	风味豆豉辣椒酱	老干妈
FD06	罗宋汤面(油炸方便面)	统一	FD19	拌饭酱	海天
FD07	香葱排骨面(油炸方便面)	今麦郎	FD20	香辣牛肉辣椒酱	茂德公
FD08	玉米卷	上好佳	FD21	老北京炸酱	六必居
FD09	小小酥	旺旺	FD22	甜辣香菇竹笋牛肉酱	吉香居
FD10	虾味油炸糕点	咪咪	FD23	川香香菇竹笋牛肉酱	吉香居
FD11	烘烤味鲜虾片	亲亲	FD24	香辣牛肉酱(淡甜味)	阿香婆
FD12	小米锅巴(五香味)	良品铺子	FD25	香菇牛肉酱	味妃
FD13	原味鲜虾片	亲亲	FD26	观音剁椒酱	李子柒

石油醚(30~60℃)、乙醚、异丙醇、异辛烷、正己烷、环己烷、苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、吡啶、一水合乙酸铜,均为分析纯,购自上海泰坦科技公司;实验用纯水,符合实验用二级水要求。

铜皂染色液:参照文献[3-5]的方法配制,先用纯水配制5%乙酸铜溶液,滴加吡啶,直到pH上升到6.10~6.20。

#### 1.1.2 仪器与设备

岛津UV1900双光束紫外-可见分光光度计(配1cm玻璃比色皿),赛多利斯RSA224S分析天平,赛多利斯SQP电子天平,大龙MX-S旋涡振荡混合器,梅特勒-托利多FiveEasy Plus电子pH计,上海亚荣RE-3000旋转蒸发仪,IKA RCT恒温磁力搅拌器,精宏XMTE-8112恒温水浴锅,卢湘仪RG-160AT台式高速离心机,万通905自动电位滴定仪(配非水pH电极)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 最佳测定波长的确定

以不同的烃类溶剂将油酸标准品配制成质量浓度为1.0 mg/mL的溶液(有机相)。取5 mL油酸溶液于离心管中,加入2 mL铜皂染色液(水相),密闭后充分振荡混合反应30 s,然后静置分层,再取适量的上层有机相溶液,经0.22 μm尼龙滤膜过滤后,用分光光度计对其进行200~800 nm波长的吸光度扫描(以相同的烃类溶剂为空白),测定所形成的显色物质——铜皂络合物的最大特征吸收峰的波长。

以25个不同品种、不同制油方式(浸出、压榨、冷榨)和不同加工等级(一级、二级、三级和四级)的食用动植物油脂为试样,分别称取1.0 g,用烃类溶剂溶解并定容到5 mL后,经0.22 μm尼龙滤膜过滤后,分别测定其在上述铜皂络合物最大特征吸收

峰所在波长处的吸光度(以相同的烃类溶剂调零),通过分析确定最佳测定波长。

#### 1.2.2 溶剂对铜皂反应显色强度及油脂溶解稳定性的影响

溶剂对铜皂反应显色强度的影响:分别用不同的烃类溶剂为有机相,将油酸标准品配制成0.20 mg/mL的标准溶液。按1.2.1分别取油酸标准溶液5 mL于多支离心管中,加入铜皂染色液显色反应、过滤后,测定在最佳测定波长下的吸光度(以相同的有机相烃类溶剂调零)。

溶剂对固态油脂溶解稳定性的影响:将熔点55℃左右的食用氢化油完全加热熔化后取1.0 g,分别用不同的烃类溶剂溶解并定容到10 mL,然后在15~20℃的室温下静置过夜,观察是否有固体析出或沉淀的现象。

#### 1.2.3 不同种类FFA对铜皂反应显色强度的影响

不同碳链长度的FFA对铜皂反应显色强度的影响:用优化的烃类溶剂分别将丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、油酸和花生酸的标准品配制成2.0 μmol/mL的溶液,再分别取这些FFA溶液各5 mL于9支离心管中,按1.2.1加入铜皂染色液显色反应、过滤后,测定在最佳测定波长下的吸光度(以相同的烃类溶剂调零)。

不同不饱和度的18碳FFA的影响:用优化的烃类溶剂分别将硬脂酸、油酸、亚油酸和α-亚麻酸的标准品溶解配制成0.5 mg/mL的溶液,再分别取这些FFA溶液各5 mL于4支离心管中,按1.2.1加入铜皂染色液显色反应、过滤后,分别测定在最佳测定波长下的吸光度(以相同的烃类溶剂调零)。

