

# 《蜂蜡中二十八烷醇、三十烷醇的测定-气相色谱法》

## 编制说明

(征求意见稿)

2012年12月

# 1 项目背景

## 1.1 任务来源

根据中华全国供销合作总社下达的 2011 年第一批国家标准制定计划项目,《蜂蜡中二十八、三十烷醇的测定-气相色谱法》列入 2011 年国家标准制定计划,计划编号为 20110433-T-422。农业部蜂产品监督检验测试中心(北京)负责组织调研、试验并起草制定标准,全国蜂产品标准化工作组为技术归口单位。

## 1.2 主要工作过程

- (一) 全国供销总社下达标准制定任务;
- (二) 制标单位广泛查阅收集国内外相关技术资料和标准;
- (三) 蜂蜡中二十八、三十烷醇的提取定方法优化选择;
- (四) 建立二十八、三十烷醇的测定分离检测方法;
- (五) 方法准确度与精密度实验与验证;
- (六) 编写标准讨论稿,在有关单位试用验证;
- (七) 编写标准征求意见稿及编制说明,广泛向有关检测、生产、推广、科研及大专院校等单位征求意见。
- (八) 意见汇总,标准修改,形成送审稿,申请审定。

## 2 标准编制背景及意义

蜂蜡又称黄蜡、蜜蜡,是工蜂蜡腺分泌出来的天然物质。由于蜂种不同,可分为中蜂蜂蜡和西方蜜蜂蜂蜡。根据蜂蜡原料的来源,可把蜂蜡分为蜜盖蜡、巢脾蜡和熬脾蜡等。研究表明蜂蜡具有降低胆固醇 LDL-C 水平,从而减少心脏病的风险,具有增强体力、精力、耐力,促进血液循环,提高氧输送能力和基础代谢率,提高应激能力,提高机体代谢率,改善心肌营养和降低收缩期血压等功能。蜂蜡具有如此多的功能主要源于其含有的烷醇类物质,其中主要为二十八烷醇和三十烷醇。二十八醇是一种新型功能性食品添加剂,它具有增强体力、精力和耐力,提高应激能力,降低血清胆固醇和甘油三脂含量等功能,能促进血液循环,同时还能提高氧输送能力和基础代谢率。三十烷醇是一种天然植物生长素,对植物生长有刺激作用,它被广泛应用到农业增产、花卉种植、组织培养等领域。

随着近些年二十八烷醇和三十烷醇在农业生产、食品加工,化妆品和保健品中的广泛应用,蜂蜡作为二十八烷醇和三十烷醇提取物的主要原料之一,其产品

质量成为重点关注的对象。目前，国标或行业标准主要通过感官，皂化值，熔点，酸值和碳烃化合物等指标来评价蜂蜡的质量。二十八烷醇和三十烷醇作为蜂蜡的主要活性成分，已经成为评价蜂蜡质量的两个重要指标，但是目前并没有分析蜂蜡中二十八烷醇和三十烷醇含量的分析方法标准。为了更好促进蜂蜡的应用与开发，完善蜂蜡的质量评价标准，应该及时制定蜂蜡中二十八烷醇和三十烷醇含量的标准方法，为蜂蜡的质量安全与评价提供必要的技术储备。

目前报道的二十八烷醇和三十烷醇的分析方法主要有气相色谱-火焰离子化检测(GC-FID)，气相色谱-质谱法(GC-MS)和液相色谱蒸发光检测方法(LC-ELSD)。其中，GC-FID 仪器简单，普及较广，是定量分析的首选方法。GC-MS 主要用于蜂蜡组分的研究。LC-ELSD 仅能分析基质简单，含量较高的样品。文献报道的方法以 GC-FID 为主，为了标准方法的易于推广与应用，本标准选择 GC-FID 为检测分析设备。借鉴前人的方法，通过优化提取和分析参数，建立了适用于蜂蜡中二十八烷醇和三十烷醇的分析方法。

