

正相液相色谱-蒸发光散射法测定食品中的石蜡

盛 旋 胡艳云 张 蕾 孙 昊 郑 屏* 陶发荣 杨嫣嫣 杭 吉

(安徽出入境检验检疫局, 合肥 230022)

摘 要 采用液相色谱 (HPLC) 结合蒸发光散射检测器 (ELSD) 对食品中的石蜡残留物进行了分析和检测。利用正相色谱柱对石蜡和非石蜡组分进行了分离, 而无需对石蜡组分进行逐一分离。利用 t 检验, 对构成石蜡的烷烃组分在 ELSD 检测器上的线性响应进行了显著性误差分析, 结果显示, 石蜡中烷烃组分具有相似的线性响应。以此为定量依据, 实现了食品中石蜡含量的快速定量分析。并对 HPLC-ELSD 的检测和确证结果与 GC-MS 法进行了对比。方法的线性范围为 10 ~ 500 mg/L, 相关系数为 0.9988; 检出限为 1 mg/L。以 10, 50 和 100 mg/kg 浓度水平添加石蜡时, 其回收率在 84.6% ~ 105.4% 之间, 相对标准偏差为 5.4% ~ 7.2%。

关键词 石蜡, 蒸发光散射, 液相色谱, 食品

1 引 言

石蜡是一种石油产品, 主要由不同碳原子数的正烷烃 C_nH_{2n+2} ($n = 14 \sim 34$) 组成。石蜡可以在食品包装材料中使用, 但石蜡分解出的低分子化合物, 容易引起人体肠胃功能紊乱、腹泻, 长期摄入会降低免疫功能, 引发人体细胞变异疾病, 危害健康^[1]。因此国标 2760《食品添加剂使用卫生标准》中严格规定了石蜡的用途和使用范围, 一是用作食品工业的加工助剂, 但在制成最后成品之前去除; 二是作为基础剂物质在胶基糖果中适量使用^[2]。由于石蜡能改善食品的某些感官性能, 可以降低食品生产成本, 因而将石蜡滥用于各类食品中的事件时有发生。如增加火锅底料硬度, 在大米、瓜子等产品中抛光增加光泽, 增加粉丝的韧性和光泽^[3], 浸涂菇种菌棒 (俗称“蜡棒”) 生产蜡菇降低成本等。为有效监控食品中石蜡残留水平, 建立食品中石蜡残留量的分析方法具有重要意义。

目前, 关于食品中石蜡的测定方法已有文献报道。皂化目测法^[4,5], 利用样品直接皂化液或样品提取液的皂化液中石蜡会产生浑浊或小油珠现象, 来判断样品中是否含有石蜡, 方法简单, 但灵敏度不高; 溶剂溶解法^[4], 通过观察用特定溶剂溶解的样品溶液是否浑浊来进行鉴别, 方法检出限高, 受人为因素影响大; DSC 测定熔点范围法和质构仪测定硬度法^[4], 这两种方法是利用温度曲线波动和硬度曲线波动的方法来鉴别产品中是否含有石蜡, 方法的分析时间相对较长。除以上的物理测定方法外, 还有薄层色谱法^[3,4]、红外光谱法^[5,6]、气相色谱法及气相色谱-质谱法^[1,7,8]。薄层色谱和红外光谱法, 方法简单, 定性分析好, 但受样品基体组分的影响较大, 定量分析也不准确; 气相色谱法和气相色谱-质谱法 (GC-MS) 具有较好的分离度和选择性, 但气相色谱的方法在对多组分的石蜡进行定量时, 通常需要将石蜡中每个组分逐一利用外标法进行定量, 然后再加和计算总量。由于石蜡组分复杂, 这种定量方法需要配制大量的标准溶液, 工作量和实验成本都较大。文献 [9] 采用液相色谱-蒸发光散射检测器测定食品包装材料中的石蜡化合物, 并利用傅里叶变换红外光谱法进行定性分析。蒸发光散射检测器是一种通用型检测器, 可检测挥发性低于流动相的任何样品, 是测定无发色基团化合物的一种较好的方法。