#### 1.2.4 新铜皂比色法标准工作曲线的绘制

用优化的烃类溶剂把基准FFA的标准品配制

成质量浓度分别为 5.0、3.0、1.0、0.5 mg/mL 和 0.1 mg/mL 的标准工作溶液。

取 5 支 50 mL 离心管,分别加入 5 mL 不同质量浓度的标准工作溶液,再按 1.2.1 加入铜皂染色液显色反应、过滤后,分别测定在最佳测定波长下的吸光度(以相同的烃类溶剂调零)。以吸光度为纵坐标,相应的基准 FFA 质量浓度为横坐标,绘制一阶线性回归曲线,并获得标准曲线方程。

### 1.2.5 新铜皂比色法测定含油食品酸价

#### 1.2.5.1 油脂样液(铜皂反应有机相)的制备

按照 GB 5009.229—2016 中相关技术要求,提取各种含油食品中的油脂作为试样,按下面方法制备油脂样液。

**液态油脂:**称取 1.00 g 油脂试样,用优化的烃类溶剂溶解定容到 5 mL,加入 3~5 mL 纯水,密封后于漩涡振荡混合器振荡 20~30 s,以洗脱油脂样液,然后静置分层,取上清溶液作为铜皂反应的有机相。

**固态油脂:**先将适量的油脂试样于比其熔点高 5~10 ℃ 的水浴中加热熔化后,趁其还未完全凝固,立刻准确称量 1.00 g,并用优化的烃类溶剂溶解定容到 10 mL,其余操作同液态油脂。

#### 1.2.5.2 酸价的测定

在 50 mL 离心管内加入 5 mL 1.2.5.1 的有机相,再按 1.2.1 加入铜皂染色液显色反应、过滤后,测定在最佳测定波长下的吸光度(以优化的烃类溶剂调零)。将吸光度代入标准曲线方程,获得有机相中总 FFA 浓度所相当的油酸质量浓度( $c$ ),再推算油脂试样的酸价,计算公式如下:

$$X_{AV} = \frac{c \times V \times 56.1}{m \times 282.45} \quad (1)$$

式中: $X_{AV}$ 为酸价,mg/g; $c$ 为通过标准曲线方程获得的油酸质量浓度,mg/mL; $V$ 为有机相的定容体积(液态油脂为 5 mL,固态油脂为 10 mL); $m$ 为油脂试样的称样质量,g;56.1 和 282.45 分别为氢氧化钾和油酸的摩尔质量,g/mol。

#### 1.2.6 油脂样液水洗对新铜皂比色法测定的影响

取不同种类的食用油脂试样和从不同食品中提取的油脂试样,分别进行水洗和非水洗的油脂样液制备。水洗的油脂样液制备按 1.2.5.1 方法进行;非水洗的油脂样液制备先按 1.2.5.1 方法将油脂试样用优化的烃类溶剂溶解定容,然后不加纯水水洗,直接作为样液进行酸价的测定。

#### 1.2.7 酸性食品添加剂对新铜皂比色法的干扰

取酸价小于 0.10 mg/g 的一级浸出大豆油,分

别添加不同量的山梨酸或苯甲酸标准品,得到山梨酸或苯甲酸质量浓度分别为 250、500、1 000 mg/kg 和 2 000 mg/kg 的大豆油样品,再分别用酸碱滴定法<sup>[12]</sup>和新铜皂比色法(按 1.2.5 方法进行)测定其酸价。

#### 1.2.8 食用香精香料对新铜皂比色法的干扰

取多个品牌、不同品种的油基调味酱,按其配料表分成不含和含有食用香精香料两类,再分别用酸碱滴定法<sup>[12]</sup>和新铜皂比色法(按 1.2.5 方法进行)对这两类调味酱进行酸价测定。

#### 1.2.9 方法的回收率

取酸价小于 0.10 mg/g 的一级浸出大豆油,添加不同量的油酸标准品,配制成油酸质量分数分别为 0.28%、0.80% 和 2.30% 的大豆油样品,用 1.2.5 方法测定酸价,然后将酸价换算成相应的油酸含量<sup>[1]</sup>,通过计算油酸的回收率反映新铜皂比色法酸价测定的回收率。

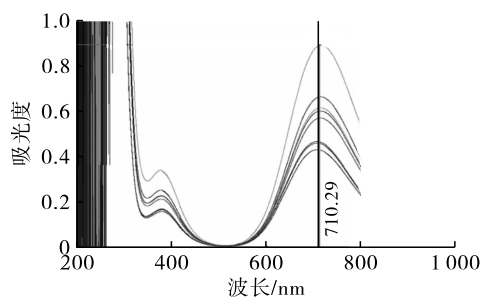
#### 1.2.10 方法的重复性

向酸价小于 0.10 mg/g 的一级浸出大豆油中分别添加不同质量浓度的油酸标准品,使其成为 5 个不同酸价的油脂样品,再按 1.2.5 方法测定酸价,且每个油脂样品连续测定 5 次,以计算相对标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最佳测定波长的确定