### **3 标准的编写原则及路线**

#### **3.1 标准的编写原则**

本标准的编写制订过程中以提高测试方法选择性、精密度、检测限、准确度和分析效率，降低分析成本为总原则，力求反映科学技术的先进成果和先进经验。遵循了标准制订过程中的先进性、经济性和适用性原则。

在标准的制订过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则的要求》、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》和GB/T 20001.4-2001《标准编写规则第4部分：化学分析方法》的要求编写。在标准制订过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

### **4 标准主要内容的确定**

#### **4.1 标准适用范围的确**

本标准适用于蜂蜡中二十八烷醇和三十烷醇的测定。

#### **4.2 方法条件的优化与分析**

##### **4.2.1 提取方法的选择**

蜂蜡中烷醇经常以其醇酯的形式存在，例如在蜂蜡中游离的三十烷醇非常少，主要蜡酸三十烷醇酯和十六烯酸三十烷醇酯的形式存在。因此，需要通过水解，将醇酯水解（皂化）为烷醇后，才能准确测定蜂蜡样品中的二十八烷醇和三十烷醇含量。目前，烷醇的主要提取方法主要有以下几种：1. 蜂蜡皂化水解，有机溶剂提取，用水除皂，重结晶；2. 蜂蜡经醇解后，用真空蒸馏方式提取；3. 蜂蜡经皂化，用超临界方法提取烷醇；4. 蜂蜡皂化后，用分子蒸馏的方法提取。这些方法均能有效的提取和纯化原料中的烷醇，其中第一个方法-皂化-液液提取法操作较为简单，应用的最广范。因此本标准选择此方法作为蜂蜡中二十八烷醇和三十烷醇的提取方法，并借鉴GB/T 24314-2009 蜂蜡中皂化的方法，即用0.5mol/L的氢氧化钾乙醇溶液90℃水浴皂化。根据实际样品测定情况，修改样品的称样量，氢氧化钾溶液的用量和皂化时间。

甲苯、苯和三氯甲烷是最常用的用于溶解和提取蜂蜡和烷醇的溶剂。试验发现这三种溶剂都可以有效的提取皂化后溶液中的烷醇类物质。实际操作当中，因为密度的不同，加水除皂时，甲苯和苯的皂化液在下层，在多次用水洗涤时，容易造成损失，导致测定结果重复性差。三氯甲烷提取时，加水除皂后，皂化液在上层，且分层明显，方便多次洗涤，易于去除。因此，方法选择三氯甲烷作为提取溶剂。

优化后的提取方法如下：

称取均匀的样品 0.25 g，精确至 0.1 mg，置于 150 mL 三角瓶中，加入 20 mL 氢氧化钾溶液，水浴 90 ℃ 回流 2 h，60 ℃ 旋转蒸发去除乙醇后，加入 50 mL 氯仿溶解残渣，并将溶液全部转移至透明玻璃离心管中，加入 30 mL 水，漩涡振荡 1 min，静置，移去上层液体，重复用 30 mL 水清洗两次，将有机相转移至 100 mL 容量瓶中，并用氯仿定容。测定前，取适量溶液经无水硫酸钠干燥，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，气相色谱测定。

#### 4.2.2 仪器测定条件的选择

检索有关二十八烷醇和三十烷醇含量测定的文献，最经常使用的方法为GC/MS法和GC-FID法。GC/MS法主要用于定性分析和烷醇种类的研究。GC-FID主要用于定量分析研究。FID是气相色谱的常规检测器之一，普及应用较广，在许多检测机构及大型蜂产品企业都有配备，为满足标准的可推广性，本标准选择了

GC-FID作为测定仪器。

文献报道二十八烷醇和三十烷的气相色谱分析时主要毛细管柱类型是HP-5等弱极性的毛细管柱。在试验中我们选择了类似的毛细管柱 DB-5作为分析色谱柱。通过优化J. J. Jimenez教授报道的商业蜂蜡组分气相色谱质谱分析方法中的气相色谱分析条件，建立了适用于蜂蜡二十八烷醇和三十烷的FID测定方法。优化后的仪器条件如下：

