

# 酸价的特异性检测方法——铜皂络合比色技术的研究进展

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

(1. 上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海食品快速检测工程技术研究中心, 上海 200093; 2. 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司, 上海 200137; 3. 月旭科技(上海)股份有限公司, 上海 201613; 4. 贝雷(上海)生物科技有限公司, 上海 201203)

**摘要:**酸价(acid value, AV)指示油脂中游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)含量,是油脂和含油食品最重要的质量指标和安全指标之一。针对现行AV测定标准的酸碱中和滴定技术的共性与非特异性的局限,旨在给复杂基质样品的特异性定量FFA或AV提供新思路,综述了最具代表性的FFA特异性检测技术——铜皂络合比色法的近70年的研究进展。阐述了有机相溶解液的毒性与显色强度之间的矛盾化解历程、铜盐-吡啶水相染色液的演化史、FFA的铜皂络合物结构解析过程,以及从pH调控的经典络合显色理论到以吡啶与铜离子摩尔比为核心的络合显色理论的新发展。吡啶与铜离子摩尔比为[1,3]的络合显色理论、具有增强显色强度和抑制乳化作用的乙酸盐-乙酸缓冲体系的中性染色液、低毒性溶剂替代传统高毒性苯的有机相溶解液,这三大创新使经典铜皂络合比色法突破了长期存在的试剂毒性与显色稳定性等瓶颈,成为复杂基质样品的特异性定量FFA或AV的理想方法。

**关键词:**铜皂络合比色法;酸价;油脂;特异性检测

中图分类号:TS227;TS207

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)03-0110-07

## Progress on cupric acetate – pyridine colorimetric method for specific quantitative determination of acid value

CAO Wenming<sup>1,2</sup>, XUE Bin<sup>3,4</sup>, TU Bingfang<sup>3</sup>

(1. 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; 2. Wilmar (Shanghai) Biotechnology Research & Development Center Co., Ltd., Shanghai 200137, China; 3. Welch Materials Inc., Shanghai 201613, China; 4. Beilei (Shanghai) Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Acid value (AV) indicates the content of free fatty acids (FFA) in oils and fats, which is one of the most important quality and safety indicators of oils and fats and oily foodstuffs. In view of the commonness and non-specificity limitations of the current acid-base neutralization titration techniques for AV determination standards, a new idea for the specific quantification of FFA or AV in complex matrix samples is aimed to offer. The research progress of cupric acetate – pyridine complexation colorimetry, the most representative technology for the specific determination of FFA in the nearly 70 years, was reviewed. The conflict resolution process between the toxicity of organic phase solution and color intensity, the evolution history of cupric acetate – pyridine colorimetric aqueous phase dyeing

收稿日期:2021-10-28;修回日期:2021-12-26

基金项目:食品安全国家标准制修订项目(spaq-2020-40)

作者简介:曹文明(1964),男,研究员,博士,主要从事油脂化学与食品分析方面的研究工作(E-mail) caowenming@cn.wilmar-intl.com。

solution, the structure analysis process of cupric acetate – pyridine complex of FFA, and the new development of complexation color theory from the classical theory with pH regulation to the new theory with pyridine/copper ion mole ratio as the core were described. Pyridine/copper ions mole

ratio [1, 3) of the complexation color theory, acetate - acetic acid buffer's neutral dyeing liquid with enhancement of color strength and inhibition of the emulsification, low toxic solvent instead of traditional high toxicity of benzene dissolved organic phase, three big innovation make the classic colorimetric method break through the bottleneck of toxicity and color stability etc. , which is expected to be an ideal method for the specific quantification of FFA or AV in complex matrix samples.

**Key words:** cupric acetate - pyridine colorimetric method; acid value; oils and fats; specific quantitative determination

