

高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法 测定原料乳中的硫氰酸钠

冯 蕾¹, 鄢爱平², 郭 岚², 万益群^{*1,2}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

2. 南昌大学分析测试中心, 江西南昌 330047)

摘 要:建立了原料乳中硫氰酸钠的离子色谱-积分脉冲安培检测器分析方法。样品经无水乙醇沉淀蛋白,离心后经 ENVI-18 固相萃取小柱净化,采用 IonPac® AG21 保护柱(50×2 mm)和 IonPac® AS21 分析柱(250×2 mm)进行分离,在优化的安培检测波形条件下,硫氰酸钠在 0.01~0.50 mg/L 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系,相关系数为 0.9999,检出限为 0.005 mg/L。在 1.00 mg/kg 和 5.00 mg/kg 两个水平添加时的平均回收率分别为 92.4% 和 105.0%,相对标准偏差分别为 9.94% 和 6.79%。该方法灵敏度高、快速准确、经济环保,可用于原料乳样品中硫氰酸钠测定。

关键词:高效阴离子交换色谱;固相萃取;硫氰酸钠;原料乳

中图分类号:O657.7⁺5

文献标志码:A

文章编号:1006-6144(2014)03-361-04

原料乳中含有丰富的乳蛋白、脂肪酸和多种微量元素,它是人体所需营养成分的重要来源,其质量安全受到人们的广泛关注。原料乳极易腐败变质,因此,在原料乳中非法掺入硫氰酸钠,可以抑制乳中过氧化物酶体系的活性,达到保鲜及延长原料乳保质期的目的^[1]。然而,硫氰酸钠是有毒物质,过量摄入可抑制人体甲状腺聚碘功能,引起甲状腺机能低下,致使脑垂体前叶代谢性地加强分泌促甲状腺素,从而导致甲状腺组织增生肿大^[2]。因此,研究并建立简便、灵敏、经济环保的硫氰酸钠分析方法,对于保障原料乳的质量安全有着重要的现实意义。目前,对于硫氰酸钠的测定,主要采用分光光度法^[3-4]、高效液相色谱法^[5]、毛细管电泳法^[6-7]和离子色谱法^[8-10]等。其中,以离子色谱法的应用最为广泛,该方法不使用有毒试剂,有利于环境保护和操作人员的健康^[11]。但尚未见将高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法应用于检测原料乳中硫氰酸钠的报道。

本文在系统探讨硫氰酸钠色谱分离条件的基础上,对检测波形进行了优化,建立了高效阴离子交换色谱-脉冲积分安培法测定原料乳中硫氰酸钠的分析方法,并用于原料乳中硫氰酸钠含量的监测。该方法具有灵敏度高、分析速度快、样品前处理简单、对环境造成的二次污染小等特点,为有效监控乳及乳制品中硫氰酸钠的含量提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ICS-2500 型离子色谱仪(美国, Dionex 公司),包括 GP50 四元梯度泵、LC25 色谱柱箱和 ED50 电化学检测器,安培检测池以金电极为工作电极、Ag/AgCl 电极为参比电极和包含池体的钛为对电极组成;仪器控制数据处理采用 Chemleon 6.8 色谱工作站;固相萃取装置(美国, Supelco 公司);TDL-5-A 低速大容

收稿日期:2013-08-19

修回日期:2013-09-25

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划(No. 2012BAK17B02);江西省科技支撑计划重大项目(No. 20133ACG70002)

* 通讯作者:万益群,男,博士,教授,博士研究生导师,主要研究方向:食品质量与安全。

量离心机(上海安亭科学仪器厂);MS2 迷你振荡器(广州仪科实验室技术有限公司);Milli-QS 超纯水器(美国,Millipore 公司)。

硫氰酸钠(纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司),标准溶液:准确称取 0.01 g(精确到 0.00001 g)硫氰酸钠至 100 mL 容量瓶,用水稀释至刻度,摇匀,配成 100 mg/L 标准储备液,置于 4℃ 冰箱内保存。使用时配成所需要的浓度。无水乙醇、乙腈、丙酮及其他试剂均为分析纯;Supelco ENVI-18 固相萃取小柱(500 mg/3mL);实验用水均为超纯水(18.2 M Ω ·cm)。