本研究采用正相液相色谱 (HPLC) 结合蒸发光散射检测器 (ELSD) 对食品样品中的石蜡残留量进行了分离和检测。通过控制色谱条件, 对石蜡组分和非石蜡组分进行了有效分离。在石蜡中烷烃组分具有相似的线性响应的基础上, 将石蜡中所有烷烃组分作为一个整体进行分析和定量, 弥补了利用石蜡特征组分进行定量时检出限高、结果不准确的缺陷。同时由于方法无需对石蜡组分中的每一个化合物逐一进行分离和检测, 有效地缩短了分析时间。本方法简单、快速、灵敏度高, 可以用于食品安全质量控制。

2009-05-22 收稿; 2009-07-24 接受

* E-mail: ahciq_hx@163.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC system 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 配蒸发光散射检测器; 6890N 气相色谱仪-5973N 质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); R210/V810 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司); N-EVAP 112 氮吹浓缩仪 (美国 Organomation 公司); 超声仪 (美国 NEY 公司)。

全精制切片石蜡 (CAS 8002-74-2, 熔点自 52 ~ 64 各系列, 阿拉丁试剂有限公司); 正二十二、二十五、二十八、二十九、三十、三十一、三十二烷标准品 (纯度大于 99%, 美国 Fluka 公司); 正己烷、乙酸乙酯、无水乙醚 (均为色谱纯, 美国 Tedia 公司); 石油醚 (沸程 30 ~ 60 °C)、无水 Na_2SO_4 (分析纯, 国药集团上海化学试剂有限公司, 使用前经 650 °C 灼烧 4 h 后置于干燥器中备用); 0.2 μm PTFE 针头滤膜 (美国 Waters 公司)。大米、干香菇、新鲜平菇、西瓜子样品均采购自市场。

2.2 仪器条件

2.2.1 液相色谱条件 Agilent ZORBAX SL 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 进样量 5 μL (针溢出); 色谱柱温: 30 °C; 样品室温度: 室温; 流动相: 正己烷; 流速: 0.8 mL/min。

蒸发光散射检测器条件: 漂移管温度: 40 °C; 喷雾器模式: 冷却; 喷雾器温度: 125 °C; 雾化气体: 氮气 (99.999%); 雾化气压力: 206.85 kPa; 检测器条件: 0 ~ 10 min 打开, 10 ~ 14 min 关闭, 14 ~ 15 min 打开; 增益: 50。

2.2.2 气相色谱质谱条件 DB-5MS 色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度: 290 °C; 传输线温度: 290 °C; 柱流量: 1.0 mL/min; 载气: 氮气 (99.999%); 柱温曲线: 100 °C 保持 2 min, 10 °C/min 升至 290 °C, 保持 14 min。质谱条件: 采集模式: SCAN; 扫描范围: m/z 30 ~ 500; 溶剂延迟时间: 10 min; 电离方式: EI; 电离能量: 70 eV; 进样量: 1 μL , 分流比 5:1。

2.3 样品前处理

将大米、西瓜子、干香菇样品粉碎后, 各称取 2 g 于具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 正己烷, 于超声仪中超声提取 10 min; 将新鲜平菇粉碎后, 称取 5 g 于具塞锥形瓶中, 加入 10 g 无水 Na_2SO_4 并充分搅拌后加入 50 mL 正己烷, 超声提取 10 min。

将上述提取液经滤纸过滤后, 收集滤液, 于 30 °C 下减压浓缩至约 2 mL, 用 5 mL 正己烷分数次洗涤浓缩瓶, 并将洗涤液转移至 10 mL 玻璃试管内, 40 °C 氮气流下浓缩至干, 用 2 mL 正己烷溶解残渣, 过 0.2 μm 滤膜, 供测定。