色谱柱：DB-5 30 m × 0.25 mm（内径）× 0.25 μm 或相当者；

柱温：200 °C保持 1 min，以 5 °C/min 的速率升温到 320 °C，保持 10 min；

进样口温度：320 °C；

检测器温度：340 °C；

载气：氮气（N<sub>2</sub>），纯度 ≥ 99.99%；

燃气：氢气（H<sub>2</sub>），纯度 ≥ 99.99%；

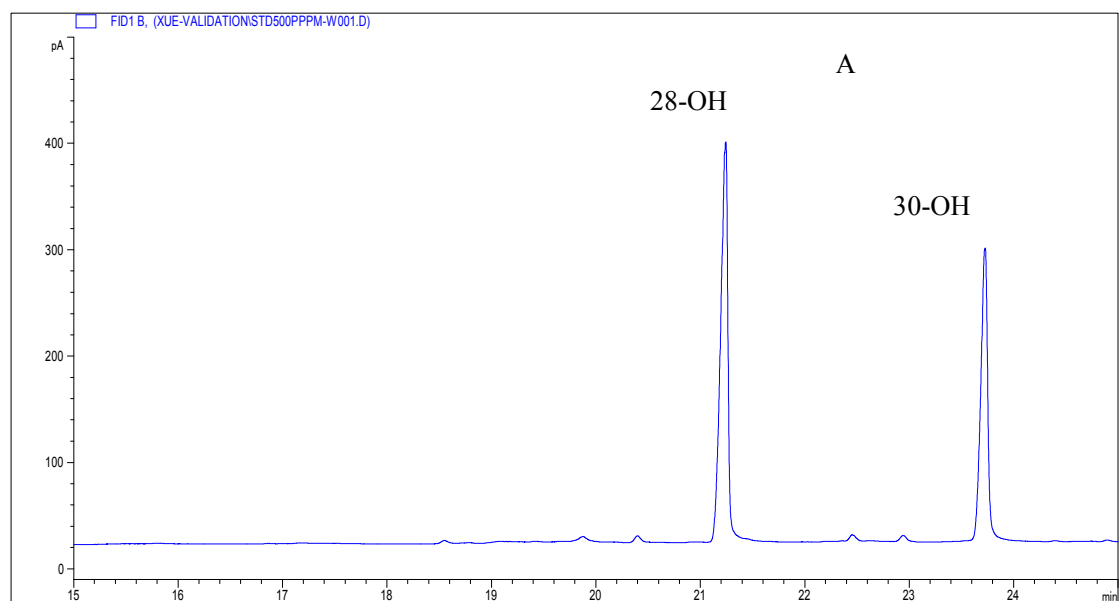
柱流速：1.0 mL/min；

氢气流速：30 mL/min；

空气流速：300 mL/min；

不分流进样：2 μL。

优化后的仪器条件可以满足实际蜂蜡样品中二十八烷醇和三十烷含量的测定，标准溶液，蜂蜡样品的分析色谱图，见下图1。



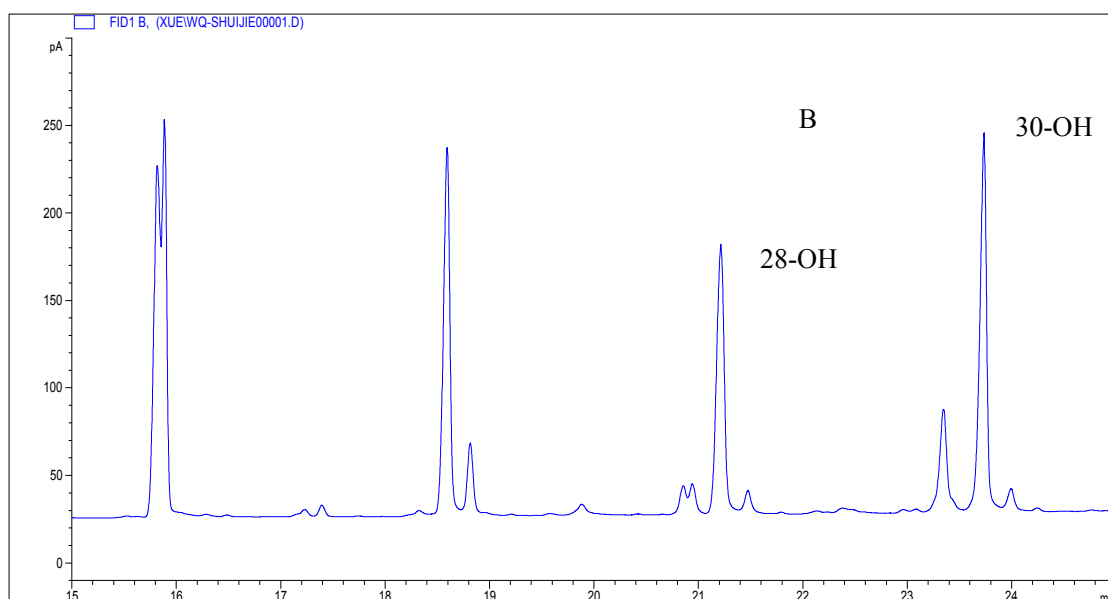


图1 标准溶液 (A), 实际样品 (B) 气相色谱分析色谱图

### 4.3 方法学评价

#### 4.3.1 线性范围和检出限

配制二十八烷醇和三十烷醇浓度范围为10.0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L混合标准溶液在选定的色谱条件下测定, 用峰面积对标准溶液中各被测组分的浓度作图。二十八烷醇和三十烷醇在浓度范围内均呈线性关系, 符合定量要求, 其线性范围、线性方程和校正因子见表2。

表1. 二十八烷醇和三十烷醇线性方程和校正因子

名称	线性范围 (mg/L)	线性方程	相关系数 ( $R^2$ )
二十八烷醇	10-500	$Y=2.180X-12.156$	0.9972
三十烷醇	10-500	$Y=1.4168X-14.486$	0.9973