酸价 (acid value, AV) 反映油脂中游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 含量, 是油脂最重要的质量等级指标之一, 也是食用油脂和含油食品的安全指标。自 1940 年美国油脂化学家学会 (American Oil Chemists Society, AOCS) 颁布酸碱中和滴定法测定酸价以来, 该酸价测定方法相继被全球各标准化组织采用。由于酸碱中和滴定技术无法区分非 FFA 的有机酸和无机酸<sup>[1]</sup>, 是 FFA 的非特异性检测方法, 当应用于含油食品等复杂基质的酸价测定时, 酸价正偏差的检测结果极大地困扰食品行业。对于特异性定量测定 FFA 的技术, 较系统的报道仅限于金属络合法, 其中最具代表性的是铜皂络合比色法, 其技术雏形始于 20 世纪 50 年代。近 70 年来, 因对铜皂络合理论的认识局限, 以及高毒试剂、显色稳定性等技术瓶颈, 铜皂络合比色法在定量检测油脂 FFA、评价脂肪酶活性、脂质代谢等领域的应用受到限制。直到 2020 年, 铜皂络合显色理论取得了新的进展, 突破了长期存在的络合显色技术瓶颈, 形成了具有高度特异性和稳定性的新铜皂络合比色法。本文旨在针对酸价测定的酸碱中和滴定技术的共性和非特异性的局限, 阐述特异性测定 FFA 技术中最

具代表性的铜皂络合比色法的技术演变和创新发展历程, 展望新铜皂络合比色法在突破若干技术瓶颈后的应用优势, 为准确定量复杂基质中 FFA 或酸价测定提供一种理想的特异性方法。

## 1 现行油脂酸价检测技术概况

### 1.1 酸价的本质内涵

酸价, 也称酸值, 是指中和 1 g 油脂中所有的 FFA 所需消耗的氢氧化钾 (KOH) 的质量 (毫克)<sup>[1]</sup>, 可反映油脂受脂肪酶等催化发生氧化水解反应的程度。制油过程中, 动植物油料的天然细胞结构被破坏, 同时释放出脂肪酶混合于油脂中, 使油脂在加工和储存过程中可能不断地发生氧化水解反应产生 FFA<sup>[2-4]</sup>。油脂中 FFA 总含量高, 会造成油脂的烟点降低、氧化劣变加快、营养成分破坏、不良气味等负面作用。FFA 总含量是反映油脂氧化水解酸败<sup>[5]</sup>最直接的标志, 酸价既是食用动植物油脂及制品重要的安全指标<sup>[6-9]</sup>, 也是食用植物油产品分级的主要质量指标之一。

酸价仅当表示油脂中 FFA 百分含量时与酸度同义, 但单位不同。在我国国家标准中, 其他酸度、脂肪酸值等概念都与酸价含义无关, 如表 1 所示。

表 1 国家标准中与酸价易混淆的概念

指标	应用食品范围	检测目标物质	检测时样品溶解/ 提取的溶剂	指标单位	依据标准
<sup>a</sup> 酸价(酸值)	食用油脂、含油食品、油料	FFA 总含量	乙醚与异丙醇的混合液等有机溶剂	mg/g(以 KOH 质量计)	[1, 10]
	<sup>a</sup> 食用油脂	FFA 总含量	同上	%	[1]
酸度	乳粉	水溶性酸性物质总量	水	<sup>0</sup> T 或 mL/100 g(100 g 干物质为 12% 的复原乳所消耗的 0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液体积)	
	巴氏杀菌乳、灭菌乳、生乳、发酵乳、炼乳和干酪素	水溶性酸性物质总量	水	<sup>0</sup> T 或 mL/100 g(100 g 样品所消耗的 0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液体积)	[11]
	奶油	溶于乙醇 - 乙醚混合液的酸性物质总量	乙醚与乙醇混合液	<sup>0</sup> T 或 mL/100 g(100 g 样品所消耗的 0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液体积)	

续表 1

指标	应用食品范围	检测目标物质	检测时样品溶解/ 提取的溶剂	指标单位	依据标准
酸度	淀粉及其衍生物、 粮食及其制品	水溶性酸性物 质总量	水	$^{\circ}\text{T}$ 或 mL/10 g(10 g 试样所消耗的 0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液体 积)	
脂肪酸值	粮食、油料	FFA 总含量	苯	mg/100 g(干基,以 KOH 质量计)	[12]
	谷物及其制品	FFA 总含量	无水乙醇	mg/100 g(干基,以 KOH 质量计)	[13]
	谷物研磨制品	FFA 总含量	95% 乙醇	mg/100 g(干基,以 KOH 或 NaOH 质量计)	[14]

注:a 表示本质上相同的两个理化指标。

1.2 酸价测定的滴定技术共性与非特异性局限 法<sup>[1,10,15-18]</sup>,无一例外都采用了酸碱中和滴定技术,目前国际上酸价或 FFA 总含量检测的标准方 详见表 2。