2.4 石蜡标准参考样的制备

高纯度的石蜡为全精制石蜡, 通常根据其熔点范围 (间隔 2 °C), 分成不同的品种, 如 52, 54, 56, 58 等牌号, 熔点范围不同则其对应的石蜡组成也不同, 而市场上并无宽熔点范围的全精制石蜡出售。为使所用的标准参考样更有代表性, 通过称量等量不同熔点系列的全精制石蜡并将其加热混匀后的混合物作为标准参考样, 其所得混合物组成涵盖了各不同熔点范围的石蜡成分, 较单一熔程石蜡对照品更具有代表性。

(1) 石蜡标准参考样的制备 分别准确称取熔点为 52 ~ 64 °C 各系列切片石蜡 5.00 g, 放入小烧杯中加热, 待全部熔化后搅拌均匀冷却, 即得到石蜡标准参考样。

(2) 石蜡标准储备溶液的制备 准确称取适量上述石蜡标准参考样, 以正己烷溶解并配制成 1000 mg/L 标准储备溶液。使用时用正己烷稀释成适当的浓度。

(3) 正烷烃标准储备溶液的制备 准确称取适量上述正烷烃标准品, 以正己烷溶解并配制成 1000 mg/L 标准储备溶液。使用时根据需要用正己烷稀释成所需浓度。

3 结果与讨论

3.1 提取剂的选择

提取剂的选择主要取决于被测物质的性质, 并考虑被测样品的性质。石蜡的提取剂有正己烷、乙醚和石油醚等。本实验分别采用正己烷、乙醚和石油醚在相同提取条件下进行提取, 结果发现回收率均较好, 相差不大。由于无水乙醚挥发极快, 具有一定的神经麻醉性, 不适合作为提取剂; 而石油醚的纯度不

高,其中的不纯物质可能会对蒸发光散射检测器额外带来干扰和污染;而正己烷容易获得高纯度,且毒性较低,故选用正己烷为提取剂。

3 2 色谱条件的选择和优化

由于样品的正己烷提取物极性较小,因此在实验中选择正相色谱对石蜡组分与非石蜡组分进行分离。以正己烷和乙酸乙酯混合液为流动相,考察了正己烷和乙酸乙酯的比例对分离效果的影响。结果表明,随着正己烷比例的增大,石蜡组分的出峰时间不断后移。图 1a为流动相为 100%正己烷时石蜡标准工作液的液相色谱图,此时石蜡组分在 3.7 min出峰。若增加流动相中乙酸乙酯的比例,石蜡组分与非石蜡组分之间的分离效率降低。为获得最大分离度,本实验先选择 100% 正己烷为流动相。采用 GC/MS方法对石蜡组分的分离和检测进行研究,其定性结果作为 HPLC的方法的对比和确证。图 1b显示了 GC/MS分析石蜡标准工作液的色谱图。从图 1b可见,石蜡组分是保留时间在 15~27 min之间出峰的一系列烷烃化合物。

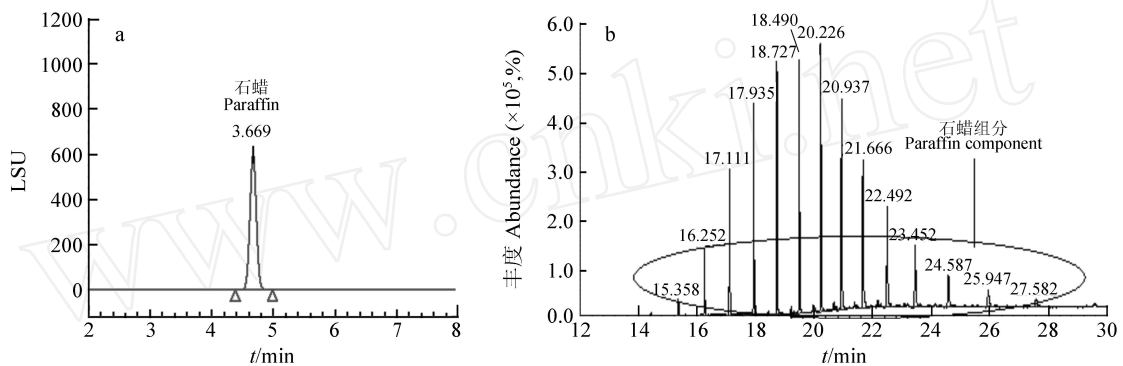


图 1 石蜡标准工作液的 HPLC-ELSD (a)与 GC/MS(b)检测对比图 (石蜡浓度为 200 mg/L)

