

中华人民共和国国家标准

GB 26400-2011

食品安全国家标准

食品添加剂

二十二碳六烯酸油脂（发酵法）

2011-03-15 发布

2011-05-15 实施

中华人民共和国卫生部 发布

食品安全国家标准

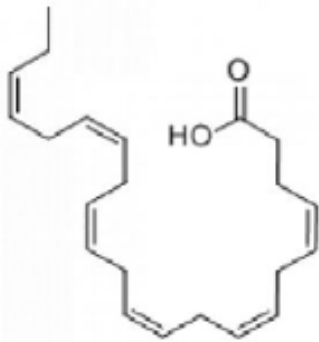
食品添加剂 二十二碳六烯酸油脂（发酵法）

1 范围

本标准适用于利用裂壶藻（*Schizochytrium sp.*）或者吾肯氏壶藻（*Ulkenia amoeboida*）或者寇氏隐甲藻（*Cryptocodinium cohnii*）菌种，经生物发酵制得的二十二碳六烯酸（DHA)油脂。

2 结构式和相对分子质量

2.1 结构式



2.2 相对分子质量

328.5（按 2007 年国际相对原子质量）

3 技术要求

3.1 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	浅黄色至橙黄色	取试样 10 mL，置于试管中，于自然光线下采用目测的方法观察其色泽及外观形态，采用鼻嗅的方法检查气味。
气味	具有本产品特有的气味	
组织状态	油状液体	

3.2 理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指标	检验方法
含量(以 C ₂₂ H ₃₂ O ₂ 甘油三酯计), w/%	≥	35.0 附录 A 中 A.3
不皂化物, w/%	≤	4.0 GB/T 5535.1 乙醚提取法
水分, w/%	≤	0.1 GB 5009.3 减压干燥法
不溶性杂质, w/%	≤	0.2 GB/T 15688
溶剂残留/ (mg/Kg)	≤	1.0 GB/T 5009.37
酸价 (以 KOH 计) / (mg/g)	≤	1.0 GB/T 5009.37
过氧化值/ (meq/kg)	≤	5.0 GB/T 5009.37 滴定法
反式脂肪酸, w/%	≤	1.0 GB 5413.36
黄曲霉毒素 B ₁ / (μg/kg)	≤	5.0 GB/T 5009.22
总砷(以 As 计)/ (mg/kg)	≤	0.1 GB/T 5009.11 氢化物原子荧光光度法
铅(Pb)/ (mg/kg)	≤	0.1 GB 5009.12 石墨炉原子吸收光谱法

4 其他要求

产品应装于适宜的避光容器中充氮或真空保存, 产品的最佳保存温度为-5℃以下。

附录 A 检验方法

A.1 安全要求

本检验方法中使用的部分试剂具有毒性和腐蚀性，操作时须小心谨慎。如溅到皮肤上应立即用水冲洗，严重者应立即治疗。使用易燃品时，严禁使用明火加热。

A.2 一般规定

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，检验用水符合GB/T 6682—2008中规定的三级水。检验中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602和GB/T 603的规定制备。

A.3 二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯的测定

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯标准品：纯度 $\geq 99\%$ 。

A.3.1.2 十三碳烷酸甘油三酯标准品：纯度 $\geq 99\%$ 。

A.3.1.3 氢氧化钾。

A.3.1.4 无水甲醇。

A.3.1.5 正庚烷，色谱纯。

A.3.1.6 石油醚，沸程， $30^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。

A.3.1.7 氢氧化钾甲醇溶液（4 mol/L）：称取22.4g氢氧化钾（A.3.1.3）于烧杯中，加入适量无水甲醇（A.3.1.4）使溶解，并转移至100mL的容量瓶中，当氢氧化钾甲醇溶液冷却至室温后，用无水甲醇稀释至刻度，摇匀。

A.3.1.8 二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯储备液（10 mg/mL）：称取250 mg（精确至0.000 1 g）二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯（A.3.1.1）于25 mL容量瓶中，加入适量正庚烷（A.3.1.5）使溶解，并稀释至刻度，摇匀。

A.3.1.9 十三碳烷酸甘油三酯内标储备液（10 mg/mL）：称取0.25g（精确至0.000 1 g）十三碳烷酸甘油三酯（A.3.1.2）于25 mL容量瓶中，加入适量正庚烷（A.3.1.5）使溶解，并稀释至刻度，摇匀。

A.3.1.10 标准工作溶液的配制

按表A.1分别移取适量二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯储备液（A.3.1.8）于6个10 mL容量瓶中，分别移入2.0 mL十三碳烷酸甘油三酯内标储备液（A.3.1.9），加入正庚烷（A.3.1.5）稀释至刻度，摇匀。

