

顶空进样-气相色谱法检测乳制品中硫氰酸盐的含量

宋 洁, 傅英文, 杜利君*, 姚亚婷, 穆夏洁, 康利华, 赵悠悠

(山西出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山西 太原 030024)

摘要: 建立了顶空进样气相色谱法测定乳制品中硫氰酸盐含量的方法。乳制品中硫氰酸盐用水提取, 然后用乙酸锌溶液沉淀蛋白质, 将提取液离心, 取上清液加入氯胺 T 将硫氰酸离子衍生为氯化氰, 顶空进样, 经 BP10 (14% 氰丙基苯基聚硅氧烷) 气相色谱柱分离, 电子捕获检测器 (ECD) 检测, 外标法定量, 同时对衍生剂用量、顶空加热时间和保温温度进行了优化。结果表明: 硫氰酸盐在 0.005 ~ 0.1 mg/L 内线性关系良好, 相关系数 (r) 为 0.997, 定量限 (以信噪比 (S/N) ≥ 10 计) 为 0.1 mg/kg。在 1.0、2.0、10.0 mg/kg 3 个添加水平下进行了回收率和精密度试验, 加标回收率为 90.0% ~ 110.0%, 相对标准偏差 (RSD, $n = 10$) 为 4.98% ~ 7.89%。该方法操作简便、快速、稳定性好, 可用于乳制品中硫氰酸盐的测定, 能满足日常检测要求。应用该法对市售的 18 种乳制品进行了检测, 发现所测乳制品皆含有硫氰酸盐, 含量大约在 0.5 ~ 10 mg/kg。

关键词: 顶空气相色谱法; 硫氰酸盐; 乳制品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)07-0743-04

Determination of thiocyanate in dairy products by headspace gas chromatography

SONG Jie, FU Yingwen, DU Lijun*, YAO Yating, MU Xiajie, KANG Lihua, ZHAO Youyou

(Technology Center for Inspection and Quarantine of Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taiyuan 030024, China)

Abstract: A method for the determination of thiocyanate in dairy products by headspace gas chromatography was established. At first, the thiocyanate in dairy products was extracted by water. Then, the zinc acetate solution was added to the crude product for protein precipitation. The extract obtained above was centrifuged and the supernatant was added with chloramine T, which derivatized the thiocyanate ions to cyanogen chloride. The head-space vapor of the final extract was injected into a BP10 (14% cyanopropyl phenyl polysiloxane) gas chromatographic column, and detected by an electron capture detector (ECD). The target compound was quantified by external standard. The results showed that there was a good linearity between 0.005 mg/L and 0.1 mg/L with the correlation coefficient (r) of 0.997, and the limit of detection (signal-to-noise ratio (S/N) ≥ 10) was 0.1 mg/kg. The recoveries were 90.0% - 110.0% with the relative standard deviations (RSDs) ($n = 10$) of 4.98% - 7.89% at the three spiked levels of 1.0, 2.0, 10.0 mg/kg. In conclusion, this method is simple, rapid and accurate. It can be applied in the determination of thiocyanate in dairy products, and meets the requirements of the daily testing. The method has been successfully used to test 18 kinds of commercially available dairy products and it was found that all the dairy products tested contained thiocyanate about 0.5 - 10 mg/kg.

Key words: headspace gas chromatography; thiocyanate; dairy products

硫氰酸盐的毒性主要由其在体内释放的氰根离子而引起。氰根离子在体内能很快与细胞色素氧化

酶中的三价铁离子结合, 抑制该酶活性, 使组织不能利用氧^[1], 硫氰酸盐少量的摄入就会对人体造成极

* 通讯联系人: 杜利君, 工程师, 主要从事食品中农兽药残留、添加剂检测分析。Tel: (0351) 6160663, E-mail: wuji_du@163.com.

基金项目: 出入境行业标准制定项目(2009B526)。

收稿日期: 2012-02-27

大的伤害。据报道,健康牛的奶中平均含有 0.9 mg/kg 的硫氰酸离子 (SCN^-),范围为 0.4 ~ 22 mg/kg,是乳制品过氧化物酶抗菌体系的主要成分之一^[2]。2008 年 12 月 12 日卫生部发布的《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》中明确规定硫氰酸钠在乳及乳制品中属于违法添加物质。但因为原料乳或奶粉中掺入硫氰酸钠后可有效地起到抑菌、保鲜作用^[3],有些不法奶户为了延长原料乳的保质期,人为添加硫氰酸盐作为生牛奶保鲜剂。