表 2 酸价和 FFA 总含量测定的标准方法

标准编号	适用范围					
	精炼动植物 油脂	非精炼动植物 油脂	油脂制品	脂肪酸制品	乳脂	含油食品
ISO 660:2020 <sup>[1]</sup>	√	√	√	√	×	×
AOCS Cd 3d-63 <sup>[15]</sup>	√	√	√	√	×	×
AOCS Ca 5a-40 <sup>[16]</sup>	√	√	×	×	×	×
AOAC 940.28 <sup>[17]</sup>	√	√	×	×	×	×
AOAC 969.17 <sup>[18]</sup>	×	×	×	×	√	×
GB 5009.229—2016 <sup>[10]</sup>	√	√	√	×	×	√

酸碱中和滴定检测技术分为 3 种:冷溶剂指示剂滴定、热乙醇指示剂滴定和冷溶剂自动电位滴定。AOCS Cd 3d-63、AOCS Ca 5a-40、AOAC 940.28 和 AOAC 969.17 在其各自的应用范围内只规定了冷溶剂指示剂滴定检测技术;而 ISO 660:2020 却同时采用了这 3 种滴定技术,并规定了冷溶剂指示剂滴定检测技术和冷溶剂自动电位滴定技术均为参考方法。我国现行的酸价检测食品安全国家标准(GB 5009.229—2016)与 ISO 660:2020 的技术同步而应用范围各异<sup>[10]</sup>。

酸碱中和滴定不是 FFA 的特异性检测技术,根据酸碱中和滴定技术的基本原理<sup>[19]</sup>,油脂中所有的酸性强度大于或接近于 FFA 酸性强度的有机酸类物质和无机酸类物质,都会在滴定时与标准滴定溶

液中的 KOH 或 NaOH 发生酸碱中和反应,导致酸价检测结果偏高。

酸碱滴定技术的非特异性弊端,对于食用动植物油脂的酸价测定影响并不大,因为一般情况下,各类食用油脂中主要的天然酸性物质就是 FFA。但是,对于基质复杂的含油食品,其中的非 FFA 类酸性天然产物、酸性食品添加剂和酸性美拉德反应产物等(见表 3),都可能溶解于提取的油脂样品中,导致酸价检测结果偏高。薛斌等<sup>[33]</sup>研究指出,未添加食用香精香料的调味酱,其自动电位滴定法的酸价测定值与铜皂络合比色法的测定值相差无几,但添加食用香精香料的调味酱,其自动电位滴定法的酸价测定值就显著偏高。因此,铜皂络合比色法在酸价测定时可以免受酸性食用香精香料的干扰。

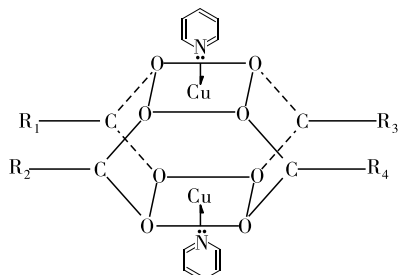
表 3 可能存在食品中的酸性物质

物质分类	具体举例
天然产物 <sup>[20-24]</sup>	磷脂酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、咖啡酸、芥子酸、反式肉桂酸、没食子酸、对羟基苯甲酸、绿原酸……
食品添加剂	乙酸、丙酸、山梨酸、苯甲酸、脱氢乙酸、双乙酸钠……
食用香精香料 <sup>[25]</sup>	肉桂酸、3-甲基戊酸、2-甲基-2-戊烯酸、水杨酸、丁酸、乙基麦芽酚……
氧化反应产物 <sup>[26-27]</sup>	乙酸、戊酸、己酸、乙酰丙酸、异戊酸……
美拉德反应产物 <sup>[28-32]</sup>	乙酸、丙酸、丁酸、己酸、甲基丁酸、苯乙酸……