图 1 为以不同的烃类为有机相溶剂,1.0 mg/mL 油酸有机相溶液铜皂显色反应后,在 200~800 nm 波长范围的吸光度扫描结果。由图 1 可知,铜皂络合物的最大特征吸收峰在 710.29 nm,与文献[4-5]所报道的 715 nm 相近,所以 710 nm 可作为铜皂比色法的测定波长。



注:自上而下曲线分别代表有机相溶剂为苯、甲苯、邻二甲苯、对二甲苯、间二甲苯、环己烷、异辛烷、正己烷。

图 1 不同烃类为有机相溶剂的铜皂络合物的光谱吸收图

表 3 是 25 个食用动植物油脂被环己烷溶解并稀释到 5 mL 后,在 710 nm 的吸光度。

由表 3、表 1 可知,市场上常见的不同品种、制油方式和加工程度的食用动植物油脂在 710 nm 波

长的吸光度基本都小于 0.010,有些加工程度比较高的油脂吸光度为零,即这些油脂本身的背景吸光度不会对铜皂比色法测定酸价产生显著影响。因此,710 nm 进行铜皂比色法的酸价测定时无需扣除油脂试样的背景吸光度。原因主要是各类食用动植物油脂天然的颜色一般主要为红、橙、黄,根据可见光谱学中的互补色光理论<sup>[13]</sup>,各类食用动植物油脂的天然背景吸收光谱应集中在 560 nm 以下,而铜皂比色法产生的主要显色产物——铜皂络合物是蓝绿色的,其特征光谱的吸收波长集中在 600 nm 以上,最大特征吸收峰的波长为 710 nm。因此,确定 710 nm 为新铜皂比色法测定的最佳波长。

表 3 25 个食用动植物油脂的环己烷溶液在 710 nm 的吸光度

样品编号	$A_{710}$	样品编号	$A_{710}$
EO01	0.000	EO39	0.006
EO14	0.000	EO17	0.000
EO15	0.008	EO25	0.009
EO16	0.007	EO27	0.008
EO02	0.000	EO34	0.005
EO03	0.000	EO35	0.003
EO04	0.000	EO18	0.000
EO06	0.000	EO19	0.000
EO23	0.000	EO20	0.000
EO24	0.000	EO30	0.009
EO10	0.007	EO31	0.012
EO11	0.006	EO28	0.001
EO12	0.004		

## 2.2 有机相溶剂的选择

表 4 是以不同种类烃类为有机相溶剂,配制 0.20 mg/mL 的油酸溶液,分别进行铜皂显色反应后,在 710 nm 下测定的吸光度,并以苯为有机相溶剂时的吸光度为 100% 显色强度,计算其他溶剂的相对显色强度。

表 4 不同烃类为有机相溶剂的铜皂反应显色强度及有机相溶剂的比较

溶剂	$A_{710}$	相对显色强度/%	溶剂毒性 <sup>[14]</sup>	溶剂性质
苯	0.240	100.0	高毒	有显著的刺激性气味
正己烷	0.072	30.0	低毒	无显著的刺激性气味
异辛烷	0.074	30.8	低毒	无显著的刺激性气味
环己烷	0.084	35.0	低毒	无显著的刺激性气味
甲苯	0.142	59.2	低毒	易制毒,且有显著的刺激性气味
邻二甲苯	0.106	44.2	低毒	有显著的刺激性气味
间二甲苯	0.096	40.0	低毒	有显著的刺激性气味
对二甲苯	0.104	43.3	低毒	有显著的刺激性气味

早期铜皂比色法有机相溶剂均为苯<sup>[3-4,14]</sup>,但苯为高毒溶剂<sup>[15]</sup>,后来又改用低毒溶剂异辛烷为有机相溶剂<sup>[5]</sup>。由表 4 可知,不同种类的烃类作为有机相溶剂,对铜皂比色法的显色强度有着较大影响。甲苯是易制毒溶剂,二甲苯类溶剂有显著的刺激性气味,所以未将其作为铜皂比色法的有机相溶剂。虽然用环己烷作为有机相溶剂,其铜皂比色的吸光度不是很强,但考虑到目前各类食用动植物油脂酸价国家标准的最低限值一般在 0.20~0.50 mg/g<sup>[16-18]</sup>、油脂制品酸价国家标准的限值为 1.0 mg/g<sup>[19]</sup>、含油食品的酸价国家标准限值一般在 1.8~5.0 mg/g<sup>[20-22]</sup>,而以环己烷作为有机相溶剂时,其酸价定量测定的下限已达 0.10~0.20 mg/g,可满足食用油脂、油脂制品和含油食品酸价测定的需求。因此,环己烷是新铜皂比色法比较理想的有机相溶剂。