表 A.1 标准工作溶液中二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯含量

编号	加入二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯储备液的体积(mL)	标准工作溶液中二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯的浓度(mg/mL)
1	0	0
2	0.1	0.1
3	0.5	0.5
4	1.0	1.0

5	2.0	2.0
6	3.0	3.0

A. 3. 1. 11 氮气，纯度 $\geq 99.999\%$ 。

A. 3. 1. 12 氦气，纯度 $\geq 99.9999\%$ 。

A. 3. 2 仪器和设备

A. 3. 2. 1 气相色谱-质谱仪。

A. 3. 2. 2 气相色谱仪，配氢火焰离子化检测器。

A. 3. 2. 3 分析天平：感量为0.01 g、0.1 mg。

A. 3. 2. 4 离心机。

A. 3. 2. 5 振摇器。

A. 3. 3 定性分析

A. 3. 3. 1 二十二碳六烯酸（DHA）油脂

称取0.25 g（精确至0.01 g）试样于50 mL容量瓶中，加入适量正庚烷（A.3.1.5）使溶解，并稀释至刻度，摇匀。准确吸取2 mL正庚烷溶解液于10 mL带盖离心管中，加入0.2 mL氢氧化钾甲醇溶液（A.3.1.7），剧烈振荡1 min以上，放置10 min（甲基化反应）。如有机层浑浊，可离心使之澄清。取上层有机相溶液备用。

A. 3. 3. 2 测定

A. 3. 3. 2. 1 气相色谱条件

- 色谱柱：DB-5ms（30.0 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m）石英毛细管柱，或相当者；
- 柱温程序：100 $^{\circ}$ C保持3 min，以10 $^{\circ}$ C/min升至260 $^{\circ}$ C，保持8 min；
- 载气：氦气（A.3.1.12）；
- 流速：1.0 mL/min；
- 进样口温度：250 $^{\circ}$ C；
- 进样模式：分流进样（分流比为1：10）；
- 进样量：1 μ L。

A. 3. 3. 2. 2 质谱条件

- 离子源：EI源，70 eV；
- 接口温度：280 $^{\circ}$ C；
- 离子源温度：230 $^{\circ}$ C；
- 四极杆温度：150 $^{\circ}$ C；
- 数据采集模式：全扫描；
- 质量扫描范围：20 m/z ~330 m/z ；
- 溶剂延迟3.5min。

A. 3. 3. 3 结果判定

试样的质谱图应与二十二碳六烯酸（DHA）甲酯标准品的质谱图（附录B中图B. 1）一致。

A. 3. 4 定量分析

A. 3. 4. 1 原理

试样中二十二碳六烯酸（DHA）在氢氧化钾甲醇作用下，生成二十二碳六烯酸（DHA）甲酯，用配有氢火焰离子化检测器的气相色谱仪进行测定，以内标法定量，结果以二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯计。

A.3.4.2 试液的制备

A.3.4.2.1 二十二碳六烯酸（DHA）油脂试样溶液的制备

称取0.04 g试样（精确至0.000 1 g）于10 mL容量瓶中，加入2.0 mL十三碳烷酸甘油三酯内标储备液（A.3.1.9），以下按A.3.3.1“加入适量正庚烷（A.3.1.5）……取上层有机相溶液备用”操作。每份试液至少做两个平行样。

A.3.4.2.2 空白溶液的制备

除不加试样外按A.3.4.2.1所述方法进行处理。

A.3.4.3 标准工作溶液甲酯化处理

分别准确吸取A.3.1.10中系列标准工作溶液2 mL于10 mL带盖离心管中，以下按A.3.3.1自“加入0.2 mL氢氧化钾甲醇溶液（A.3.1.7）……取上层有机相溶液备用”操作。

A.3.4.4 测定

A.3.4.4.1 气相色谱条件

- a) 色谱柱：DB-23（30.0 m×0.25 mm×0.25 μm）石英毛细管柱，或相当者；
- b) 柱温程序：90 °C保持5 min，9 °C/min升至240 °C，保持5 min，3 °C/min升至250 °C；
- c) 载气：氮气（A.3.1.11）；
- d) 流速：1.33 mL/min；
- e) 进样口温度：250 °C；
- f) 进样模式：分流进样（分流比为1：100）；
- g) 检测器温度：300 °C；
- i) 进样量：1 μL。

