

刘玲玲, 李冰宁, 杨梦奇, 等. 奶粉中饱和烃与芳香烃矿物油的高灵敏检测方法建立 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(20): 298–304.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110159

LIU Lingling, LI Bingning, YANG Mengqi, et al. Development of A Highly Sensitive Method for the Determination of Mineral Oil Saturated Hydrocarbons (MOSH) and Aromatic Hydrocarbons (MOAH) in Milk Powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(20): 298–304. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110159

· 分析检测 ·

奶粉中饱和烃与芳香烃矿物油的高灵敏检测方法建立

刘玲玲, 李冰宁, 杨梦奇, 李 婷, 武彦文*

(北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心),
北京 100094)

摘 要:近年来, 奶粉, 特别是婴幼儿配方奶粉中的矿物油污染受到公众关注, 相关国际监管逐渐升级。然而, 目前还没有针对奶粉中矿物油的标准检测方法。本文依据欧盟的限量规定和分析要求, 改进和优化了样品前处理方法, 依次采用皂化法、正己烷提取、硅胶净化、环氧化反应方法, 最后利用高效液相色谱-气相色谱联用技术(HPLC-GC)建立了奶粉中饱和烃矿物油(MOSH)和芳香烃矿物油(MOAH)的高灵敏检测方法。结果表明, 该方法的定量限(LOQ)达到 0.5 mg/kg, 回收率为 81.1%~112.0% (RSD=0.3%~3.8%), 满足欧洲联合研究中心(JRC)的方法要求。应用该方法分析了国际能力验证样品, 结果发现, C₁₆~C₂₅ 和 C₂₅~C₃₅ 的 MOSH 和 MOAH 的检测结果均接近真值, 其 z 比分数的绝对值均小于 2, 说明方法通过验证, 建议可参考本方法制定奶粉中 MOSH 和 MOAH 的含量检测标准。

关键词:奶粉, 饱和烃矿物油(MOSH), 芳香烃矿物油(MOAH), 高灵敏检测, 高效液相色谱-气相色谱联用(HPLC-GC)

中图分类号: TS295.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)20-0298-07

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110159



Development of A Highly Sensitive Method for the Determination of Mineral Oil Saturated Hydrocarbons (MOSH) and Aromatic Hydrocarbons (MOAH) in Milk Powder

LIU Lingling, LI Bingning, YANG Mengqi, LI Ting, WU Yanwen*

(Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology (Beijing Center for Physical and Chemical Analysis), Beijing 100094, China)

Abstract: In recent years, contamination of mineral oil hydrocarbons (MOH) in milk powder, especially infant formula, has become a public concern, and related international regulation has gradually escalated. However, there is no standard method for the determination of MOH in milk powder. In this paper, the sample pretreatment method based on the EU limits and analytical requirements were improved and optimized, and the saponification method, hexane extraction, silica gel clean-up, epoxidation reaction method in order were used, and a highly sensitive method for the determination of mineral oils of saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oils of aromatic hydrocarbons (MOAH) in milk powder by on-line high performance liquid chromatography-gas chromatography (HPLC-GC) were established. Results showed that, the method achieved a limit of quantification (LOQ) of 0.5 mg/kg and recoveries of 81.1%~112.0% (RSD=0.3%~3.8%), meeting the method requirements of the European Joint Research Center (JRC). The method was applied to analyze the international

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 北京市自然科学基金(青年项目)(6234043);北京市改革与发展专项(23CB017);北京市科学技术研究院北科萌芽计划(BGS202104)。

作者简介: 刘玲玲(1987-),女,硕士,高级工程师,研究方向:食品安全分析,E-mail: lingling2@163.com。

* 通信作者: 武彦文(1973-),女,博士,研究员,研究方向:分析方法研发,E-mail: wu_yanwen@163.com。

proficiency testing samples, and the results showed the detection results of MOSH and MOAH from C_{16} to C_{25} and C_{25} to C_{35} were close to the true values, and the absolute values of their z' -scores were less than 2. This indicated that the method passed the validation, and the method could be referred to as the standard for the determination of MOSH and MOAH in milk powder.

Key words: milk powder; mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH); mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH); highly sensitive determination method; on-line high-performance liquid chromatography coupled with gas chromatography (HPLC-GC)

近年来,公众对矿物油污染逐渐重视,特别是 2019 年非政府组织 Foodwatch 发布报告,指出婴幼儿配方奶粉含有芳烃矿物油(mineral oil aromatic hydrocarbons, MOAH)^[1]之后,人们对矿物油的关注度提高,相关部门的监管规定和方法要求也逐年升级。2019 年,欧洲食品安全局(EFSA)开展了针对奶粉中矿物油的风险评估^[2];2020 年,欧洲联合研究中心(JRC)开始着手建立奶粉中 MOAH 的检测规范^[3];2022 年,德国食品联合会(BLL)推出包含奶粉在内的 9 大类食品中矿物油的基准值^[4];同年,欧盟植物、动物、食品和饲料常务委员会(SCoPAFF)发布了“关于食品(包括婴幼儿食品)中 MOAH 的联合声明草案”,规定奶粉中矿物油的限量为 1 mg/kg^[5]。