另外,不同的烃类溶剂对固态油脂的溶解稳定性有明显差异。实验发现,溶解在正己烷和异辛烷中的固态油脂并不稳定,在室温下静置会重新结晶凝固,从溶剂中沉淀析出。但溶解在芳烃类溶剂和环己烷中的固态油脂,室温下静置过夜(>12 h)仍可保持澄清透明的溶液状态。因此,进一步考虑到对高熔点固态油脂的溶解稳定性,在饱和烷烃中正己烷和异辛烷不适宜作为新铜皂比色法的有机相溶剂。因此,选择环己烷作为有机相溶剂。

## 2.3 绘制标准工作曲线用的基准 FFA 的确定

### 2.3.1 FFA 碳链长度对铜皂反应显色强度的影响

按 1.2.3 方法,以油酸(C18:1)的吸光度作为 100% 的显色强度,计算其他不同碳链长度的 FFA 的相对显色强度,结果见图 2。

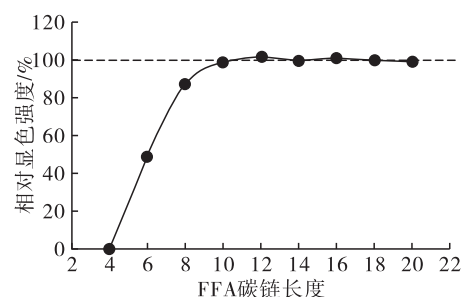


图 2 FFA 碳链长度对铜皂显色强度的影响

由图 2 可知:只有碳链长度在 10 碳及其以上的 FFA,才能达到和油酸相近的显色强度;反之,FFA 的碳链长度越短,其铜皂显色强度越弱,4 个碳的辛酸(C4:0)几乎不发生铜皂显色反应。因此,铜皂比色法是针对 10 碳及其以上 FFA 的特异性测定技术。这种现象与 FFA 在铜皂反应后形成的铜皂络合物的极性强弱有关<sup>[4]</sup>:FFA 的碳链越长,其所形

成的铜皂络合物的非极性越强,也越容易溶于有机相中,如此形成的铜皂络合物也越稳定,10碳及其以上的FFA形成的铜皂络合物可能在有机相中的溶解性和稳定性都比较相近,在等摩尔浓度的条件下,它们的铜皂显色强度相近;反之,FFA的碳链越短,则形成的铜皂络合物的极性越强,相对的其就不易溶于有机相,其铜皂显色的强度就越弱,4碳及其以下的FFA所形成的铜皂络合物可能无法溶于有机相,导致检测不到铜皂反应。由于常见的各类食用动植物油脂脂肪酸组成中一般是以C14~C20的FFA为主<sup>[23]</sup>,因此铜皂比色法适合常见食用动植物油脂酸价的测定。

### 2.3.2 FFA 不饱和度对铜皂反应显色强度的影响

按1.2.3方法,以油酸的吸光度作为100%的显色强度,计算4种不同不饱和度的18碳FFA对铜皂反应显色强度的影响,结果见表5。

表5 4种不同不饱和度的18碳FFA对铜皂反应显色强度的影响

脂肪酸	$A_{710}$	相对显色强度/%
硬脂酸	0.207	96.7
油酸	0.214	100.0
亚油酸	0.221	103.3
$\alpha$ -亚麻酸	0.225	105.1

由表5可知,硬脂酸、油酸、亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸环己烷溶液的铜皂反应显色强度相差不大,表明对于相同碳链长度的FFA,不饱和度的差异并不会对显色强度造成显著影响。这是由于在常见的10碳以上的FFA中,不饱和度的差异一般不会对FFA所形成的铜皂络合物在有机相中的溶解性和稳定性有较大影响。

油酸、亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸是10碳及以上的常见FFA中仅有的3种在20~25℃的室温下呈液态的FFA,取样称量比较方便,由于油酸的化学稳定性要优于亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸<sup>[23]</sup>,因此选择油酸作为新铜皂比色法定量测定酸价的理想基准FFA。