Fig 1 Comparison of chromatogram of paraffin waxes standard solution obtained by HPLC-evaporative light-scattering detection (ELSD) (a) and GC/MS(b)

3 3 蒸发光散射检测器条件的优化

由于石蜡无发色基团,无法使用紫外-可见检测器和荧光检测器进行检测。蒸发光散射检测器作为新一代通用型检测器,可以弥补此缺点。流动相在蒸发器中汽化,只有样品组分以微小微粒到达光散射池并产生响应信号。实验表明,石蜡在蒸发光散射检测器上具有灵敏的响应。影响蒸发光散射检测效果的主要因素有漂移管温度、载气流速以及喷雾器温度,本实验对检测器条件进行了优化,如 2.2.1节所述,此时石蜡的响应值最佳。

3 4 定性检测的可靠性

为了验证定性检测方法的可靠性,本实验对所有检测的样品均同时进行了 HPLC和 GC/MS的对比检测。在流动相为正己烷的条件下,利用 HPLC对加标干香菇样品进行分析,如图 2a所示,杂质在 10 min后出峰,与石蜡组分色谱峰的分度较大。图 2b利用 GC/MS对加标干香菇样品进行了分析,干香菇样品中石蜡组分的出峰时间与标准石蜡组分的出峰时间基本一致,并且利用 GC/MS谱图检索功能也证实了在 15~24 min之间的色谱峰,除了 1~2个色谱峰为基体杂质外,其它均为烷烃色谱峰。

用正己烷提取时,可有效提取干香菇内残留的脂溶性石蜡物质,但由于正己烷组织渗透性较差,干香菇组织内一些极性组分不易被提取出来,因此样品提取液中干扰物质较少。通过对比干香菇阴性样品和试剂空白的色谱图可以看出,试剂空白和阴性样品的色谱图相似,均为较平坦的基线图,如图 3a和 3b所示。对 HPLC检测阴性的样品再利用 GC/MS进行分析。从图 3c上也可看出,在 15~27 min之间没有明显的烷烃色谱峰的出现。GC/MS的对比分析结果也证实了 HPLC方法定性结果的可靠性。

因此,在实际样品的 HPLC色谱图中,若有保留时间与石蜡标准工作液出峰时间相近的色谱峰出现,可认为是阳性样品。

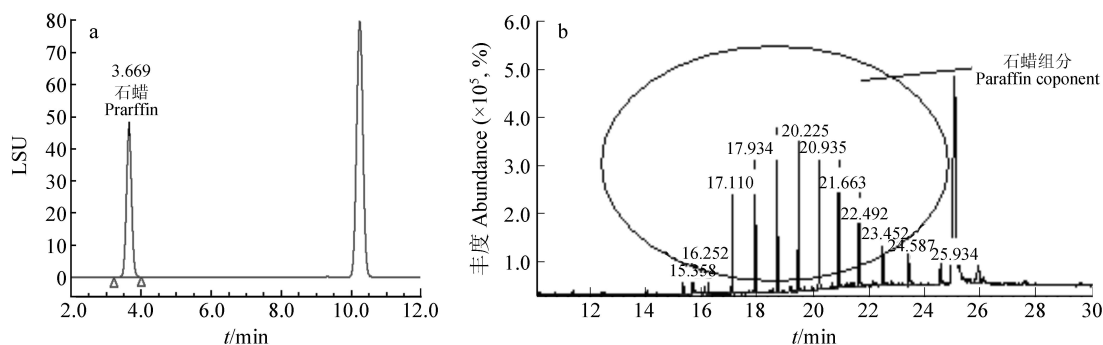


图 2 加标干香菇样品的 HPLC-ELSD (a)与 GC-MS(b)检测对比图 (石蜡浓度为 200 mg/L)

Fig 2 Comparison of chromatograms of spiked dried mushrooms obtained from HPLC-ELSD (a) and GC/MS(b)