矿物油源于石油和合成油,石化企业生产的柴油、润滑油、溶剂油、白油等均为矿物油产品^[6]。因此,矿物油可以通过食品生产链的各个环节(如原料种/养殖、运输、加工、包装与环境污染等)迁移至食品造成污染^[7-12]。2012 年,EFSA 给出食品中矿物油污染物的定义,即沸程范围 $n-C_{10} \sim n-C_{50}$ 的所有碳氢化合物,可粗略分为饱和烃矿物油(mineral oil saturated hydrocarbons, MOSH)和 MOAH 两类^[6]。MOSH 和 MOAH 的毒性差异很大,MOASH 容易蓄积在肝脏、脾脏、淋巴结等器官和组织中形成微型肉芽肿;MOAH 则有潜在的致癌、致畸和发育毒性^[13-15]。

目前国内外并没有出台奶粉中矿物油的检测标准。矿物油是由数以万计烃类化合物组成的混合物,其化学类型复杂,一般测其总量。气相色谱(gas chromatography, GC)的氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)具有等碳响应,无需一一对应标准对照物,只用任意内标即可准确定量,是目前测定矿物油的理想方法^[16-17]。然而,由于样品基质复杂,矿物油含量低,常规 GC-FID 的选择性和灵敏度无法满足分析要求。而高效液相色谱-气相色谱联用(on-line high-performance liquid chromatography coupled with gas chromatography, HPLC-GC)仪器通过 HPLC 分离解决了矿物油的净化问题,通过 HPLC 与 GC 之间的接口技术从数量级上提升了方法的灵敏度,从而较好地实现了矿物油的准确测定。缺点是其高度定制化限定了 HPLC 硅胶柱的规格,HPLC 硅胶柱只能吸附 20 mg 油脂^[16],这意味着该仪器的净化容量有限,因此,干扰物质的有效去除是奶粉中矿物油测定技术的难点。

本文根据奶粉的基质特点,参考欧盟要求^[5],综合现有的油脂标准^[18]和文献^[19-22]方法,系统研究了称样量、皂化反应条件、正己烷提取方法、硅胶柱和环氧化净化方法,最后通过 HPLC-GC 分析,以期建立奶粉中 MOSH 和 MOAH 的高灵敏度检测方法,从而作为食品企业、监管和检测机构的常规检测方法,也可用于未来制定奶粉等相关标准的参考。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

婴幼儿配方奶粉 市售;奶粉样品(RVEP 200612) 由德国标物局(DRRR)于 2020 年组织国际能力验证;正己烷(色谱纯)、二氯甲烷(色谱纯)、无水乙醇(色谱纯)、硅胶(63~200 μm ,以 400 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 16 h、置于干燥器中冷却至室温) 德国默克公司;氢氧化钾 分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硫代硫酸钠和无水硫酸钠 分析纯,国药集团化学试剂公司;3-氯过氧苯甲酸(m-CPBA) 分析纯,赛默飞世尔科技公司;MOSH/MOAH 混合标准溶液 含 9 种单体化合物,分别为 300 mg/L 的正十一烷(n -undecane, $n-C_{11}$)、环己基环己烷(bicyclohexyl, Cycy)、戊基苯(amylnaphthalene, 5B)、1-甲基萘(1-methylnaphthalene, 1-MN)、2-甲基萘(2-methylnaphthalene, 2-MN)、1,3,5-三叔丁基苯(1,3,5-tri-tert-butylbenzene, TBB)、150 mg/L 的正十三烷(n -tridecane, $n-C_{13}$)和 600 mg/L 的胆甾烷(5- α -cholestane, Cho)、蒽(perylene, Per) 北京坛墨质检科技有限公司;正构烷烃混合标准溶液 配制含 100 mg/L 的 $n-C_{10}$ 、 $n-C_{11}$ 、 $n-C_{13}$ 、 $n-C_{16}$ 、 $n-C_{20}$ 、 $n-C_{24}$ 、 $n-C_{25}$ 、 $n-C_{35}$ 、 $n-C_{40}$ 和 $n-C_{50}$ 的标准溶液,其中标准品均购自美国 Restek 公司。

HPLC-GC 联用仪器 由日本岛津公司的 LC 20AD 液相色谱仪(配备紫外检测器)和 2010 plus 气相色谱仪[配备氢火焰离子化检测器(FID)]以及德国 Axel Semrau 公司的 LC-GC 接口组成;SHZ-B 水浴恒温振荡器 上海博迅医疗生物仪器公司;Biofuge primo R 低温高速 赛默飞世尔科技公司;R-100 旋转蒸发仪、B-290 喷雾干燥仪 瑞士步琦公司;TUS-200P 金属浴恒温振荡器 上海一恒科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 皂化反应 准确称量奶粉试样 5.0 g(精确至 1 mg)于 100 mL 玻璃离心瓶中,加入 MOSH/MOAH