### 2.4 新铜皂比色法的标准工作曲线和酸价的定量测定范围

实验表明,在0.1~5.0 mg/mL范围内,铜皂显色后在710 nm下的吸光度与油酸环己烷标准工作溶液的质量浓度呈正比,新铜皂比色法的标准工作曲线方程为 $y = 0.406x + 0.012$ ,相关系数( $R^2$ )大于0.999,表明线性关系良好。

另外,对公式(1)可进行以下简化:对液态油脂而言,公式(1)中的 $m = 1$  g、 $V = 5$  mL,如此公式(1)简化为 $X_{AV} = 0.993 \text{ } 1c \approx c$ ,即用油酸标准工作曲线

计算获得的有机相中总FFA的质量浓度(以油酸的当量计)就是油脂试样的酸价;同理,对于固态油脂而言,因为公式(1)中的 $m = 1$  g、 $V = 10$  mL,获得的有机相中总FFA的质量浓度(以油酸的当量计)的2倍就是油脂试样的酸价。因此,新铜皂比色法对液态油脂酸价的定量范围为0.1~5.0 mg/g,对固态油脂酸价的定量范围为0.2~10.0 mg/g,新铜皂比色法对液态油脂和固态油脂酸价测定的定量限分别为0.10 mg/g和0.20 mg/g。

### 2.5 油脂样液水洗的必要性

表6是食用植物油和含油食品提取的油脂试样制备的油脂样液分别经水洗和未水洗后进行新铜皂比色法酸价测定的比较。

表6 油脂样液水洗与否的新铜皂比色法酸价测定对比

样品编号	酸价/(mg/g)		相对偏差/%
	未水洗	水洗	
EO04	0.20	0.21	5.0
EO23	0.42	0.41	-2.4
EO34	0.46	0.47	2.2
EO25	1.60	1.60	0.0
EO11	0.84	0.86	2.4
EO38	0.35	0.36	2.9
FD01	0.14	0.26	85.7
FD02	0.29	0.38	31.0
FD03	0.39	0.54	38.5
FD04	0.42	0.69	64.3
FD05	0.31	0.45	45.2
FD06	0.54	0.55	1.9
FD07	0.15	0.16	6.7
FD08	0.26	0.32	23.1
FD09	0.42	0.54	28.6
FD10	0.60	0.68	13.3
FD11	0.52	0.61	17.3
FD12	0.50	0.58	16.0
FD13	0.54	0.62	14.8
FD14	0.72	0.73	1.4
FD15	1.00	1.00	0.0
FD16	0.11	0.10	-9.1

注:油炸方便面的油脂试样包含面饼和调味油包的油脂。

由表6可知:油脂样液在进行新铜皂比色法测定酸价之前,水洗与否对于食用植物油的酸价测定值影响不大(水洗后酸价测定值与未水洗酸价测定值的相对偏差均小于等于5%);但部分含油食品的酸价在其油脂样液水洗后会明显升高,原因是含油食品提取的油脂中可能含有微量的水溶性酸性物质,抑制了铜皂比色法的显色强度。因为铜皂染色

液对 FFA 的显色强度极易受其本身 pH 的影响,当铜皂染色液的 pH 维持在 6.0 ~ 6.2 之间时,其对 FFA 的显色强度是最大的,一旦铜皂染色液的 pH 偏离该最佳 pH 范围,其对 FFA 的显色强度会急剧下降<sup>[4-5]</sup>。

各类含油食品的成分和加工工艺多样、复杂和多变,其中难免会含有一些水溶性的酸性物质,如乙酸、丙酸等添加剂。在油脂提取时,可能会有少量的水溶性酸性物质被提取而进入油脂试样中,因此在进行铜皂显色反应时,这些水溶性的酸性物质就会从有机相进入铜皂染色液(水相),从而不同程度地降低铜皂染色液的 pH,抑制了其对 FFA 的显色强度。所以,用新铜皂比色法测定含油食品的酸价时,预先对油脂样液进行水洗,去除其中可能存在的水溶性酸性物质是十分必要的。

## 2.6 新铜皂比色法对 FFA 测定特异性的研究

### 2.6.1 油溶性非 FFA 类酸性物质对新铜皂比色法测定酸价的影响

山梨酸和苯甲酸是食品中常用的两种防腐剂,在食品中的最大添加限量可达 1 000 mg/kg<sup>[24]</sup>,它们也是典型的油溶性非 FFA 类酸性物质。图 3 和图 4 分别是添加山梨酸和苯甲酸的大豆油用酸碱滴定法<sup>[12]</sup>和新铜皂比色法测定酸价的结果对比。