A.3.4.4.2 标准曲线的绘制

按A.3.4.4.1所列测定条件，将甲酯化后的标准工作溶液依次进样，测量二十二碳六烯酸（DHA）甲酯和十三碳烷酸甲酯的峰面积。二十二碳六烯酸（DHA）甲酯的峰面积与标准工作溶液中二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯的浓度成正比。以标准工作溶液中二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯的浓度（mg/mL）为横坐标，以二十二碳六烯酸（DHA）甲酯与十三碳烷酸甲酯的峰面积比为纵坐标，绘制标准曲线。二十二碳六烯酸（DHA）甲酯和十三碳烷酸甲酯的色谱图参见附录C中图C.1。

按公式（A.1）计算回归参数：

$$y = (a \times x) + b \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

y ——二十二碳六烯酸（DHA）甲酯与十三碳烷酸甲酯的峰面积比；

a ——回归曲线的斜率；

x ——标准工作溶液中二十二碳六烯酸（DHA）甘油三酯的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

b ——回归曲线的截距。

A.3.4.4.3 试液的测定

将空白溶液 (A.3.4.2.2) 和试样溶液 (A.3.4.2.1) 依次进样, 扣除空白值, 获得二十二碳六烯酸 (DHA) 甲酯与十三碳烷酸甲酯的峰面积比。

A. 3. 4. 5 结果计算

试样中二十二碳六烯酸 (DHA) 甘油三酯的含量 X_1 按公式 (A.2) 计算:

$$X_1 = \frac{y-b}{a} \times V \times \frac{1}{m} \times 100\% \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

X_1 ——试样中二十二碳六烯酸 (DHA) 甘油三酯含量, %;

y ——试液甲酯化后二十二碳六烯酸 (DHA) 甲酯与十三碳烷酸甲酯的峰面积比;

a ——回归曲线的斜率;

b ——回归曲线的截距;

V ——试液最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m ——试样的质量, 单位为毫克 (mg)。