## 2 特异性定量 FFA 的经典铜皂络合比色法

### 2.1 铜皂络合比色法的两相络合技术及其适用范围

铜皂络合比色法是一种用于测定油脂中 FFA 总含量的技术<sup>[34-36]</sup>,该技术是将油脂试样溶于烃类溶剂作为有机相,用吡啶-铜离子的络合离子染色液作为水相,进行液-液双相反应,反应过程中水相中的络合离子会与有机相中的各种 FFA 发生反应,形成三位一体的(吡啶-铜离子-脂肪酸根离子)铜皂络合物,易溶于有机相的铜皂络合物显现特殊的靛蓝色,在 700 nm 波长附近有特征吸收峰,且符合朗伯-比尔定律,从而可以准确定量。铜皂络合物结构以及铜皂络合反应示意图如图 1 和图 2 所示。



注:R<sub>1</sub>~R<sub>4</sub> 分别为不同脂肪酸碳链。

图 1 铜皂络合物结构

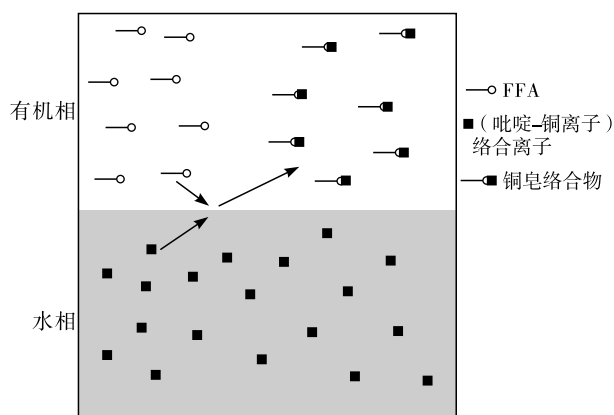


图 2 铜皂络合反应示意图

有研究指出,铜皂络合比色法仅对 C8 及其以上的中长碳链 FFA 有显色反应,而对 C8 以下的短碳链脂肪酸无显色反应<sup>[33,36]</sup>(FFA 的碳数与 FFA 铜皂络合反应后吸光度的相对强度关系如图 3 所示)。

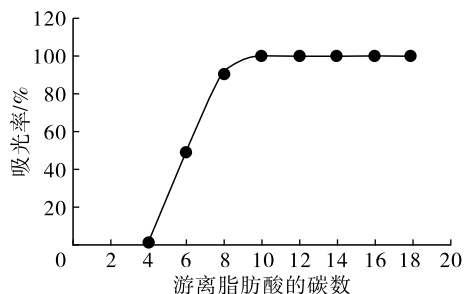


图 3 不同碳链长度 FFA 铜皂络合反应后吸光度的相对强度<sup>[36]</sup>

相比于酸碱中和滴定技术,铜皂络合比色法可避免溶解在油脂中的山梨酸和苯甲酸等对酸价检测的干扰<sup>[33]</sup>。铜皂络合比色法是食用油脂中各种天然 FFA 的特异性检测技术。

### 2.2 经典铜皂络合比色法的技术演变与发展瓶颈

铜皂络合比色法研究始于 20 世纪 50 年代。日本 Iwayama<sup>[37]</sup> 研究发现,在三乙醇胺存在的条件下,脂肪酸的硝酸铜溶液能够溶于氯仿,使 C10~C22 的 FFA 所形成的铜盐转移入有机相并显现蓝色,在 691 nm 波长处测定吸光度,所测得的吸光度与 FFA 含量在 7.5~150 mg/L FFA 质量浓度范围内呈线性关系。这就是铜皂络合比色技术的雏形。

1964 年,美国 Baker<sup>[34]</sup> 使用乙酸铜水溶液为水相染色液,苯作为有机相,率先应用于检测植物油脂中 FFA 总含量。

1976 年,美国 Lowry 等<sup>[35]</sup> 首次初步阐明了铜皂络合物的结构,建立了苯为有机相、乙酸铜水溶液(吡啶调节 pH 至 6.0~6.2)为水相染色液的技术框架,至此经典的铜皂络合比色法基本定型并沿用至今。但是由于对铜皂络合显色理论认识的局限,过窄的 pH 范围(pH 6.0~6.2)使实验操作难度较大,剧毒试剂苯与替代有机相显色强度的矛盾,以及显色稳定性等因素限制了该方法的广泛应用。

1986 年,韩国 Kwon 等<sup>[36]</sup> 首次建立以异辛烷替代苯为有机相、乙酸铜-吡啶为水相的改良铜皂络合比色法,并用于测定 FFA,将其应用于脂肪酶活性的研究发现,铜皂络合比色法仅适用 C8 以上 FFA 的检测,FFA 碳链长度对显色强度无显著影响。但是,异辛烷替代苯为有机相,铜皂络合物显色强度锐减了 2/3,灵敏度大幅下降,对固态油脂溶解稳定性差等弊端凸显。