将标准溶液进行系列稀释, 在进针 $2\mu\text{L}$ 时, 根据10倍信噪比确定方法检出限, 二十八烷醇为5 mg/L, 三十烷醇8 mg/L。

#### 4.3.2 方法的加标回收率

根据GB/T 5009.1-2003 《食品卫生检验方法 理化部分 总则》, 准确度为测定平均值与真值的相符程度。准确度的测定: 将某一稳定样品中加入不同水平已知量的标准物质 (将标准物质的量作为真值), 称加标样品, 同时测定样品和加

标样品，加标样品扣除样品值后与标准物质的误差即为该方法的准确度。本试验通过添加回收率来测定方法的准确度。按照上述处理和测定方法，选择1个蜂蜡样品，添加3个不同浓度，计算方法的回收率。见表2和表3。

从表2和表3可以看出，在二十八烷醇在三个水平添加的回收率在89.0%–102%，相对标准偏差（RSD）在1.64%–5.04%；三十烷醇在三个水平添加的回收率在86.5%–110.2%，相对标准偏差（RSD）在1.81%–3.66%。方法有着很好的回收率和重复性。

**表2 二十八烷醇添加回收率**

实验 次数	二十八烷醇					
	1%		2%		5%	
	测定值	回收率	测定值	回收率	测定值	回收率
1	0.91	91.0	1.92	96.0	4.93	98.6
2	0.93	93.0	1.89	94.5	4.82	96.4
3	1.02	102.0	1.93	95.4	4.89	97.8
4	0.89	89.0	1.99	99.5	4.91	98.2
5	0.96	96.0	2.01	100.5	4.80	96.0
6	0.91	91.0	1.84	92.0	4.72	94.4
平均值	0.94	93.7	1.93	96.5	4.85	96.9
SD	0.05		0.06		0.08	
RSD %	5.04		3.26		1.64	