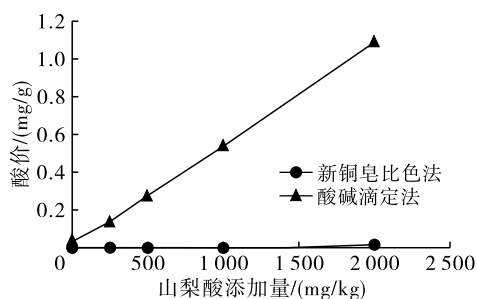


图 3 两种方法测定的添加山梨酸的大豆油的酸价

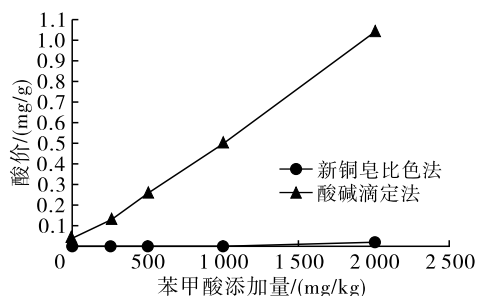


图 4 两种方法测定的添加苯甲酸的大豆油的酸价

由图 3、图 4 可知,随着大豆油中山梨酸、苯甲酸添加量的增加,酸碱滴定法测得的酸价快速上升,当大豆油中山梨酸、苯甲酸添加量为 2 000 mg/kg 时,酸碱滴定法测得的酸价从不到 0.10 mg/g (0.04 mg/g),上升至接近、甚至大于 1.0 mg/g (苯甲酸

0.91 mg/g,山梨酸 1.11 mg/g),而采用新铜皂比色法测得的酸价仍小于 0.10 mg/g,说明新铜皂比色法可有效排除诸如山梨酸或苯甲酸此类油溶性非 FFA 类酸性物质对酸价测定的干扰。

### 2.6.2 食用香精香料对新铜皂比色法测定酸价的影响

表 7 和表 8 分别是用酸碱滴定法和新铜皂比色法测定配料中不含食用香精香料和含有食用香精香料的油基调味酱的酸价。

表 7 两种方法对不含食用香精香料的调味酱的酸价测定结果

样品编号	酸价/(mg/g)		相对偏差/%
	酸碱滴定法 <sup>[12]</sup>	新铜皂比色法	
FD17	1.4	1.4	0.0
FD18	1.2	1.1	-8.3
FD19	1.8	1.7	-5.6
FD20	2.3	2.1	-8.7
FD21	4.6	4.3	-6.5

表 8 两种不同方法对含有食用香精香料的调味酱的酸价测定结果

样品编号	酸价/(mg/g)		相对偏差/%
	酸碱滴定法 <sup>[12]</sup>	新铜皂比色法	
FD22	0.57	0.26	-54.4
FD23	0.79	0.44	-44.3
FD24	0.28	0.18	-35.7
FD25	1.00	0.46	-54.0
FD26	1.00	0.77	-23.0

由表 7 和表 8 可知:配料中不含食用香精香料的调味酱,其新铜皂比色法测定的酸价与酸碱滴定法测定的酸价十分接近,相对偏差均小于 10%;而配料中含有食用香精香料的调味酱的酸价测定结果相对偏差很大。可能是由于添加的食用香精香料本身是酸性的,升高了酸碱滴定法测定的酸价,而新铜皂比色法是 FFA 的特异性测定技术,能避免添加的食用香精香料对酸价测定的干扰。

食用香精香料是一类比较特殊的食品添加剂,与其他食品添加剂相比,食用香精香料没有添加限量,而且除了诸如动植物油脂、鲜乳、饮用水等少数几类食品外,可在各类食品中添加<sup>[24]</sup>。另外,在各种食用香精香料中,有相当部分其本身就是酸性的<sup>[25]</sup>,或具有较高的酸性背景<sup>[26-29]</sup>,因此食用香精香料极有可能提高酸碱滴定法测定的含油食品的酸价。

### 2.7 新铜皂比色法测定酸价的回收率

表 9 是不同的油酸添加水平下,新铜皂比色法酸价测定的回收率(以酸价对应的油酸含量计算)。



表9 新铜皂比色法的回收率

油酸添加量/ %	酸价/ (mg/g)	换算的油酸 含量/%	回收率/ %
0.28	0.52	0.26	92.9
0.80	1.50	0.75	93.8
2.30	4.20	2.10	91.3