从 1976 至今,经典的铜皂络合比色法测定 FFA 在脂肪酶活性评价、脂质组学的研究报道未曾间断,其中包括铜皂络合比色法用于谷物脂肪酸值的测定(2012 年)<sup>[38]</sup>,采用铜皂络合比色法监测水产及其制品在长期储存过程中所含油脂成分中 FFA 总含量的变化情况以评价水产及其制品在储存过程中品质变化规律(2014—2017 年)<sup>[39-41]</sup>。在酶学研究中,一直以来都采用铜皂络合比色法测定脂肪酶水解产物中 FFA 总含量(2011—2016 年)<sup>[42-44]</sup> 来评价脂肪酶的活性。2017 年 Chen 等<sup>[45]</sup> 在运用脂质组学方法研究牡蛎在储存过程中磷脂类物质的代谢机理时发现,牡蛎的代谢产物会引起 pH 的变化,干扰了酸碱滴定法测定 FFA 的结果,而改用铜皂络合比色法测定 FFA 则可以避免此缺陷。

2021 年报道了以低毒溶剂环己烷替代高毒的苯作为有机相,解决了用铜皂络合比色法检测固态油脂酸价的问题,并验证了酸性添加剂和食用香精对传统酸碱滴定法检测酸价的干扰。铜皂络合比色法可特异性定量复杂基质样品中油脂 FFA 总含量,免受非 FFA 的有机酸和无机酸的干扰<sup>[33]</sup>。

### 3 铜皂络合比色法的技术进展

#### 3.1 铜皂络合显色理论创新

##### 3.1.1 铜皂络合反应原理新发现

经典的铜皂络合比色法,要求铜皂染色液 pH 严格维持在 6.0~6.2,偏离该狭窄 pH 区间则会导致铜皂络合显色强度大幅降低<sup>[35-36]</sup>。进一步研究发现:铜皂染色液中吡啶分子与铜离子的物质的量比(以下简称摩尔比,MR)才是决定铜皂络合显色反应的关键<sup>[46]</sup>。MR 大于等于 3 时,无论铜皂染色液的 pH 如何变化,都失去了对 FFA 进行铜皂络合显色反应的能力。根据金属离子络合原理推导的络合机制,在水溶液中铜离子与吡啶分子形成铜-吡啶络合物离子( $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_n]^{2+}$ ,  $n=1\sim 4$ ),铜离子作为中心离子,可以与配位体吡啶分子络合形成 1~4 个不同配位数<sup>[47]</sup>的络合物。络合的吡啶分子数目越多,形成的络合物也越稳定,如表 4 所示。

表 4 不同数目配位体的铜-吡啶络合物离子的稳定系数<sup>[47]</sup>

吡啶配位体的数目( $n$ )	形成的铜-吡啶络合物离子的稳定系数( $\lg\beta_n$ )
1	2.59
2	4.33
3	5.93
4	6.54

##### 3.1.2 铜皂络合反应的抑制

根据表 4 的数据推测,铜离子、吡啶分子和 FFA 形成的铜皂络合物的稳定系数( $\lg\beta_n$ )应当在(4.33, 5.93)范围内。所以,当 MR 在[1,3)范围时,铜皂染色液中总会存在一定量的 $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2]^{2+}$ 或 $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})]^{2+}$ 络合离子,正是这些含有 1 个或 2 个吡啶配位体数的铜-吡啶络合物离子直接与 FFA 进行了铜皂络合反应,形成了铜皂络合物。但当 MR 大于等于 3 时,铜皂染色液中所有的铜离子与吡啶分子形成 $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_3]^{2+}$ 或 $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]^{2+}$ ,这些含有 3 个或 4 个吡啶配位体数的铜-吡啶络合物离子的络合稳定系数大于与 FFA 形成的铜皂络合物,从而完全抑制了铜皂络合反应。