目前检测硫氰酸盐的方法有分光光度法^[4-5]、电位滴定法^[6]、动力学光度法^[7]、高效液相色谱法^[8]、离子色谱法^[9-12]和气相色谱法(GC)^[13-15]。《关于印发全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治抽检工作指导原则和方案的通知》的附件中规定硫氰酸盐的检测方法为离子色谱法,但其前处理复杂,检测成本高。而采用气相色谱检测乳制品中硫氰酸盐含量的文献较少,主要采用的是 α -溴-2,3,4,5,6-五氟甲苯衍生法检测,直接进样方式导致较多的杂质进入色谱柱,从而损伤色谱柱,而且采用二氯甲烷萃取,毒性较大,不利于环境保护。

本方法将乳制品中的硫氰酸盐用水提取、采用乙酸锌溶液沉淀乳制品中的蛋白质,然后用氯胺 T 衍生硫氰酸根离子,采用顶空进样气相色谱法(HS-GC)-电子捕获检测器(ECD)检测。由于采用顶空分析无需对样品进行繁琐的预处理,因此本方法具有简便、高选择性和高灵敏度的特点,能实现自动化,可以应用于日常检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GC2010 气相色谱仪,配有 ECD 检测器(日本岛津公司); Sigma 23K 台式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); Vortex Genie2 旋涡混合器(美国 Vortex-Genie 公司); TurboMatrix HS 自动顶空进样器(美国 PerkinElmer)。

硫氰酸钠标准品(纯度 $\geq 99.99\%$,美国 Sigma 公司);乙酸锌、氯胺 T(天津市科密欧化学试剂有限公司)均为分析纯试剂;实验用水为超纯水(美国密理博公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

硫氰酸根标准储备溶液:准确称取 0.1396 g 硫氰酸钠,用水定容至 100 mL,配制成质量浓度为

1 000 mg/L 的硫氰酸根标准储备溶液。使用时用水稀释成质量浓度为 0、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 mg/L 的标准工作溶液。准确移取 10 mL 标准溶液于 20 mL 顶空瓶中,加入 0.1 mL 10 g/L 的氯胺 T 溶液,立即加盖密封,涡旋混合,待测。

1.2.2 样品处理

称取乳制品 1 g,加入 4 mL 220 g/L 乙酸锌水溶液,用蒸馏水定容至 100 mL,放置 1 h 后,以 4 000 r/min 转速离心 5 min。准确移取 10 mL 上清液于 20 mL 顶空瓶中,加入 0.1 mL 10 g/L 的氯胺 T 溶液,立即加盖密封,涡流混合,待测。

1.2.3 气相色谱条件

色谱柱:BP10(14% 氰丙基苯基聚硅氧烷)毛细管柱(25 m \times 0.32 mm \times 0.50 μm);色谱柱温度:40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,以 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升至 200 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min;载气:氮气,纯度不低于 99.999%;进样口温度:150 $^{\circ}\text{C}$;检测器温度:260 $^{\circ}\text{C}$;分流比:100:1;柱流速:1.0 mL/min。

1.2.4 顶空分析条件

顶空平衡温度:35 $^{\circ}\text{C}$;取样针温度:110 $^{\circ}\text{C}$;传输线温度:120 $^{\circ}\text{C}$;顶空加热时间:20 min;进样时间:0.03 min;加压时间:2.5 min;载气压力:12.5 psi (0.086 MPa)。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

由于硫氰酸盐易溶于水,因此本方法选用水直接提取。由于乳制品中蛋白质含量高,使得硫氰酸盐的测定结果偏低。选择适当的方法将样品中的蛋白质除去很有必要。本方法采用乙酸锌沉淀蛋白质,经试验加入 4 mL 220 g/L 的乙酸锌溶液可以完全沉淀蛋白质,同时对硫氰酸盐的测定没有影响。

2.2 衍生剂及用量的选择

硫氰酸盐不能被气相色谱直接检测,需经过衍生处理转化为具有挥发性和稳定性的衍生物,从而实现气相色谱分析。硫氰酸盐的衍生方法主要有 4 种,分别为溴化衍生法、氯胺 T 衍生法、烷基化衍生法和五氟苯基衍生法^[16]。其中氯胺 T 衍生法为硫氰酸离子与氯定量反应生成氯化氰,反应如下:



CNCl 具有沸点低(15 $^{\circ}\text{C}$)、易挥发的特点,可以采用顶空进样检测。顶空技术的应用大大降低了对样品的前处理过程,减少了样品本身可能对分析的干扰或污染。同时顶空分析技术对分析人员和环境危害小、方法重现性好、能实现自动化。

氯胺 T 作为衍生剂,其用量对检测结果的影响较大。将顶空瓶中硫氰酸离子的质量浓度固定在 0.2 mg/L,分别添加 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 mL 的 10 g/L 氯胺 T 溶液,测定其响应值。由实验数据发现当氯胺 T 用量为 0.05 mL 时即可满足衍生所需量,但为保证有足够的氧化能力,选取衍生剂用量为 0.1 mL。另外,氯胺 T 在存放过程中容易分解而降低活性氯的含量,因此需保存在干燥器中,当氯胺 T 不易溶解时需更换新的氯胺 T。