1.2 色谱条件

淋洗液:0.035 mol/L NaOH 溶液;流速:0.45 mL/min;进样体积:25 μ L;色谱柱:IonPac® AG21 保护柱(50 $\times$ 2 mm),IonPac® AS21 分析柱(250 $\times$ 2 mm);柱温:35℃;安培检测器检测波形见表 1。

表 1 安培检测器检测波形
Table 1 Detection waveform for sodium thiocyanate

Time(s)	0.00	0.04	0.05	0.21	0.22	0.46	0.47	0.56	0.57	0.58	0.59	0.60
Potential(V)	E1	-0.30	E2	-0.40	E3	-0.50	E4	-0.40	E5	-2.00	E6	-0.30
(vs. Ag/AgCl)	-0.30		-0.40		-0.50		-0.40		-2.00		0.60	
Integration	Begin				End							

1.3 样品处理

先将原料乳样品摇匀,准确称取 1.00 g 至 10 mL 刻度离心管中,加入无水乙醇至 5.0 mL,在振荡器上混匀 1.0 min,4 800 r/min 离心 10 min。取 1.0 mL 上清液加入固相萃取小柱中(使用前依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 水活化处理),并用 5 mL 超纯水洗脱,调节洗脱速度 1~3 mL/min,洗脱液用超纯水定容至 10 mL,取 25 μ L 进行色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 检测波形的优化

本文硫氰酸钠检测波形参照氨基酸检测的六电位脉冲波形^[12],对其中影响较大的电位进行优化。将 1.0 mg/L 的硫氰酸钠标准溶液,在选定的色谱条件下进行分析测定,考察了吸附电位(E_1)、引发电位(E_2)和检测电位(E_3)对检测峰面积的影响(图 1)。由结果可知: E_1 在 -0.5~0.05 V 时,硫氰酸钠峰面积逐渐减小,当 E_1 小于 -0.20 V 后变化不大,考虑到金电极的限制,实验最终选择 E_1 为 -0.30 V; E_2 在 -0.60~0 V 时,硫氰酸钠峰面积在 -0.40 V 时达到最大; E_3 从 -0.60 V 增加到 0.30 V,硫氰酸钠峰面积先增后降,在 -0.50 V 时达到最大。因此 E_1 、 E_2 、 E_3 最终分别选择为 -0.30 V、-0.40 V、-0.50 V。

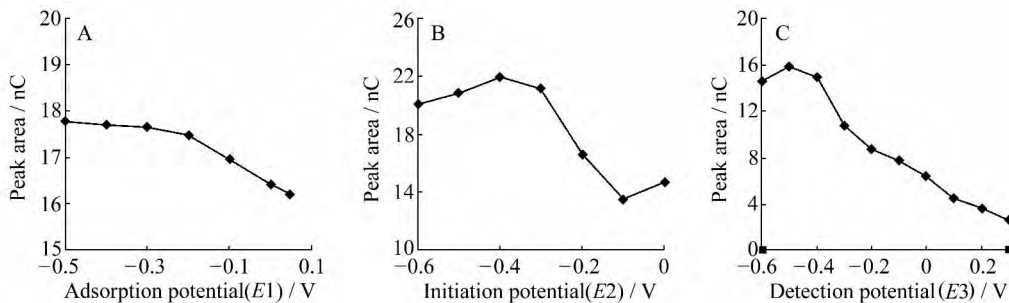


图 1 吸附电位(A)、引发电位(B)和检测电位(C)对硫氰酸钠测定的影响

Fig. 1 Effects of adsorption potential(A), initiation potential(B) and detection potential(C) on the detection of sodium thiocyanate

2.2 干扰试验

分别考察了 1 000 倍的 F⁻、Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻ 等无机阴离子和 100 倍的甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、谷酰胺、天门冬酰胺、蛋氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖等可能存在的共存物质对硫氰酸钠检测的影响,实验结果显示,在已优化的实验条件下,以上物质对硫氰酸钠的分析没

有影响(峰面积相对误差均小于 5%)。

2.3 样品处理条件的优化

原料乳中含有大量的蛋白质。实验探讨了不同沉淀剂去除蛋白质的方法,结果表明,以强碱(NaOH)为沉淀剂,硫氰酸钠的回收率较低(<60%);采用酸处理法处理原料乳样品时,引入了大量的 Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻ 等无机阴离子,对硫氰酸钠的测定存在一定干扰;以无水乙醇、乙腈和丙酮为沉淀剂,硫氰酸钠的回收率在 80%~120%之间。本文采用无水乙醇为蛋白质沉淀剂,可有效去除大量干扰物质。