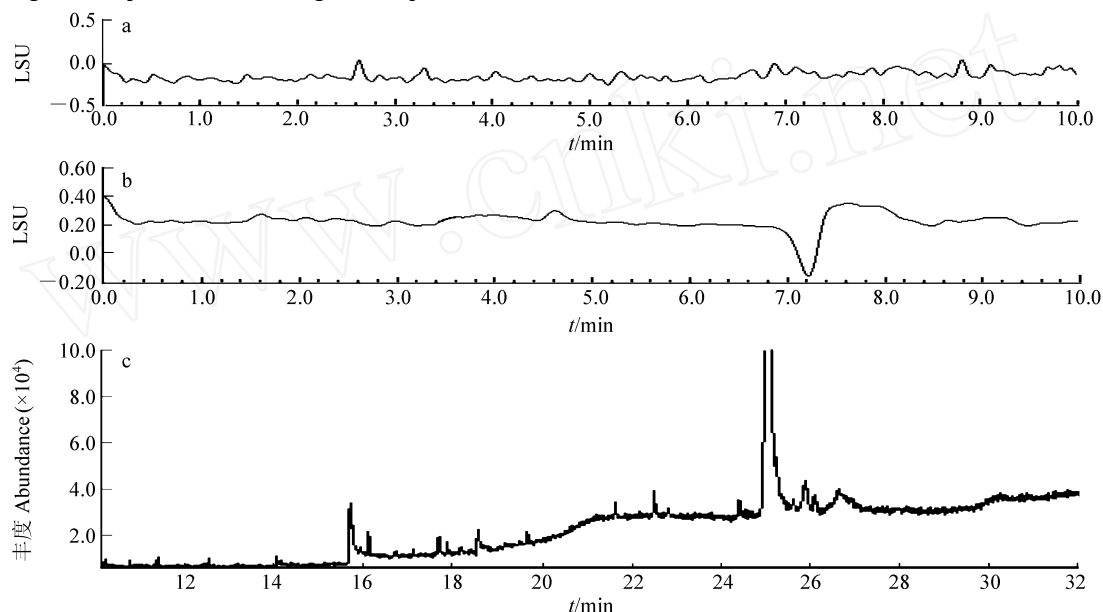


图 3 干香菇阴性样品提取物的 HPLC-ELSD 与 GC-MS检测对比图

Fig 3 Comparison of chromatograms of dried mushroom negative sample obtained from HPLC-ELSD and GC-MS

a 试剂空白的 HPLC-ELSD 谱图 (HPLC-ELSD chromatogram of reagent blank); b 阴性样品的 HPLC-ELSD 谱图 (HPLC-ELSD chromatogram of dried mushrooms negative sample); c 阴性样品的 GC-MS 谱图 (GC-MS chromatogram of negative sample)。

3.5 正烷烃在蒸发光散射检测器中响应因子一致性的考察和定量依据

由于石蜡为多种烷烃混合物,因此在气相色谱柱上会分离出数十个色谱峰,并且由于组分结构不同,在同一个检测器上响应值也不同。若对石蜡进行定量分析,需要对其中各个烷烃组分进行定量分析,然后再将所有组分含量相加得出石蜡的总含量。这种定量方法较为复杂,需要购买各个烷烃组分的标准品,并且需要对各个组分绘制标准曲线进行定量分析。也可选取石蜡组分中某一个或几个特征峰为定量依据,但由于不同类型石蜡中各组分含量比例并不完全一致,因此这种定量方法虽然简单,但定量结果的偏离度较大。由于构成石蜡的正烷烃是同系物,不仅化学结构相差不大且物理性质相近,而通常蒸发光散射检测器的响应值仅取决于光束中溶质颗粒的大小和数目,与其化学结构关系不大,检测器对所有物质几乎具有相同的响应因子^[10]。如果石蜡中所有的组分在同一检测器上具有相同或相近的响应因子,就可以利用其中任一种烷烃组分,对石蜡中所有组分进行定量计算。