**表3 三十烷醇添加回收率**

实验 次数	三十烷醇					
	2%		5%		10%	
	测定值	回收率	测定值	回收率	测定值	回收率
1	1.78	89.0	4.91	98.2	9.42	94.2
2	1.86	93.0	4.78	95.6	9.38	93.8
3	1.82	91.0	4.82	96.4	9.61	96.1
4	1.79	89.5	4.86	97.2	9.49	94.9
5	1.92	96.0	5.01	100.2	9.73	97.3
6	1.73	86.5	4.73	94.6	9.81	98.1
平均值	1.82	90.8	4.85	97.0	9.57	95.7
SD	0.07		0.10		0.17	
RSD%	3.66		2.05		1.81	

#### 4.3.3 方法重现性和再现性

参照GB/T 6379.2-2004《测试方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分》和GB/T 6379.6-2009《测试方法与结果的准确度（正确度与精密度）第6部分》，由本单位（编号为4农业部蜂产品质量监督检验测试中心（北京））及农业部

兽药安全性评价监督检验测试中心等5家协作实验室进行方法的再现性试验，比对原始数据和试验室间方法的再现性，数据统计结果分别见表4到表7。对表4到表5的数据进行检查分析，二十八烷醇和三十烷醇的数据统计如下：

二十八烷醇：重复性标准差：Sr=0.145；再现性标准差：SR=0.151；重复性限：r=0.40 再现性限：R=0.42。

三十烷醇：重复性标准差：Sr=0.186；再现性标准差：SR=0.186；重复性限：r=0.52 再现性限：R=0.53。

表4二十八烷醇方法再现性实验室间比对原始数据

实验室名称	二十八烷醇含量 (%)		
	1	2	3
1	2.69	2.97	2.89
2	2.73	2.69	2.98
3	2.62	2.45	2.79
4	2.64	2.91	2.76
5	2.81	2.66	2.93
6	2.51	2.73	2.67

表5三十烷醇方法再现性实验室间比对原始数据

实验室名称	三十烷醇含量 (%)		
	1	2	3
1	20.98	20.57	20.61
2	20.69	20.91	20.75
3	20.44	20.78	20.26
4	20.38	20.59	20.77
5	20.48	20.79	20.59
6	20.87	20.66	20.72



表6二十八烷醇实验室间方法的再现性数据统计结果

实验室名称	平均值 X	重复 n	方差 S <sup>2</sup>	
1	2.85	3	0.0208	
2	2.80	3	0.0247	
3	2.62	3	0.0289	
4	2.77	3	0.0183	
5	2.8	3	0.0183	
6	2.6	3	0.0129	
检验单元 方差科克伦检验)	最大方差	科克伦统计量	科克伦检验临界值	判定
	实验室 3	0.312	0.768(5%) 0.864(1%)	正常
检验单元 平均值 格拉布斯检验)	单个低值	单个高值	格拉布斯检验临界值 单值检验临界值	判定
	1.32	1.09	1.48(5%) 1.49(1%)	正常
比对试验 数据统计 结果	参加实验室的数目 (m)			6
	可接受结果的数目			6
	平均值 (%),	$\bar{X}_m = \frac{\sum n_i x_i}{\sum n_i}$		2.75
	重复性标准差 (Sr)	$Sr = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m S_i^2}{m}}$		0.145
	重复性变异系数(%)			5.23
	重复性限 (r) ,	r = 2.8 × Sr		0.40
	组间变动性方差(SL2)			0.0021
	$SL2 = \frac{m \sum_{i=1}^m \bar{x}_i^2 - (\sum_{i=1}^m \bar{x}_i)^2}{m(m-1)} - \frac{S_r^2}{n}$			
	再现性标准差 SR	$SR = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$		0.151
	再现性变异系数 (%)			5.50
再现性限 (R)	R = 2.8 × SR		0.42	