混合标准溶液 10 μL , 加入温热(35~50 $^{\circ}\text{C}$)去离子水 10 mL, 振荡至没有明显结块; 然后加入浓度为 0.6 g/mL 氢氧化钾水溶液 10 mL 和无水乙醇 20 mL, 摇匀后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 皂化反应 30 min; 冷却至室温后向皂化液加入正己烷 15 mL, 振荡 5 min 后加入去离子水 10 mL, 剧烈振荡、离心后取上清液; 再次加入正己烷 10 mL 重复提取, 振荡分层后取上清液, 合并, 减压浓缩至约 2~3 mL。

1.2.2 脂肪相对残留率测定 为了测定皂化后提取液中的脂肪相对残留率, 将上述萃取物(1.2.1)蒸发至干燥, 直到恒定重量, 见公式(1)。

$$X = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m \times x} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: X 为脂肪相对残留率, %; m_1 为恒重后脂肪收集瓶和脂肪质量, g; m_2 为恒重后脂肪收集瓶的质量, g; m_3 为空白实验中, 恒重后脂肪收集瓶和脂肪质量, g; m_4 为空白实验中, 恒重后脂肪收集瓶的质量, g; m 为样品质量, g; x 为样品标签上脂肪含量, %。

1.2.3 硅胶净化 将 3 g 活化硅胶装入内径为 11~13 mm 的底部有烧结筛板或垫入滤纸或玻璃棉的玻璃层析柱, 在上层覆盖约 1 g 无水硫酸钠; 取浓缩液(1.2.1), 加入乙醇-水(1:1, v/v) 5 mL, 振荡、静置分层、取上清液; 全部转移至硅胶柱, 用 15 mL 二氯甲烷-正己烷(3:7, v/v)混合溶剂洗脱, 收集流出液, 减压浓缩至约 1 mL。

1.2.4 环氧化反应 向浓缩液(1.2.2)中加入 0.5 mL 的 m -CPBA 乙醇溶液(200 mg/mL, 2 g m -CPBA 用乙醇定容至 10 mL), 以 40 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 20 min; 然后加入乙醇 0.5 mL 和浓度为 100 mg/mL 硫代硫酸钠溶液 2 mL 以终止反应, 取正己烷层用于 HPLC-GC 分析。

1.2.5 HPLC-GC 分析 HPLC 色谱柱为 Restek Allure Si(250 mm $\times$ 2.1 mm, 内径 5 μm), 流动相为(A)正己烷, (B)二氯甲烷; 采用梯度洗脱程序: 0~0.1 min, 100% A(流速为 0.3 mL/min); 0.1~6.2 min, 70% A(流速为 0.3 mL/min); 6.2~15.2 min, 100% B(反冲, 流速为 0.5 mL/min); 15.2~25.2 min, 100% A(流速为 0.5 mL/min); 25.2~30 min, 100% A(流速为 0.3 mL/min)。进样体积为 100 μL ; 以紫外检测器(230 nm)监测 HPLC 的流出情况, 此条件下的 MOSH 部分于 2.0~3.5 min、MOAH 于 4.5~6.0 min 流出; 两部分分别通过阀切换全部导入 GC 分析。

GC 仪器配置两套完全相同的通道, 每个通道均采用 Restek MXT 无涂层毛细管预柱(10 m $\times$ 0.53 mm)和 Restek MXT-1 分析柱(15 m $\times$ 0.25 mm, 内径 0.25 μm), 预柱与分析柱之间以三通管连接溶剂排空阀^[17]。柱温箱的升温程序: 初始温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, 保持 6 min, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 120 $^{\circ}\text{C}$, 然后再以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 370 $^{\circ}\text{C}$, 保持 6 min; 载气为氢气(纯度 $\geq$ 99.995%), MOSH 和 MOAH 通

道的初始压力分别为 80 和 79 kPa; FID 温度为 380 $^{\circ}\text{C}$; FID 的辅助气为氮气(流速 30 mL/min)、燃烧气为氢气(流速 40 mL/min)、助燃气为空气(流速 400 mL/min)。

1.2.6 加标样品制备 对于奶粉样品, 特别是婴幼儿配方奶粉, 其矿物油来源除了包装材料迁移至奶粉颗粒表面之外, 还有可能来源于奶粉的配料, 而奶粉配料中的矿物油往往被奶粉的蛋白质颗粒包裹, 简单的加标回收率并不能反映矿物油分析方法的准确性。本文将奶粉用 35~50 $^{\circ}\text{C}$ 的温水溶解, 加入不同浓度的矿物油溶液, 均质后采用喷雾干燥法制备加标样品。喷雾干燥器进风温度为 130 $^{\circ}\text{C}$, 出风温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ ^[23]。