为了验证此结论,本实验对石蜡成分中的不同正烷烃以及石蜡在蒸发光散射检测中的响应因子进行了研究。分别准确移取 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 和 10 mL 上述正烷烃和石蜡的标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,配制成系列标准溶液,每次进样 5 μ L,平行 3 次。以峰面积的对数 (Y) 与含量 (μ g) 的对数 (X) 作图进行回归计算,得出每一种正烷烃和石蜡的线性回归方程,结果列于

表 1。由表 1可见 ,一次方程的截距为 2 92 ~ 3 32; 一次方程的斜率值 ,即响应因子为 1. 45 ~ 1. 53,对其进行显著性差异计算 , $t=1.39 < t_{0.05,6} = 2.45 (P=0.95)$ 。单个正烷烃和石蜡在蒸发光检测器上的线性响应方程之间不存在显著性差异 ,可以采用单个正烷烃或石蜡的标准曲线进行定量分析。

在利用正相 HPLC进行分离检测时 ,不同化学结构的石蜡组分在同一时间流出。因此可以直接以石蜡标准的峰面积或峰高为定量依据。

表 1 正烷烃和石蜡标准的 ELSD响应曲线方程
Table 1 Linear response equation of *n*-alkanes and paraffin waxes standard on ELSD

物质名称 Substance name	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 (r) Correlation coefficient	物质名称 Substance name	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 (r) Correlation coefficient
二十二烷 Docosane	$Y=1.53X+3.18$	0.9989	二十五烷 Pentacosane	$Y=1.48X+3.19$	0.9997
二十八烷 Octacosane	$Y=1.50X+3.17$	0.9999	二十九烷 Nonacosane	$Y=1.54X+3.10$	0.9995
三十烷 Triacontane	$Y=1.51X+3.15$	0.9991	三十一烷 Hentriacontane	$Y=1.47X+2.92$	0.9994
三十二烷 Dotriacontane	$Y=1.45X+3.21$	0.9991	石蜡标准参考样 Paraffin wax standard reference sample	$Y=1.48X+3.32$	0.9988

3.6 线性关系、回收率、精密度和检出限

将石蜡标准储备溶液稀释得到系列标准溶液 ,取 5 μL 进样 ,各测定 3次 ,取其峰面积的平均值 ,以峰面积的对数 (Y)与含量 (μg)的对数 (X)作图进行回归计算 ,方法的线性范围为 10 ~ 500 mg/L,相关系数为 0.9988。当 $S/N=3$ 时 ,检出限为 1 mg/L。

干香菇、新鲜平菇以 10、50和 100 mg/kg 浓度水平添加石蜡时 ,其回收率在 84.6% ~ 105.4%之间 ;相对标准偏差为 5.4% ~ 7.2% ,结果见表 2。

表 2 HPLC-ELSD法测定不同样品中石蜡的回收率和相对标准偏差 (n=6)
Table 2 Paraffin recovery and the relative standard deviation obtained from different samples with HPLC-ELSD method

样品名称 Sample name	10 mg/kg		50 mg/kg		100 mg/kg	
	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
干香菇 Dried mushroom	105.4	5.4	88.3	6.3	84.6	6.7
新鲜平菇 Fresh mushroom	103.9	7.2	86.1	5.8	87.5	6.5

3.7 实际样品的检测

利用建立的 HPLC-ELSD方法 ,对采自市场的 20份干香菇样品、30份新鲜平菇样品进行了检测。6份样品石蜡含量大于 2 g/kg,4份样品石蜡含量在 10 ~ 50 mg/kg之间 ,检出率达 20%。这表明食用菌的生产领域仍存在采用落后石蜡保水工艺 ,有必要进一步加强食用菌的生产管理工作。

References

1 Sun Wen-Tong(孙文通) , Zhu Hong-Kun(祝红昆) , Li Bo(李波) , Li Jun-Ming(李军明). *Supervision and Choice*(监督与选择) , 2005, 7: 60 ~ 61

2 *Hygienic Standards for Uses of Food Additives*(食品添加剂使用卫生标准). GB 2760-2007. Standards Press of China(中国标准出版社)