由表9可知,新铜皂比色法测定酸价的回收率为91.3%~93.8%,说明回收率良好。

### 2.8 新铜皂比色法测定酸价的重复性

表10是采用新铜皂比色法测定5个不同酸价水平的油脂试样酸价的重复性实验结果。

表10 新铜皂比色法测定酸价的重复性

水平 编号	酸价/(mg/g)					平均值/ (mg/g)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5		
1	0.15	0.14	0.14	0.15	0.14	0.15	2.66
2	0.71	0.72	0.69	0.72	0.73	0.72	1.98
3	1.69	1.64	1.68	1.68	1.62	1.66	1.76
4	2.53	2.54	2.55	2.53	2.54	2.54	0.29
5	4.81	4.83	4.81	4.80	4.80	4.81	0.23

由表10可知,相对标准偏差均小于3%,说明重复性良好。

### 2.9 新铜皂比色法与酸碱滴定法测定酸价的一致性

以40个不同品种、不同制油工艺和不同加工等级的食用动植物油脂为样品群对新铜皂比色法和酸碱滴定法<sup>[12]</sup>测定酸价进行比对,测定结果进行线性回归分析,结果见图5。

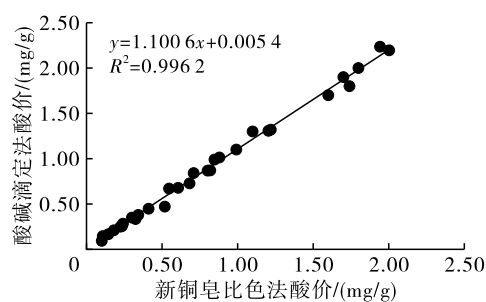


图5 两种方法测定40个动植物油脂酸价的线性回归

由图5可知,这两种酸价测定方法回归方程的相关系数( $R^2$ )大于0.996,表明新铜皂比色法的酸价测定结果与传统酸碱滴定法的一致性良好,这两种酸价测定方法是等效的。

没有采用油脂制品和含油食品为样品群对这两种酸价测定方法进行比对,主要是由于油脂制品和含油食品中往往会添加各种食品添加剂和食用香精香料,其中不少是酸性物质,会干扰酸碱滴定法的酸价测定结果;而按照GB 2760—2014<sup>[24]</sup>的规定,食

用动植物油脂中是不允许添加食用香精香料的,且常见的、可添加的食品添加剂品种中,也无酸性物质,因此采用了食用动植物油脂进行两种酸价测定方法的比对研究。

## 3 结论

新铜皂比色法是一种准确、便捷、更适合油脂和含油食品的酸价测定技术。用环己烷替代传统的高毒试剂苯,作为新铜皂比色法的有机相溶剂,可解决固体油脂在常温下溶解稳定性的问题,对液态油脂酸价的定量测定范围在0.1~5.0 mg/g,对固态油脂的为0.2~10.0 mg/g,液态油脂酸价的定量限为0.10 mg/g,固态油脂的定量限为0.20 mg/g,回收率在91.3%~93.8%,重复性实验相对标准偏差小于3%,可满足各类食用动植物油脂、油脂制品和含油食品对酸价测定的要求。含油食品中提取的油脂试样须先经水洗处理后方可进行新铜皂比色法的酸价测定,食用动植物油脂则不必水洗。与传统酸碱滴定法相比,新铜皂比色法具有特异性和试样少的优势:可对10碳及其以上不同不饱和度FFA的特异性测定,能排除油脂中山梨酸、苯甲酸等酸性油溶性添加剂和酸性食用香精香料对酸价测定的干扰,单次酸价测定仅需要1 g油脂样品,可有效解决含油食品酸价测定时特异性与大称样量要求的行业难题。在排除了非FFA类酸性物质的干扰后,新铜皂比色法和酸碱滴定法的测定结果一致。

## 参考文献:

- [1] Animal and vegetable fats and oils: determination of acid value and acidity: ISO 660(2020) [S]. Switzerland: ISO Press, 2020.
- [2] Acidvalue of fats and oils: official methods and recommended practices of the AOCS: Cd 3d-63 [S]. 7th ed. USA: AOCS Press, 2017.
- [3] BAKER D. A colorimetric method for determining free fatty acids in vegetable oils [J]. J Am Oil Chem Soc, 1964, 41 (1): 21-22.
- [4] LOWRY R R, TINSLEY I J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 1976, 53(7): 470-472.
- [5] KWON D Y, RHEE J S. A Simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay [J]. J Am Oil Chem Soc, 1986, 63(1): 89-92.
- [6] CHEN Q S, WANG X C, CONG P X, et al. Mechanism of phospholipid hydrolysis for *Oyster crassostrea plicatula* phospholipids during storage using shotgun lipidomics [J]. Lipids, 2017, 52(12): 1045-1058.
- [7] VÁZQUEZ M, FIDALGO L G, SARAIVA J A, et al.