1.3 数据处理

定量方法为内标法, 分别以 MOSH/MOAH 混合标准溶液中的 Cycy 和 TBB 为内标物对 MOSH 和 MOAH 定量。MOSH 和 MOAH 的谱图均为跨越一定碳数范围的鼓包峰, 其含量通过积分计算鼓包峰与基线之间的空白面积与内标峰的面积比获得; 鼓包峰上方的尖峰不是矿物油, 需要减去^[18]。本文采用 Lab solution 软件进行数据处理, 最终结果运用 Excel 表格进行计算。本文所用色谱图均直接应用 Lab solution 软件复制原图。

2 结果与分析

2.1 样品制备

2.1.1 称样量 本文参考欧盟的分析要求与限量规定建立方法。2019 年, JRC 给出食品中矿物油的分析方法指导, 对于脂肪含量 $>4\%$ 的 LOQ 不能超过 1 mg/kg^[19]。2022 年, 欧盟 SCoPAFF 要求脂肪含量大于 4% 的食品的矿物油限量为 1 mg/kg^[5]。因此, 奶粉中的 MOSH 和 MOAH 的分析方法 LOQ 不能超过 1 mg/kg。

矿物油分析方法的 LOQ 与样品称样量密切相关。根据文献经验, 至少 50~100 ng 矿物油注入 FID 才能满足分析不确定度要求^[16]。由此计算, 称量 5.0 g 奶粉样品, 经过提取、净化、浓缩至 1 mL 试液, 其中 100 μL 注入 HPLC-GC 分析, 即相当于 0.5 g 样品中的目标物进入仪器, 则该分析方法 LOQ 为 0.2 mg/kg。考察到矿物油的鼓包峰是通过积分计算鼓包峰与基线之间的空白面积得到, 样品前处理, 如提取、净化、浓缩等操作步骤均会引起基线波动, 因此将方法的 LOQ 定为 0.5 mg/kg 相对稳妥。

2.1.2 皂化反应 通常, 奶粉中含有 20%~30% 的油脂。油脂是矿物油的共提取物, 如果不去除, 会影响分析灵敏度, 是由于 HPLC 柱的规格限制油脂不能超过 20 mg。以油脂为例, 其直接进样的 LOQ 只能达到 10 mg/kg^[18]。为了降低定量限, 必须事先除去油脂, 从而允许高浓度矿物油试液进入仪器测定。

皂化反应能够增大矿物油与甘油三酯的极性差异, 从而达到分离、去除油脂的目的。皂化反应需要

考虑甘油三酯(底物)与氢氧化钾溶液的浓度、溶剂体系、反应温度和反应时间等条件。“2.1.1”部分已经确定奶粉的称样量为 5.0 g,为了反应彻底,首先需要将奶粉均匀分散。借鉴本实验室先前方法^[17],加入约 10 mL 热水(35~50 ℃),充分搅拌后再加入氢氧化钾水溶液皂化。矿物油涉及低沸点物质,为了避免挥发损失,JRC 建议皂化条件为 60 ℃ 下反应 30 min^[3]。因此,本文仅需要考察皂化反应的强碱浓度及其所处的溶剂体系。

随机选取一种购买的婴幼儿配方奶粉(产品标签标明脂肪含量为 26.5%),通过测定皂化反应后脂肪的相对残留率,综合考察了氢氧化钾溶液浓度与乙醇添加量对皂化反应的影响(表 1)。结果表明:当反应体系中氢氧化钾量达到 6 g(即溶液中氢氧化钾达到 3 mol/L)以上时,甘油三酯完全分解^[21]。甘油三酯与强碱的摩尔比为 1:3 时皂化反应完全,根据 5.0 g 奶粉可以粗略估算出油脂含量,即甘油三酯的质量为 1~1.5 g,继而可以确定氢氧化钾的浓度。为了反应完全,实际操作中碱的添加量通常都是过量的。

乙醇添加量对皂化反应效率影响很大,实验结果(表 1)表明,当加入 15 mL 乙醇,即反应体系中乙醇和水的体积相当(≈15 mL)时,皂化反应不完全;当乙醇的体积为 20 mL 时,皂化效率明显提高,但残留脂肪率为 0.6%~13.1%,重复性较差,皂化反应稳定性较差。此时,增加氢氧化钾的量,即从 3 g 增加到 6 g 时,残留脂肪率为 0.6%~0.8%,皂化反应重复性和稳定性好。甘油三酯与浓碱水溶液不能互溶,需要加入一定量的乙醇作为溶剂并不断振荡,以加快皂化反应。因此,确定皂化条件为 5.0 g 奶粉以 10 mL 温水溶解,然后加入浓度为 0.6 g/mL 的氢氧化钾水溶液 10 mL 和乙醇 20 mL,摇匀后于 60 ℃ 下皂化反应 30 min。皂化反应是否完全,可以通过观察正己烷相上方的脂肪层,如果存在脂肪层,则继续反应至其消失。