##### 3.1.3 铜皂络合显色理论突破

新铜皂络合比色法不必严控铜皂染色液的 pH 在 6.0~6.2 范围内的要求,论证了 MR 在[1,3)条

件下(MR 在 2 左右最优),铜皂染色液的 pH 达到 6.8 后(pH 6.8~7.5)显色强度最佳<sup>[46]</sup>。对新铜皂络合比色法研究证明,MR 在[1,3)条件下,铜皂染色液中主体络合物离子 $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_2]^{2+}$ ,在 pH 5~7 的水溶液中不仅可有效抑制铜离子形成氢氧化铜沉淀(当 pH > 5 时)<sup>[46]</sup>,而且不影响脂肪酸铜皂络合物的形成,而一旦 MR 达到 3 时,形成的 $[\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_3]^{2+}$ 会抑制铜皂络合物的形成。

经典铜皂络合比色法用吡啶将染色液 pH 调节到 6.0~6.2 之间时,MR 恰好接近 2,所以本质上已将染色液 MR 调节到最佳。

研究表明,MR 在 2 左右时用 10% 氢氧化钠水溶液不断调节升高铜皂染色液的 pH,铜皂络合反应的显色强度也会随之不断地增强。一旦染色液的 pH 大于 6.8,显色强度不再随 pH 的上升而明显增强<sup>[46]</sup>。其原因是各种中长碳链 FFA 的 pH 都在 4.8 左右<sup>[48]</sup>,属于弱酸。因此,随着铜皂染色液 pH 的升高,有机相中 FFA 的电离度不断加大,释放出 FFA 酸根离子的量也不断增加,导致更多的 FFA 酸根离子从有机相转移入水相,形成更多的铜皂络合物,铜皂络合显色强度因此不断增强,直到铜皂染色液的 pH 达到 6.8,此时有机相中的 FFA 已经 99% 解离为 FFA 酸根离子。

#### 3.2 缓冲盐染色液的增强显色与抑制乳化作用

##### 3.2.1 促进铜皂络合物向有机相迁移而增强显色强度与稳定性

新铜皂络合比色法采用 0.05~2.0 mol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液配制的铜皂染色液,降低了铜皂染色液的水活性,铜皂络合物在染色液(水相)的溶解度也相应降低,促进了络合反应后更多的铜皂络合物迁移进入有机相,从而增强了铜皂络合显色强度<sup>[46]</sup>。同时,由于缓冲液极化了铜皂络合物在水相和有机相之间的分配系数,最大程度降低了铜皂络合物在水相中的溶解度,从而缩小了铜皂络合物在水相中溶解度随温度变化的幅度,即进一步降低了温度对显色稳定性的影响。过高浓度的缓冲液(>2.0 mol/L),不利有机相中形成的 FFA 酸根离子在铜皂染色液中的溶解,使其难以完全与铜皂染色液中的铜离子和吡啶接触形成铜皂络合物,反而导致铜皂络合显色强度降低<sup>[46]</sup>。

##### 3.2.2 抑制铜皂络合反应时的乳化作用和水溶性酸性物质的干扰

从复杂基质的加工食品中提取的油脂会含有微量水溶性的酸性物质,如乙酸。对于缺乏缓冲盐的经典铜皂染色液,即使油脂样品中有极微量的乙酸,

也会破坏极窄范围的 pH 限制,使铜皂络合显色强度出现明显的降低,一旦 pH 低于 6.0,则显色强度剧烈下降<sup>[35-36]</sup>。新铜皂络合比色法染色液中的乙酸钠-乙酸缓冲液可高效维持稳定的 pH 环境,即使较高浓度的外来乙酸等酸性物也难以明显影响显色强度<sup>[46]</sup>。