表7三十烷醇样品实验室间方法的再现性数据统计结果

实验室名称		平均值 X	重复 n	方差 s <sup>2</sup>
1		20.72	3	0.0511
2		20.78	3	0.0129
3		20.49	3	0.0697
4		20.58	3	0.0381
5		20.62	3	0.0247
6		20.75	3	0.0117
检验单元方差 (科克伦检验)	最大方差	科克伦统计量	科克伦检验临界值	判定
	实验室 3	0.406	0.768(5%); 0.864(1%)	正常
检验单元平均值 (格拉布斯检 验)	单个低值	单个高值	格拉布斯检验临界值 单值检验临界值	判定
	1.47	1.12	1.481(5%); 1.496(1%)	正常
比对试验 数据统计结果	参加实验室的数目 (m)			6
	可接受结果的数目			6
	平均值 (%),	$\bar{X}_m = \frac{\sum n_i x_i}{\sum n_i}$		20.66
	重复性标准差 (S <sub>r</sub> )	$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m S_i^2}{m}}$		0.186
	重复性变异系数(%)			0.902
	重复性限 (r) ,	$r = 2.8 \times S_r$		0.522
	组间变动性方差(S <sub>L</sub> <sup>2</sup> )	$S_L^2 = \frac{m \sum_{i=1}^m \bar{x}_i^2 - (\sum_{i=1}^m \bar{x}_i)^2}{m(m-1)} - \frac{S_r^2}{n}$		0.00096
	再现性标准差 S <sub>R</sub>	$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$		0.189
	再现性变异系数 (%)			0.914
	再现性限 (R)	$R = 2.8 \times S_R$		0.523

## 5 标准基本评价

本标准严格按照 GB/T1.1-2009、GB/T20000.2-2009 的要求进行编写，格式符合标准要求，技术内容叙述无误，文字表达准确、简明、易懂，标准结构布局合理，层次划分符合逻辑。制标单位在制定标准前查阅了大量资料和进行了多项研究，并进行了大量的样品测试，验证方法的适用性。在标准制定中，尽量选择简单的处理步骤，通用的仪器设备，标准技术内容科学实用，使得标准易于后期的推广与应用。

## 6 与有关现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。

## 7 作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准为烷醇类含量的测定方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一，因此建议将其作为推荐性国家标准颁布实施。

## 8 标准在编制过程中意见分歧情况

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

## 9 致谢

本标准在编制过程中，得到很多专家的指导和帮助，特此表示感谢！

农业部蜂产品质量监督检验测试中心（北京）

二〇一二年十二月

## 参考文献

- [1] 食品添加剂指定标准 食品添加剂 蜂蜡
- [2] SN/T 1107-2002 出口蜂蜡检验规程
- [3] SB/T 10190-1993 蜂蜡
- [4] GB/T 24314-2009 蜂蜡
- [5] 徐景耀 周勤 中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂蜡成分研究. 色谱, 19897 (3), 175-176
- [6] 陈芳, 闫红, 蔡同一 气相色谱法测定糠蜡提取物中二十八烷醇和三十烷醇 食品科学, 2003,24 (2): 119-121.
- [7] 周萍 胡福良 胡元强 邵巧云 唐慧洋. 中、西蜂蜂蜡理化指标分析及蜂蜡标准化建议. 中国蜂业 2007,10:
- [8] Chen F., Wang Z., Zhao G., Cai T., Liao X., Guo L., Hu X. Purification process of octacosanol extracts from rice bran wax by molecular distillation. Journal of Food Engineering, 2007, 79 (1): 63-68.
- [9] J.J. Jimenez, et al. Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. Journal of Chromatography A, 1007 (2003) 101–116.
- [10] David Marrero Delange, Luis Gonzalez Bravo Trace determination of 1-octacosanol in rat plasma by solid-phase extraction with Tenax GC and capillary gas chromatography. Journal of Chromatography B, 762 (2001) 43–49.
- [11] Xiaofeng XUE et al. UPLC-ELSD Determination of 1-Octacosanol in Raw Material and Health. Chromatographia, 2012 75:165-168.
- [12] GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分: 标准的结构和编写规则的要求
- [13] GB/T 5009.1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则
- [14] GB/T 20001.4-2001 标准编写规则第4部分: 化学分析方法
- [15] GB/T 6379.2-2009 测量方法与结果的准确度 第2部分 确定标准测量方法重复性与再现性