2.1.3 提取次数 一次提取往往不能保证回收率,本

文将奶粉样品加入 MOSH/MOAH 混合标准溶液经皂化反应(1.2.1),考察正己烷提取次数对 MOSH/MOAH 混合标准溶液回收率的影响,其中第 1 次用 15 mL 正己烷提取,第 2 次则另外添加 10 mL 正己烷。由表 2 可知,合并两次提取液测得的 MOSH 和 MOAH 的含量反而降低;对比两次提取液中 MOSH/MOAH 混合标准溶液中的单体内标物质的比例(3 种 MOSH 内标物质与 $n\text{-C}_{13}$ 的浓度比值,4 种 MOAH 内标物质与 TBB 的浓度比值),发现 MOSH 部分一次即可提取完全,而 MOAH 部分则需要经过两次提取,其回收率才能达到 0.97 以上,考虑到定量内标(Cycy 和 MN)的回收率对分析结果的影响很大,本文的正己烷提取步骤确定为两次。

同时,表 2 的提取次数考察结果也说明,具有两个苯环的 1-MN 和 2-MN 在皂化反应和正己烷提取步骤中存在一定损失。为了尽可能降低定量结果的差异,采用 TBB 作为定量内标。

2.1.4 硅胶净化 实际操作中发现奶粉的皂化-提取液经过浓缩后,其中极性物质(如碱液、溶剂杂质等)也相应得到富集,影响后续的环氧化反应,因此需要对浓缩液进行净化。根据浓缩液的体积(一般为 2~3 mL),乙醇-水(1:1, v/v)的添加量为 5 mL。此外,很多实验室建议再增加一步硅胶净化步骤,如德国脂肪学会(DGF)最新修订的油脂标准^[22]。因此,本方法也将洗涤后的试液以硅胶净化。由于油脂已经通过皂化去除,因而净化柱中的硅胶量参照欧盟标准^[15]成比例降低,3 g 硅胶即可以达到净化目的。

2.1.5 环氧化反应 为了保证营养均衡,奶粉,特别是婴幼儿配方奶粉中常常添加葵花籽油、玉米油、棕榈油等植物油脂^[24]。然而,这些物油脂中的角鲨烯、胡萝卜素和甾烯等会干扰 MOAH,其原因是这些烯烃的极性与 MOAH 相近,与 MOAH 产生共流出,干扰谱峰而影响测定^[25]。

Biedermann 等^[25]提出去除烯烃的方法,即采用

表 1 氢氧化钾和乙醇的不同添加量对皂化反应的影响

Table 1 Effect of the different addition amount of potassium hydroxide and ethanol on saponification results

氢氧化钾(g)	乙醇(mL)	样品中脂肪的相对残留率(%, n=6)						
		1	2	3	4	5	6	平均值
3	15	30.5	35.8	24.9	28.5	19.9	7.2	24.5±10.0
3	20	0.8	1.6	0.8	12.0	13.1	0.6	4.8±6.0
6	20	0.6	0.6	0.8	0.6	0.6	0.8	0.7±0.1

表 2 正己烷提取次数的考察

Table 2 Influence of extraction times of hexane on the determination of mineral oil hydrocarbons

提取次数	MOSH(mg/kg)	MOAH(mg/kg)	MOSH内标物质与 $n\text{-C}_{13}$ 的浓度比值			MOAH内标物质与TBB的浓度比值			
			$n\text{-C}_{11}$	Cycy	Cho	5B	1-MN	2-MN	Per
/	/	/	2.00	2.11	4.26	1.01	1.02	1.02	1.73
1	10.46±0.15	1.45±0.02	2.04	2.08	4.24	0.97	0.91	0.91	1.54
1+2	9.92±0.11	1.24±0.01	2.03	2.08	4.26	0.98	0.98	0.97	1.72

注:第一行的数据为混合标准溶液直接注入HPLC-GC的测定结果。

间氯过氧苯甲酸(m-CPBA)将烯烃进行环氧化反应生成环氧化物,增加烯烃的极性,延长其在液相色谱的洗脱时间,使其在 MOAH 之后流出,从而达到分离、去除烯烃的目的。Nestola 等^[26]对该方法进行了改进,将反应体系的溶剂从二氯甲烷换为乙醇,延缓了反应速率,使反应温度从冰浴升至室温,并且避免了溶剂转换,简化了反应步骤,此优化方法得到了 Biedermann 等^[26]的肯定。本文采用改进后的环氧化方法,去除奶粉中 MOAH 的干扰物净化。

2.2 方法学考察

2.2.1 定量限 奶粉中矿物油的测定步骤包括皂化、提取、浓缩、洗涤、净化、环氧化等样品前处理步骤,然后注入 HPLC-GC 同时测定 MOSH 和 MOAH 的含量。通常需要考察新建检测方法的线性范围,然而,矿物油检测往往无需考虑这一点,原因是 HPLC-GC 配备的检测器 FID 范围非常宽,而 HPLC-GC 接口的限制,使得前面 HPLC 分离流出的 MOSH 和 MOAH 含量有限,远远达不到 FID 的检测上限。因此,标准方法^[18,27-28]均没有涉及线性范围,即只需考虑方法的下限(LOQ)即可。