相比于传统的纯水配制的铜皂染色液,用缓冲液配制的铜皂染色液,增强了铜皂染色液的离子强度,增大了水相和有机相的极性差异,因而降低了两相之间发生乳化作用的可能性。

### 3.3 破解非苯有机溶剂络合显色弱的难点

经典铜皂络合比色法中溶剂苯<sup>[34-35]</sup>是铜皂络合显色反应最佳的有机相溶剂,具有最强的显色强度。其他常见有机溶剂铜皂络合反应显色强度强弱

顺序为苯 > 甲苯 > 邻二甲苯 > 间二甲苯 ≈ 对二甲苯 > 环己烷 > C8 ~ C16 的直链烷烃 ≈ 异辛烷<sup>[46]</sup>。苯是高毒溶剂。在铜皂络合比色技术发展,有尝试用低毒溶剂异辛烷<sup>[36]</sup>作为有机相,但其显色强度和固脂溶解稳定性较差<sup>[33,46]</sup>。研究显示,以乙酸钠-乙酸缓冲液配制的铜皂染色液为水相,用环己烷替代苯为有机相的铜皂络合比色法,其显色强度达到经典铜皂络合比色法的 60% 以上,完全满足定量比色的灵敏度和稳定性要求<sup>[33]</sup>。同样条件下,若用低毒的甲苯或二甲苯(略有异味)替代高毒的苯为有机相,显色强度与经典铜皂络合比色法基本相当<sup>[46]</sup>。

### 3.4 新铜皂比色法与传统铜皂比色法的比较

传统铜皂比色法与新铜皂比色法技术上的主要差异对比见表 5。

表 5 传统铜皂比色法与新铜皂比色法技术上的主要差异对比

技术差异点	传统铜皂比色法	新铜皂比色法
有机相	早期:苯(显色强度最强,但高毒性) 后期:异辛烷和环己烷(低毒溶剂,但显色强度明显下降)	甲苯、邻二甲苯等(不仅低毒,而且显色强度与苯的基本相当)
染色液(水相)	乙酸铜的水溶液; 铜离子浓度与吡啶浓度间无任何技术性关联; pH 严格控制在 6.0 ~ 6.2。	乙酸铜的缓冲液(如乙酸钠-乙酸缓冲液等); 吡啶分子与铜离子的摩尔比在 [1,3] 之间(MR 在 2 左右最优); pH 控制在 6.8 ~ 7.5 的范围内。

## 4 结 语

在经典铜皂络合比色技术的基础上,经系统研究形成的新铜皂络合比色法,发展了吡啶-铜离子摩尔比为核心的新铜皂络合显色理论,解决了经典铜皂络合比色法显色强度易受 pH 变化影响、有机相只能用高毒溶剂苯才能达到高显色强度等问题,使铜皂络合比色技术的操作便捷性、稳定性、特异性显著提升。作为一种 FFA 的特异性检测技术,弥补了传统的酸碱中和滴定法无法区分 FFA 和其他油溶性酸性物质、油脂样品消耗量大等不足,更适合于复杂基质的加工食品的酸价检测,成为特异性定量 FFA 和 AV 的理想方法。

### 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] 汪东风. 高级食用化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 108-115.

[3] 汪东风. 食用化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2014: 94.

[4] DAMODARAN S, PARKIN K L, FENNEMA O R. 食品化学[M]. 江波, 杨瑞金, 译. 北京: 中国轻工业出版社,

2013: 94.

[5] 朱加虹. 浅谈油脂酸败及其过氧化值测定[J]. 食品工业, 2001(3): 44-46.

[6] 食品安全国家标准 植物油: GB 2716—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.

[7] 食品安全国家标准 食用油脂制品: GB 15196—2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 食品安全国家标准 食品酸度的测定: GB 5009. 239—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[12] 粮油检验 粮食、油料脂肪酸值测定: GB/T 5510—2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.

[13] 粮油检验 谷物及制品脂肪酸值测定 仪器法: GB/T 29405—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[14] 谷物碾磨制品 脂肪酸值的测定: GB/T 15684—2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[15] Acid value of fats and oils: AOCS official methods Cd 3d-63[S]. USA: AOCS Press, 2017.