- Preservative effect of a previous high - pressure treatment on the chemical changes related to quality loss in frozen hake (*Merluccius merluccius*) [J]. Food Bioprocess Tech, 2018, 11 :293 - 304.
- [8] OUCIF H, MIRANDA J M, MEHIDI S A, et al. Effectiveness of a combined ethanol - aqueous extract of alga *Cystoseira compressa* for the quality enhancement of a chilled fatty fish species[J]. Eur Food Res Technol, 2018, 244:291 - 299.
- [9] CARVAJAL A K, MOZURAITYTE A, STANDAL I B, et al. Antioxidants in fish oil production for improved quality [J]. J Am Oil Chem Soc, 2014, 91(9): 1611 - 1621.
- [10] SONG D, CHEN M, CHENG H. Collagen - immobilized lipases show good activity and reusability for butyl butyrate synthesis[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2016, 180(5): 826 - 840.
- [11] YU T, CAO X. Effect of chaotropes on lipase back extraction recovery in the process of reverse micellar extraction [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172 (6): 3287 - 3296.
- [12] 食品安全国家标准 食品中酸价的测定: GB 5009. 229—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [13] 胡琴, 黄庆华. 分析化学[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [14] BAINS G S, RAO S V, BHATIA D S. Acolorimetric procedure for the estimation of fat acidity in peanuts and peanut meals[J]. J Am Oil Chem Soc, 1964, 41: 831 - 832.
- [15] 程能林. 溶剂手册[M]. 5版. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [16] 大豆油: GB/T 1535—2017[S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- [17] 棉籽油: GB/T 1537—2019[S]. 北京:中国标准出版社,2019.
- [18] 棕榈油: GB/T 15680—2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [19] 食品安全国家标准 食用油脂制品: GB 15196—2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [20] 食品安全国家标准 方便面: GB 17400—2015[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [21] 食品安全国家标准 糕点、面包: GB 7099—2015[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [22] 食品安全国家标准 坚果与籽类食品: GB 19300—2014 [S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- [23] 汪东风. 高级食品化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [24] 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- [25] 香料 2 - 甲基戊酸:QB/T 5059—2017[S]. 北京:中国轻工业出版社, 2017.
- [26] 食品安全国家标准 食品添加剂 山楂核烟熏香料: GB 1886. 127—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社,2016.
- [27] 食品安全国家标准 食品添加剂 肉桂醛: GB 28346—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [28] 食品安全国家标准 食品添加剂 中国肉桂油: GB 1886. 207—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [29] 食品安全国家标准 食品添加剂 杭白菊花浸膏: GB 1886. 118—2015[S]. 北京:中国标准出版社,2015.
- 
- (上接第 104 页)
- [23] JIN J, PANSEERAT S, KAMALAM B S, et al. Insulin regulates lipid and glucose metabolism similarly in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content[J]. Gen Comp Endocr, 2014, 204: 49 - 59.
- [24] PÉREZ - MATUTE P, PEREZ - ECHARRI N, MARTINEE J A, et al. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high - fat - fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor - alpha[J]. Brit J Nutr, 2007, 97(2): 389 - 398.
- [25] PROSTEK A, GAJEWSKA M, KAMDOLA D, et al. The influence of EPA and DHA on markets of inflammation in 3T3 - L1 cells at different stages of cellular maturation [J]. Lipids Health Dis, 2014, 13:1 - 9.
- [26] LORENTE - CEBRIAN S. Eicosapentaenoic acid up - regulates apelin secretion and gene expression in 3T3 - L1 adipocytes[J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54: 104 - 111.
- [27] CALDER P C. Omega - 3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man[J]. Biochem Soc T, 2017, 45(5): 1105 - 1115.
- [28] MIRJANA V, DRAGAN V, VESNA V, et al. Clinical benefits of n - 3 PUFA and  $\gamma$  - linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis[J/OL]. Nutrients, 2017, 9(4): 325 [2020 - 09 - 21]. <https://doi.org/10.3390/nu9040325>.
- [29] SANHUEZA C, RYAN L, FOXCROFT D R. Diet and the risk of unipolar depression in adults: systematic review of cohort studies[J]. J Hum Nutr Diet, 2012, 26:56 - 70.
- [30] PETER M, VADADI K S. Highly purified ethyl EPA and other EPA derivatives for psychiatric and neurological disorders; CN1338929A[P]. 2020 - 03 - 06.