无论是 MOSH 还是 MOAH 均为包含数以万计不同结构类型的混合物,GC 无法将它们分为单个化合物,因此,矿物油的谱图呈鼓包峰形状(图 1)。然而,鼓包峰的灵敏度低^[16]。为了满足分析不确定度要求,鼓包峰必须与基线拉开距离,形成足够高度,从而保证准确积分。目前 LOQ 计算方法通常以进入 GC 的矿物油质量须达到 50~100 ng 计算^[16]。本方法将 5.0 g 奶粉样品中矿物油制备成近 1 mL 试液,取其中的 100 μ L 分析,相当于 HPLC-GC 测定 0.5 g 奶粉样品。因此,以 100 ng 计算得到的定量限即为 0.2 mg/kg。为了考察基线波动对鼓包峰的影响,本文分别测定了空白试验对应的 MOSH 和 MOAH 含量,其数值分别低于 0.12 和 0.05 mg/kg,空白值应该小于 LOQ 值得 1/3^[22]。

本文综合考虑了矿物油多个前处理步骤造成的基线波动,不同碳数范围带来的鼓包峰高度差异,以及不同实验室的操作差异,确定方法的 LOQ 值为 0.5 mg/kg。

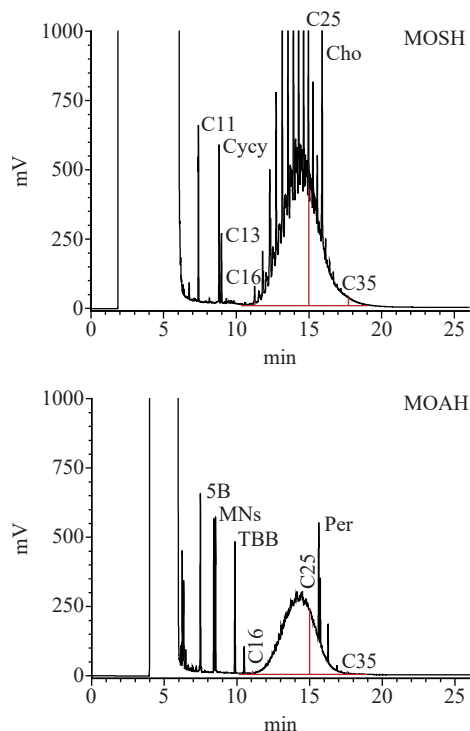


图 1 DRRR 组织国际能力验证的奶粉样品(RVEP 2000612)中 MOSH 和 MOAH 的 HPLC-GC 谱图

Fig.1 HPLC-GC Chromatograms of MOSH and MOAH in the milk powder sample (RVEP 200612) from DRRR Proficiency Testing

2.2.2 回收率和重复性 本文选取了两个市售奶粉,按照 1.2.6 方法制备加标样品进行加标回收率实验。其中 MOSH 部分添加了 0.50~14.99 mg/kg 范围的多个水平,MOAH 部分则添加了 0.58~2.22 mg/kg 范围的 4 个水平。结果表明,MOAH 的回收率为 83.3%~93.1%(RSD=1.7%~3.8%),即方法学的各项指标均符合 JRC 要求^[19](表 3)。

2.3 方法验证

为了进一步验证方法的准确性,本文测定了 DRRR 组织国际能力验证的奶粉样品(RVEP 2000 612),结果见图 1 和表 4。此次验证样品的 MOSH 和 MOAH 在 C₃₅~C₅₀ 范围的含量极低(图 1),因此主要考察 C₁₆~C₂₅ 和 C₂₅~C₃₅ 的 MOSH 和 MOAH 的

表 3 加标回收率考察结果(n=6)

Table 3 Recoveries of spiked samples (n=6)

奶粉样品	矿物油(C ₁₀ ~C ₅₀)	本底值 (mg/kg)	添加量(mg/kg)	测定值(mg/kg)	回收率(%)	RSD(%)
1#	MOSH	3.13±0.05	0.50	3.69±0.04	112.0	1.1
			7.50	10.51±0.32	98.3	3.0
			14.99	18.66±0.36	103.6	1.9
	MOAH	<LOQ	1.11	0.93±0.04	83.3	3.8
			2.22	2.04±0.04	91.7	1.7
			0.98	2.31±0.01	81.1	0.3
2#	MOSH	1.51±0.03	3.92	5.16±0.04	93.0	0.7
			8.62	10.85±0.32	108.4	3.0
			0.58	0.51±0.01	87.9	2.8
	MOAH	<LOQ	1.28	1.12±0.03	87.7	2.5
			2.22	2.07±0.08	93.1	3.7

表 4 DRRR 组织国际能力验证的奶粉样品(RVEP 200612)的 MOSH 和 MOAH(不同碳段)分析结果
Table 4 Determination results of MOSH and MOAH (C-fraction) in the milk powder sample (RVEP 200612) from DRRR proficiency testing