原料乳基体复杂,本实验选用 ENVI-18 固相萃取小柱,以降低原料乳基质对测定的影响。实验对洗脱液超纯水的体积(2.0~8.0 mL)进行了优化,结果表明当超纯水用量为 5.0 mL 时,ENVI-18 固相萃取小柱可有效去除原料乳中脂肪等大分子有机物,且硫氰酸钠的回收率在 92.4%~105.0%之间。

2.4 线性方程及检出限

将标准储备液配制成 0.01、0.02、0.04、0.08、0.10、0.20、0.40、0.50 mg/L 的标准系列,按选定的色谱条件进行测定,以峰面积(A)与浓度(c,mg/L)作图。结果表明,在 0.01~0.50 mg/L 范围内,硫氰酸钠的线性关系良好,线性方程为: $A=22.627c+0.0141$,相关系数为 0.9999。根据信噪比(S/N)=3 计算,硫氰酸钠的检测限为 0.005 mg/L。

2.5 方法回收率与精密度试验

准确称取 1.00 g 原料乳样品,分别加入 1.00 mg/kg 和 5.00 mg/kg 硫氰酸钠,按选定方法进行样品处理和检测。实验结果显示,两个添加水平的平均回收率分别为 92.4%和 105.0%,相对标准偏差(RSD)分别为 9.94%和 6.79%(表 2),表明本方法测定结果准确可靠,可用于原料乳中硫氰酸钠的检测(图 2)。

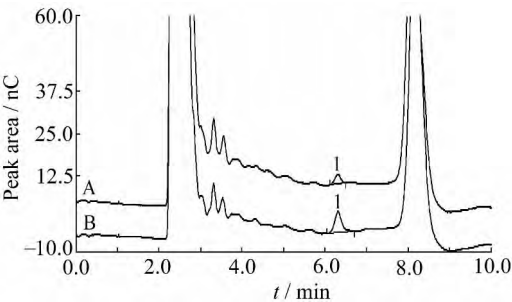


图 2 原料乳样品的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of a raw milk sample
A: raw milk; B: raw milk spiked with 1.00 mg/kg sodium thiocyanate. 1: sodium thiocyanate.

表 2 原料乳中硫氰酸钠加标回收结果

Table 2 Recoveries of sodium thiocyanate in raw milk									
Analyte	Original (mg/kg)	Added (mg/kg)			Found (mg/kg)			Average recovery(%)	RSD (%)
Thiocyanate	1.35	1.00	2.22	2.26	2.23	2.30	2.45	94.2	9.94
		5.00	6.32	6.98	6.93	6.18	6.59	105.0	6.79

2.6 样品测定

实验每周采集江西省南昌市周边五个不同品种(分别来自 2 个牧区、2 个园区及 1 个散户)的原料乳,连续采集 10 批次,应用所建立的分析方法,对原料乳中硫氰酸钠的含量进行监测,结果如图 3 所示。实验结果表明,所采集的 10 批次原料乳中,除园区 2(如图 3D)的第 4 和第 6 批次外,均检出硫氰酸钠。由表 3 可知,10 批次样品中,五种原料乳中硫氰酸钠的含量波动均较大,平均含量在 3.50~6.62 mg/kg 之间,其

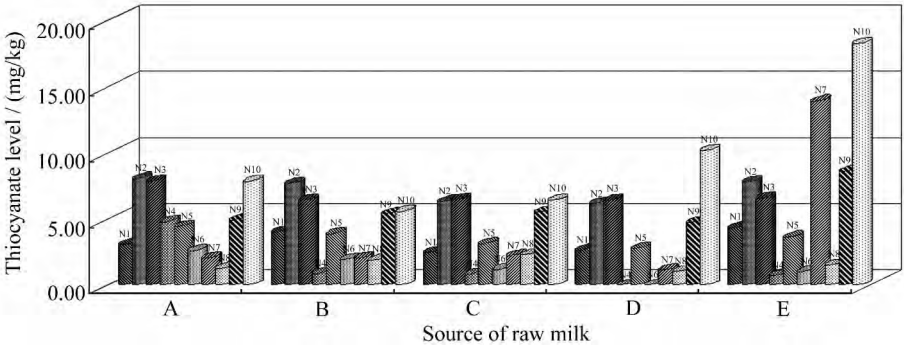


图 3 10 批次 5 个不同品种原料乳中硫氰酸钠的含量

Fig. 3 Levels of sodium thiocyanate in five different kinds of raw milk samples from ten batches
A: raw milk_pasture1; B: raw milk_park1; C: raw milk_park2; D: raw milk_pasture2; E: raw milk_individual; N1~N10: Batch number 1-10.