2.3 顶空保温温度的选择

选择室温、40、50、60、70、80 °C 6 个温度进行试验,发现随着温度的升高,响应值一直升高,但温度过高时气相中的水分含量也在增大,会对检测器有损害。考虑到在满足检出限要求的前提下,应尽量选择低的保温温度,同时为避免环境温度的波动对结果的影响,最终选择了保温温度为 35 °C。

2.4 顶空加热时间的选择

对 0.2 mg/L 的标准溶液加热时间选择 10、20、30、40、50 min 考察加热时间对响应值的影响,发现当顶空加热时间 20 min 后即达到平衡,故最终加热时间选择为 20 min。

2.5 线性范围和定量限

分别配制硫氰酸离子质量浓度为 0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.08、0.1 mg/L 的系列标准工作液进行气相色谱分析,以硫氰酸离子衍生物的质量浓度(X)对峰面积(Y)绘制标准曲线。在 0.005 ~ 0.1 mg/L 内有良好的线性关系,线性方程为: $Y = 2.36 \times 10^7 X + 2.78 \times 10^3$ 相关系数(r)为 0.997。以信噪比大于 10 确定定量限为 0.1 mg/kg。在上述色谱条件下,硫氰酸离子衍生物的色谱图见图 1,出峰时间为 2.5 min。

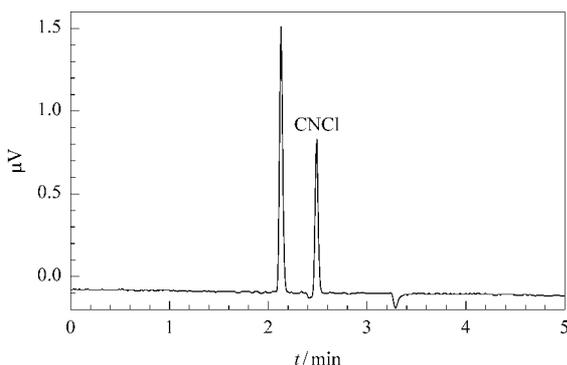


图 1 硫氰酸离子衍生物的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the thiocyanate derivative

Column: BP10 column (25 m × 0.32 mm × 0.50 μm); column temperature: initial temperature 40 °C (hold for 5 min), at 50 °C/min to 200 °C (hold for 2 min); injection port temperature: 150 °C; ECD temperature: 260 °C; split flow: 100:1.

2.6 方法的回收率及精密度

选用纯牛奶、酸奶、奶粉、奶茶、乳饮料、冰激凌 6 个样品,进行了 1.0、2.0、10.0 mg/kg 3 个浓度水平的添加回收试验,每个添加浓度水平下做 10 个平行样品,外标法定量。方法的精密度(用相对标准偏差(RSD)表示)及回收率数据见表 1。酸奶样品和加标样品的气相色谱图分别见图 2 和图 3。

表 1 硫氰酸离子在不同样品中的回收率和相对标准偏差($n=10$)

Table 1 Results of recovery and precision tests of thiocyanate in different samples ($n=10$)

Sample	Background/ (mg/kg)	Added/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
Pure milk	3.8	1.0	95.1	5.36
	3.8	2.0	96.4	5.60
	3.8	10.0	97.3	7.49
Yoghurt	1.8	1.0	93.5	6.86
	1.8	2.0	97.2	6.78
	1.8	10.0	96.9	6.22
Milk powder	1.2	1.0	91.8	6.86
	1.2	2.0	94.5	5.06
	1.2	10.0	95.1	7.39
Milk beverage	1.5	1.0	95.7	7.52
	1.5	2.0	96.8	7.37
	1.5	10.0	97.2	4.98

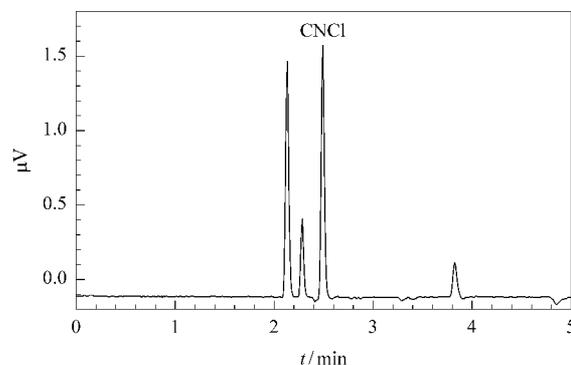


图 2 酸奶样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a yoghurt sample

Chromatographic conditions are the same as in Fig. 1.