矿物油	碳段	参考值 (mg/kg)	本方法的测定结果 (mg/kg)	本方法测定结果的 z'比分数	混合溶剂法的测定结果 (mg/kg)*	混合溶剂法测定结果的 z'比分数
MOSH	C ₁₆ ~C ₂₅	24.36	22.52	-0.47	22.11	-0.57
	C ₂₅ ~C ₃₅	12.26	11.58	-0.15	11.30	-0.21
MOAH	C ₁₆ ~C ₂₅	10.54	15.42	1.90	13.85	1.29
	C ₂₅ ~C ₃₅	3.98	4.60	0.39	6.01	1.28

注: *表示本方法验证采用的样品是DRRR于2020年国际能力验证提供的奶粉(RVEP 2000612), 当时实验室采用混合溶剂法测定了该样品中的矿物油含量, 混合溶剂法的具体操作步骤见文献[20]。该方法采用异丙醇-正己烷混合溶剂提取、硅胶净化、环氧化反应处理样品, 最后注入HPLC-GC测定。

含量及其 z'比分数。其中 z'比分数是用来衡量实验室测定值与参考值的偏离程度, 如果 z'比分数的绝对值低于 2, 则认为结果满意, 通过验证^[29-30]。

本文分别采用文献的混合溶剂法^[20] 和本文所建方法进行了平行测试, 均通过能力验证, 证明这两种方法都能用于奶粉中低含量矿物油的测定。不过, 相比混合溶剂法, 尽管本方法的称样量增加至 5 g(混合溶剂法的取样量只有 2 g), 但使用的溶剂量却较少(溶剂提取法约 100 mL, 本文所建方法约 60 mL), 说明本方法的灵敏度更高。

3 结论

本文建立了奶粉中 MOSH 和 MOAH 的高灵敏度分析方法, 该方法的取样量为 5.0 g, 以温水分散后, 依次通过皂化反应除去油脂, 以正己烷萃取皂化液中的矿物油, 进行洗涤和净化后, 接着采用环氧化反应除去样品基质中的天然烯烃, 最后注入 HPLC-GC 测定。该方法的灵敏度高, LOQ 达到 0.5 mg/kg, 回收率为 81.1%~112.0%, 应用该方法进行能力验证, 其测定结果的 z'比分数的绝对值小于 2, 满足欧盟最新的分析要求和限量规定。因此, 本文建立的方法可以用于日常检测, 也可以作为制定相关标准的参考方法。

参考文献

[1] Foodwatch. International test of various canned baby milk products for their content of mineral oil hydrocarbons (MOSH/MOAH) [EB/OL]. (2019-10-24) [2020-02-04]. https://www.food-watch.org/fileadmin/-INT/mineral_oil/documents/2019-10-24_Projectreport_babymilk_FINAL.pdf

[2] European Food Safety Authority (EFSA), ARCELLA D, BAERT K, et al. Rapid risk assessment on the possible risk for public health due to the contamination of infant formula and follow-on formula by mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) [J]. EFSA Supporting Publication. 2019, EN-1741.

[3] ARES. Summary of the roundtable workshop on the determination of MOAH in infant formula[C]// European Commission Joint Research Centre, 2019.

[4] Food Federation Germany, Consumer Protection Consortium of the Federal States. Benchmark levels for mineral oil hydrocarbons (MOH) in foods [EB/OL]. (2022-10-12) [2022-11-10]. <https://www.lebensmittelverband.de/de/aktuell/20221012-aktualisierung-moh-orientierungswerte>.

[5] Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed (SCoPAFF). Section Novel Food and Toxicological Safety of the Food

Chain[EB/OL]. [2022-11-10]. https://ec.europa.eu/food/system/files/2022-05/reg-com_toxic_20220421_sum.pdf.

[6] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on mineral oil hydrocarbons in food[J]. EFSA Journal, 2012, 10(6): 2704.

[7] 黄华, 武彦文, 李冰宁, 等. 食用植物油中矿物油污染物的分析进展[J]. 中国油脂, 2018, 43(7): 97-101. [HUANG H, WU Y W, LI B N, et al. Progress in analysis of mineral oil contaminants in edible vegetable oils[J]. China Oils and Fats. 2018, 43(7): 97-101.]

[8] BRÜHL L. Occurrence, determination, and assessment of mineral oils in oilseeds and vegetable oils[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2016, 118(3): 361-372.

[9] LIU L L, HUANG H, WU Y W, et al. Offline solid-phase extraction large volume injection gas chromatography for the analysis of mineral oil saturated hydrocarbons in commercial vegetable oils[J]. Journal of Oleo Science, 2017, 66(9): 981-990.

[10] RUIZ J L H, LIÉBANAS J A, VIDAL J L M, et al. Offline solid-phase extraction and separation of mineral oil saturated hydrocarbons and mineral oil aromatic hydrocarbons in edible oils, and analysis via GC with a flame ionization detector[J]. Foods, 2021, 10(9): 2026.