[16] Free fatty acids in crude and refined fats and oils: AOCS

- official method Ca 5a - 40 [S]. USA: AOCS Press, 2017.
- [17] Fatty acids (free) in crude and refined oils; AOAC official method 940.28[S]. USA: AOAC Press, 2019.
- [18] Acid value of butterfat; AOAC official method 969.17 [S]. USA: AOAC Press, 2019.
- [19] 胡琴, 黄庆华. 分析化学[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 52 - 62.
- [20] 俞乐, 丛芳, 王兴国, 等. 不同来源大豆毛油磷脂组成的核磁检测及磷脂酸含量比较[J]. 中国油脂, 2017, 42(1): 130 - 133.
- [21] 邓斌, 张伟, 惠菊, 等. 橄榄油中极性伴随物研究状况[J]. 中国油脂, 2011, 36(4): 35 - 39.
- [22] 王强, 谢跃杰, 胡宝丹, 等. SPE - UHPLC - DAD 法测定植物油微量酚酸类化合物的方法研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(4): 118 - 125.
- [23] 罗凡, 费学谦, 李康雄, 等. 加工工艺对油茶籽油氧化稳定性及酚类物质含量的影响[J]. 农业工程学报, 2016, 32(14): 293 - 299.
- [24] 杨晓宇. 菜籽油中酚酸的定量分析及其对 HepG2 肝细胞脂毒性损伤的抑制研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2019.
- [25] 宁静, 马丽娅, 任志敏, 等. 乙基麦芽酚对酸价测定的影响[J]. 中国调味品, 2020, 45(3): 57 - 59.
- [26] 赵泽伟, 丁筑红, 顾苑婷, 等. 基于 SPME - GC - MS 和电子鼻分析苡仁油加速氧化过程挥发性成分变化[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 220 - 226.
- [27] 耿予欢, 苏向荣, 李国基. 鹅油热氧化与美拉德反应制备鹅肉香精[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 57 - 59, 164 - 172.
- [28] 宋焕禄. 分子感官科学[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 101 - 140, 241 - 256.
- [29] 郝卓丽, 杨萌, 刘亚敏, 等. 不同酶处理对鳕鱼挥发性风味物质影响的主成分分析[J]. 中国调味品, 2021, 46(8): 57 - 59.
- [30] 朱文政, 严顺阳, 徐艳, 等. 顶空固相微萃取 - 气质联用分析不同烹制时间红烧肉挥发性风味成分[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 247 - 253.
- [31] 刘欢, 张德权, 王振宇, 等. 北京烤鸭腿皮与腿肉关键挥发性风味物质解析[J]. 中国食品学报, 2021(2): 308 - 318.
- [32] 刘云花, 王强, 胡晖, 等. 热处理方式对低温压榨花生饼风味的影响[J]. 中国油脂, 2017, 42(11): 75 - 82.
- [33] 薛斌, 曹文明, 徐斐. 特异性定量测定油脂和含油食品酸价的新铜皂比色法[J]. 中国油脂, 2021, 46(8): 110 - 118.
- [34] BAKER D. A colorimetric method for determining free fatty acids in vegetable oils [J]. J Am Oil Chem Soc, 1964, 41(1): 21 - 22.
- [35] LOWRY R R, TINSLEY I J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 1976, 53(7): 470 - 472.
- [36] 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.
- [37] IWAYAMA Y. New colorimetric determination of higher fatty acids [J]. J Pharmaceut Soc Japan, 1959, 79: 552 - 554.
- [38] 姚云艳, 孙成. 铜皂比色法测定稻谷中脂肪酸的研究[J]. 食品工业, 2012, 33(5): 116 - 118.
- [39] 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 Technol, 2018, 11: 293 - 304.
- [40] MÉNDEZ L, FIDALGO L G, PAZOS M, et al. Lipid and protein changes related to quality loss in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) previously processed under high - pressure conditions [J]. Food Bioprocess Technol, 2017, 10(2): 296 - 306.
- [41] CARVAJAL A K, MOZURAITYTE R, STANDAL I B, et al. Antioxidants in fish oil production for improved quality [J]. J Am Oil Chem Soc, 2014, 91(9): 1611 - 1621.
- [42] SONG D W, CHEN M, CHENG H M. Collagen - immobilized lipases show good activity and reusability for butyl butyrate synthesis [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2016, 180(5): 826 - 840.
- [43] KAMARUDIN N H A, ABD RAHMAN R N Z R, ALI M S M, et al. Unscrambling the effect of C - terminal tail deletion on the stability of a cold - adapted, organic solvent stable lipase from *Staphylococcus epidermidis* AT2 [J]. Mol Biotechnol, 2014, 56(8): 747 - 757.
- [44] 侯爱军, 徐冰斌, 梁亮, 等. 改进铜皂 - 分光光度法测定脂肪酶活力 [J]. 皮革科学与工程, 2011, 21(1): 22 - 27.
- [45] 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.
- [46] 薛斌, 任兴发. 一种油脂酸价检测方法和试剂盒: CN201910893265.1[P]. 2021 - 03 - 23.
- [47] 李梦龙, 蒲雪梅. 分析化学数据速查手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 92.
- [48] 毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 48 - 49.