中散户(图 3E)原料乳中硫氰酸钠的含量波动最大,最高达 18.3 mg/kg。

表 3 不同品种原料乳中硫氰酸钠的分析结果($n=3$)
Table 3 Level of sodium thiocyanate in five different kinds of raw milk($n=3$)

	Pasture-1	Pasture-2	Park-1	Park-2	Individual
Range(mg/kg)	1.28~8.04	0.88~7.66	0.82~6.46	ND ^a ~10.2	0.73~18.3
Average(mg/kg)	4.68	3.95	3.67	3.50	6.62

^a ND: not detectable or lower than limits of quantification.

3 结论

建立了高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法测定原料乳中的硫氰酸钠,系统考察了积分脉冲安培检测器各电位对硫氰酸钠测定结果的影响。应用固相萃取技术对原料乳进行净化处理,除去了大量干扰物质。该方法简单、快速、灵敏度高,为监测乳及乳制品中硫氰酸钠的含量提供了新的技术手段。

参考文献:

[1] MENG Li(孟 利). Food Science(食品科学)[J], 2010, **31**(6): 227.
[2] LI Jing(李 静), WANG Yu(王 雨), LIANG Li-na(梁立娜). Chinese Journal of Chromatography(色谱)[J], 2010, **28**(4): 422.
[3] SU Ting-ting(苏婷婷), XU Ying(续 莺), GU Hong-tao(顾洪涛). China Dairy(中国乳业)[J], 2013, (134): 48.
[4] Themelis D G, Tzanavaras P D. Anal Chim Acta[J], 2002, **452**(2): 295.
[5] WU Jian-ping(吴剑平), GU Xin(顾 欣), LI Dan-ni(李丹妮), YAN Feng(严 凤), ZHANG Xin(张 鑫). China Dairy Industry(中国乳品工业)[J], 2011, **39**(7): 44.
[6] Bjerregaard C, Møller P, Sørensen H. J Chromatogr A[J], 1995, **717**(1-2): 409.
[7] Tanaka Y, Naruishi N, Fukuya H, Sakata J, Saito K, Wakida S. J Chromatogr A[J], 2004, **1051**(1-2): 193.
[8] YE Ming-li(叶明立), HU Zhong-yang(胡忠阳), PAN Guang-wen(潘广文). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)[J], 2011, **39**(11): 1762.
[9] Demkowska I, Polkowska Z, Namieśnik J. J Chromatogr B[J], 2008, **875**(2): 419.
[10] Niemann R A, Anderson D L. J Chromatogr A[J], 2008, **1200**(2): 193.
[11] MOU Shi-fen(牟世芬), LIU Yong-jian(刘勇建). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J], 2005, **21**(4): 449.
[12] Welch L E, Lacourse W R, Mead D A, Johnson D C, Hu T. Anal Chem[J], 1989, **61**(6): 555.

Determination of Sodium Thiocyanate in Raw Milk by High Performance Anion Exchange Chromatography with Integrated Pulsed Amperometric Detection

FENG Lei¹, YAN Ai-ping², GUO Lan², WAN Yi-qun^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047;
2. Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract: A new method for analysis of sodium thiocyanate in raw milk was proposed. Sodium thiocyanate was extracted from milk samples with anhydrous ethanol and cleaned-up by a ENVI-18 SPE column. The target analyte was separated on a Dionex IonPac AS21(250×2 mm) analytical column and IonPac AG21(50×2 mm) guard column with 35 mmol/L sodium hydroxide, and detected by an integrated pulsed amperometric detector(IPAD). The recoveries for the spiked level of 1.00 and 5.00 mg/kg were 92.4% and 105%, respectively, with relative standard deviations of 9.94% and 6.79%, respectively. The detection limit of the method was 0.005 mg/kg(S/N=3).

Keywords: High-performance anion-exchange chromatography; Solid phase extraction(SPE); Sodium thiocyanate; Raw milk