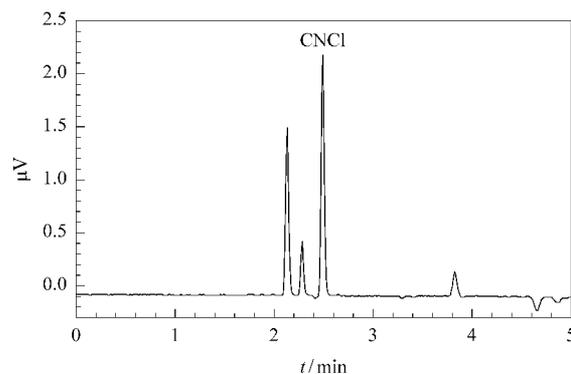


图 3 酸奶样品添加 1 mg/kg 硫氰酸离子的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a yoghurt sample spiked with 1 mg/kg thiocyanate standard

Chromatographic conditions are the same as in Fig. 1.

2.7 实际样品检测

运用本文方法对市场上购买到的 18 种乳制品进行了检测,其中婴儿奶粉 10 种,含量分别为 1.7、3.5、2.3、6.1、5.9、1.7、6.9、7.8、8.0、9.8 mg/kg;奶粉 3 种,含量为 4.0、4.6、6.7 mg/kg; 1 种酸奶含量为 10.7 mg/kg; 1 种奶酪为 3.1 mg/kg; 2 种原料奶为 5.2、6.1 mg/kg; 1 种奶茶为 0.7 mg/kg。

从上述结果可以看出大部分乳制品的硫氰酸离子的含量在 1 mg/kg 以上,但含量差别较大,其原因还有待进一步研究,其含量可能因受奶牛品种、个体、饲养方式等因素的影响而存在很大差异。当牛奶经过浓缩制成奶粉,其天然存在的硫氰酸盐含量会相应提高;但由于硫氰酸盐以前曾做过保鲜剂,直到 2008 年卫生部才明确禁止添加,也不排除现在一些企业仍在非法添加,导致含量过高。

3 结论

本方法采用蒸馏水提取乳制品中的硫氰酸盐,用乙酸锌沉淀乳制品中的蛋白质,将硫氰酸离子衍生后,采用顶空进样,气相色谱法检测。该方法极大地简化了检测步骤,缩短了流程,经济实用,可实现自动化操作,灵敏度高,为乳制品的质量保证提供了一个简便有效的检测手段,可用于大量样品的检测工作。

参考文献:

[1] Zhang T. Environmental Monitoring in China (张彤. 中国环境监测), 1998, 14(1): 13

- [2] Huang Y X, Bai H, Meng S Z, et al. Heilongjiang Animal Husbandry Science and Technology (黄玉贤,白虹,孟淑珍,等. 黑龙江畜牧科技), 1998(3): 8
- [3] Chao H Y, Zhang F X, Wang W. Acta Agriculturae Jiangxi (晁海英,张富新,王伟. 江西农业学报), 2008, 20(12): 81
- [4] Li Q. Life Science Instruments (李琴. 生命科学仪器), 2010, 8(1): 23
- [5] Wang D H, Zhang F M, Li M, et al. Food Science (王丹慧,张凤梅,李梅,等. 食品科学), 2010, 31(18): 298
- [6] Zeng Y L, Tang C R. Chinese Journal of Analysis Laboratory (曾云龙,唐春然. 分析试验室), 2001, 20(3): 66
- [7] Chai H M, Wang G P. Chinese Journal of Analysis Laboratory (柴红梅,王桂浦. 分析试验室), 2009, 28(10): 75
- [8] Wu J P, Gu X, Li D N, et al. China Dairy Industry (吴剑平,顾欣,李丹妮,等. 中国乳品工业), 2011, 39(7): 44
- [9] Feng W K, Xiong J, Luo J L, et al. Modern Food Science and Technology (冯伟科,熊璐,罗佳玲,等. 现代食品科技), 2011, 27(9): 1157
- [10] Zhang B, Liu X L, Li D G, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (张宝,刘晓玲,李东刚,等. 理化检验:化学分册), 2011, 47(2): 211
- [11] Yao J, Zhu J M, Chen M, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (姚敬,朱杰民,陈明,等. 中国卫生检验杂志), 2011, 21(4): 824
- [12] Li J, Wang Y, Liang L N. Chinese Journal of Chromatography (李静,王雨,梁立娜. 色谱), 2010, 28(4): 422
- [13] Hu G L, Xue Z Q, Zhang H X, et al. China Dairy Industry (胡桂林,薛志清,张河霞,等. 中国乳品工业), 2010, 38(10): 54
- [14] Fu Z M, Wu M K. Journal of Environment and Health (符展明,吴梦奎. 环境与健康杂志), 1991, 8(6): 271
- [15] Zhong L K, Fang B. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (钟良康,方波. 中国卫生检验杂志), 2005, 15(5): 568
- [16] Han J. Hebei Journal of Industrial Science & Technology (韩菊. 河北工业科技), 1999, 16(2): 82