[11] GIÓMEZ-COCA R B, CERT R, PÉREZ-CAMINO M C, et al. Determination of saturated aliphatic hydrocarbons in vegetable oils[J]. Grasasy Aceites, 2016, 67(2): e127.

[12] 李冰宁, 刘玲玲, 武彦文. 固相萃取-程序升温-气相色谱法与大容量固相萃取-气相色谱法测定食用油脂中饱和烃矿物油的比较[J]. 分析实验室, 2018, 37(6): 701-705. [LI B N, LIU L L, WU Y W. Comparison of solid phase extraction-programmed temperature vaporizer gas-chromatography and large scale-solid phase extraction-gas chromatography for the determination of mineral oil saturated hydrocarbons in edible oils and fats[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2018, 37(6): 701-705.]

[13] BARP L, KORNAUTH C, WUERGER T, et al. Mineral oil in human tissue, Part I: Concentrations and molecular mass distributions[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 72: 312-321.

[14] BIEDERMANN M, BARP L, KORNAUTH C, et al. Mineral oil in human tissues, Part II: Characterization of the accumulated hydrocarbons by comprehensive two-dimensional gas chromatography[J]. Science of The Total Environment, 2015, 506-507: 644-655.

[15] BARP L, BIEDERMANN M, GROB K, et al. Accumulation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats: Comparison with human data and consequences for risk assessment[J]. Science of The Total Environment, 2017, 575: 1263-1278.

[16] BIEDERMANN M, GROB K. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis

of contamination by mineral oil. Part 1: Method of analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1255: 56–75.

[17] 武彦文, 李冰宁, 刘玲玲, 等. 基于高效液相色谱-气相色谱联用技术的矿物油分析研究进展[J]. *分析化学*, 2021, 49(3): 341–349. [WU Y W, LI B N, LIU L L, et al. Research progress of mineral oil analysis based on high performance liquid chromatography-gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 49(3): 341–349.]

[18] European Committee for Standardization (CEN) European standard (EN) 16995-2017 Foodstuffs-Vegetable oils and food-stuff on basis of vegetable oils-Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) with on-line HPLC-GC-FID analysis[S]. Brussels: BSI standards Limited, 2017.

[19] BRATINOVA S, HOEKSTRA E. Guidance on sampling, analysis and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials[J]. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019, 40(4): 482–492.

[20] LIU L L, LI B N, OUYANG J. Mild mixed-solvent extraction for determination of total mineral oil hydrocarbon contaminants in milk powder products[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333: 127488.

[21] 杨梦奇, 刘玲玲, 李冰宁, 等. 植物油基鱼罐头中矿物油污染物高灵敏检测方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(12): 317–324. [YANG M Q, LIU L L, LI B N, et al. Establishment of highly sensitive determination method for mineral oil contaminants in vegetable oil-based canned fish products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(12): 317–324.]

[22] German Society for Fat Science (DGF). Draft version for updating EN-16995-2017 Vegetable oils-Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and aromatic hydrocarbons (MOAH) with online coupled HPLC-GC-FID analysis-Method for low limit of quantification[S].

[23] 李鑫. 婴幼儿配方乳粉生产工艺、包装的现状研究[J]. *中国乳业*, 2021(5): 85–90. [XIN L. Current situation and research on production conditions and packages[J]. *China Dairy*, 2021(5): 85–90.]

[24] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 等. 婴幼儿配方乳粉脂质母乳化研究进展[J]. *乳业科学与技术*, 2020, 43(3): 45–49. [JIE L, SU M Y, JIA H X, et al. Recent progress in infant formulas simulating the fat composition of human milk[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2020, 43(3): 45–49.]

[25] BIEDERMANN M, FISELIER K, GROB K. Aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in foods: method for determining the total concentration and first results[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(19): 8711–8721.

[26] NESTOLA M, SCHMIDT T C. Determination of mineral oil aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by online liquid chromatography-gas chromatography-flame ionization detection-evaluation of automated removal strategies for biogenic olefins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1505: 69–76.

[27] European Committee for Standardization (CEN). EN 17517-2021 Animal feeding stuffs; Methods of sampling and analysis-Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) with on-line HPLC-GC-FID analysis[S].

[28] Deutsches Institut für Normung, e.V.(DIN). SPEC 5010-2018 Testing of paper and board-Determination of the transfer of mineral oil hydrocarbons from food contact materials manufactured with portions of recycled pulp[S].

[29] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL002-2018 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2018. [China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-GL002-2018 Guidance on statistics treatment of proficiency testing results and performance evaluation[S]. Beijing: China National Accreditation Service for Conformity Assessment, 2018.]

[30] 全国认证认可标准化技术委员会. GB/T 27043-2012 合格评定 能力验证的通用要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. [Technical Committees. GB 27043-2012 Conformity assessment. General requirements for proficiency testing[S]. Beijing: China Standard Press, 2012.]