如含量以二十二碳六烯酸 (DHA) 计, 乘以换算系数0.9597。

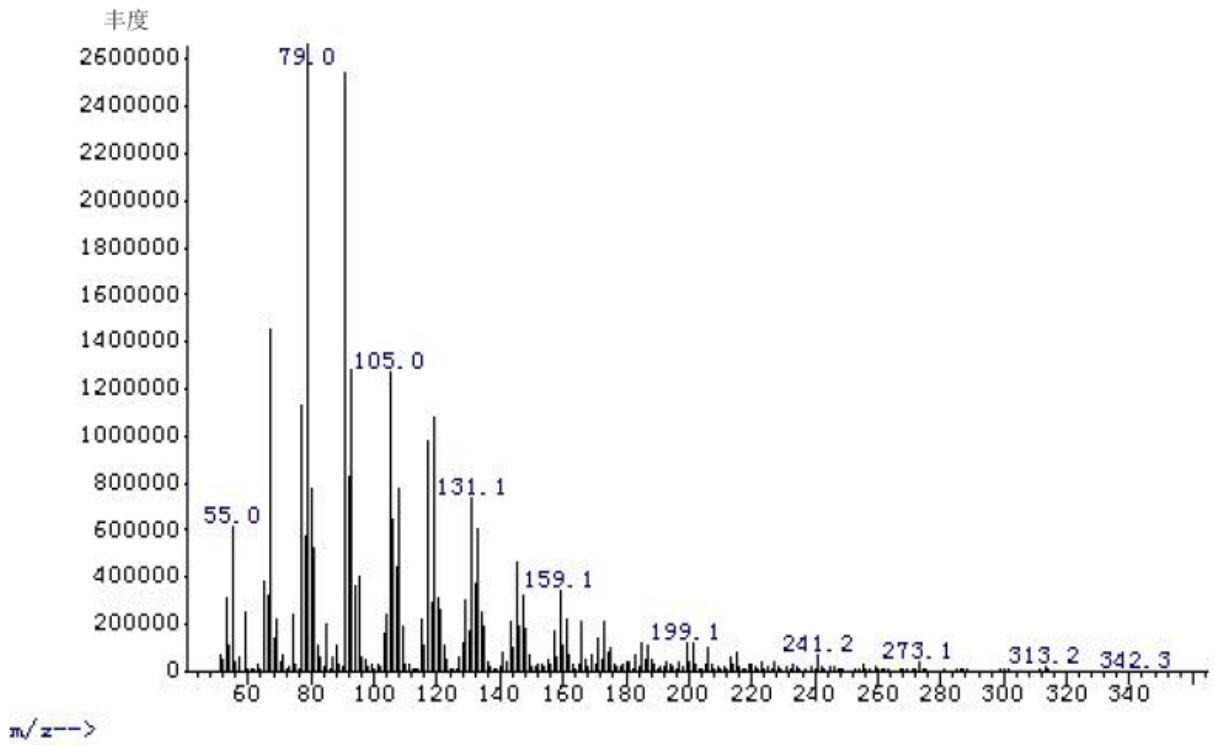
计算结果以平行测定值的算术平均值表示, 保留小数点后两位。

A. 3. 4. 6 重复性

在重复性条件下获得的两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 B

二十二碳六烯酸 (DHA) 甲酯标准品气相色谱-质谱图

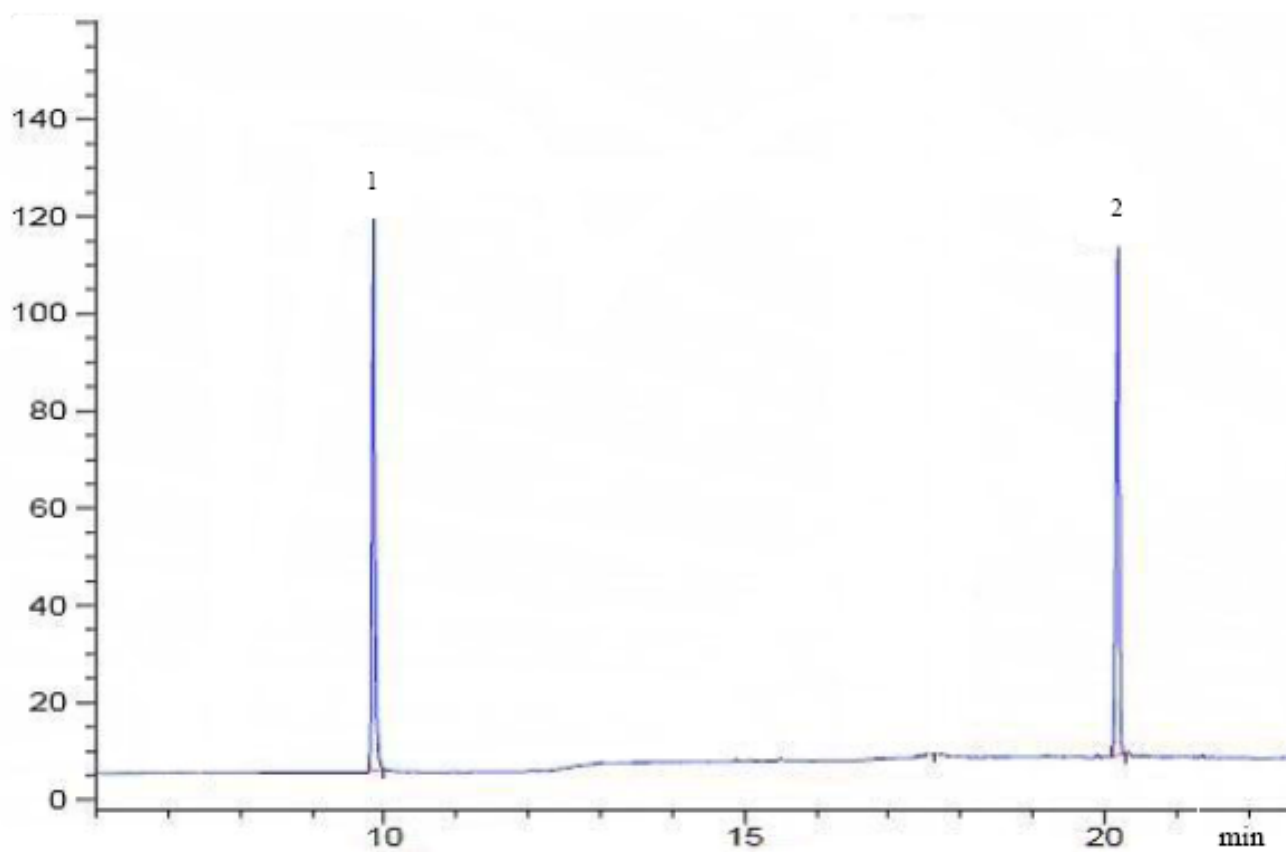


注：该谱图来源于 NIST 谱库

图 B.1 二十二碳六烯酸 (DHA) 甲酯标准品质谱图

附录 C

混合标准工作溶液甲酯化后气相色谱图



1——十三碳烷酸甲酯(9.9min)

2——二十二碳六烯酸(DHA)甲酯(18.8min)

图 C.1 混合标准工作溶液甲酯化后气相色谱图