3 Bi Yan-Lan(毕艳兰) , Fan Lu(范璐) , Sun Shang-De(孙尚德) , Zhang Li-Xia(张丽霞) , Sun Dong-Xian(孙东弦). *Gereal and Feed Industry*(粮食与饲料工业) , 2005, 4(1): 3 ~ 5

4 Bi Yan-Lan(毕艳兰) , Li Xiao-Ying(李潇颖) , Guo Xing-Feng(郭兴凤) , Lin Min-Gang(林敏刚). *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*(中国粮油学报) , 2006, 21(6): 180 ~ 184

5 Zheng Wei-Dong(郑卫东) , Zhou Yan(周燕) , Zhong Hong-Xia(钟红霞) , Wu Yu(吴宇) , Huang Xiao-Hui(黄孝辉). *China Measurement Technology*(中国测试技术) , 2005, 31(5): 85 ~ 86, 124

- 6 Liao Huai-Ping(廖怀平), Cai Yuan-Ku(蔡元库), Xiao Lun(肖伦). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (中国卫生检验杂志), **2008**, 15(12): 1456 ~ 1457
- 7 Fu Song(付松), Xiang Shi-Xue(向仕学). *Chinese Journal of Health Laboratory Technology* (中国卫生检验杂志), **2004**, 12(14): 745
- 8 *Test of Oil and Liquid Paraffin Spread on Rice*(涂渍油脂或石蜡大米检验). GB/T 21309-2007. Standards Press of China (中国标准出版社)
- 9 Simal-Gandara, Sarria-vidal M, Rijk R. *Journal of Aoac International*, **2000**, 83(2): 311 ~ 319
- 10 Li Tong(李彤), Zhang Qing-He(张庆合), Zhang Wei-Bing(张维冰). *High Performance Liquid Chromatographic Instrument System* (高效液相色谱仪器系统). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2005**

Application of Normal Phase Liquid Chromatography-Evaporative Light-Scattering Detection for Determination of Paraffin Wax in Food

SHENG Xuan, HU Yan-Yun, ZHANG Lei, SUN Hao, ZHENG Ping*,
TAO Fa-Rong, YANG Yan-Yan, HANG Ji
(Anhui Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hefei 230022)

Abstract A method was proposed for the separation and determination of paraffin waxes in food by HPLC-evaporative light scattering detection (ELSD). A normal-phase column was used to separate nonparaffinic and paraffinic materials without resolving the latter into individual components. The t-test method was adopted for the evaluation of mean difference between response factors of *n*-alkanes in paraffin waxes on ELSD detector. No mean difference was obtained between response factors, which can be used for quantitative determination of paraffin waxes in food. The determination results obtained by HPLC-ELSD were compared with those by GC-MS. The linear range for the determination of paraffin waxes was in the range from 10 to 500 mg/L with a correlation coefficient of 0.9988, and the limit of detection was 1.0 mg/L. With the spiking level of 10, 50 and 100 mg/kg, the recovery ranged from 84.6% to 105.4% and the relative standard deviation ranging from 5.4% to 7.2%. The proposed method is simple, fast and sensitive.

Keywords Paraffin wax, evaporative light-scattering, liquid chromatography, food

(Received 22 May 2009; accepted 24 July 2009)

《颗粒分散科学与技术》

该书从胶体化学、表面(界面)化学理论、材料学及颗粒技术出发,系统地介绍了颗粒的性质、颗粒间的相互作用、颗粒表面改性、颗粒在不同介质中的分散理论、分散特征、分散方法与技术。该书对分散剂、分散的评价方法、典型设备以及分散技术的应用等也作了介绍。

该书系统地总结国内外有关颗粒分散技术的最新研究成果和生产实践,以促进超细颗粒技术及其相关工业的发展,有助于相关行业人员加深和拓宽对颗粒分散这门多学科、跨行业的新兴综合性科学技术的理解。

该书对超细颗粒加工和颗粒分散相关行业和学科感兴趣的科技工作者参考。

该书由任俊、沈健、卢寿慈著,化学工业出版社出版,定价28.00元。