

高效液相色谱法测定牛奶中硫氰酸钠含量

邵丽*, 王晓, 滕振勇

(枣庄出入境检验检疫局, 枣庄 277100)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱法检测牛奶中硫氰酸钠含量。**方法** 样品用 5 mL 乙腈沉淀蛋白质, 上清液过 C₁₈ 柱净化。以磷酸缓冲溶液(pH=7.0):乙腈(95:5, V:V)作为流动相, C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分析, 柱温 30 °C±2 °C, 流速 1.0 mL/min, 以紫外检测器分析样品。**结果** 该方法对牛奶中硫氰酸钠有较高的提取率, 质量浓度范围在 5~100 mg/L 内线性较好($r^2=0.9995$), 检测限 1.0 mg/kg, 回收率>90%。**结论** 该方法具有预处理简单、灵敏度高的优点, 满足对牛奶中硫氰酸钠含量的检测要求。

关键词: 高效液相色谱法; 牛奶; 硫氰酸钠

Determination of sodium thiocyanate content in milk by high performance liquid chromatography

SHAO Li*, WANG Xiao, TENG Zhen-Yong

(Zaozhuang Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Zaozhuang 277100, China)

ABSTRACT: Objective To detect the content of sodium thiocyanate in milk by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were purified by protein precipitation and the C₁₈ extraction column. Phosphate buffer: acetonitrile(95:5, V:V) (pH=7.00) was used as the mobile phase, the C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and UV detector were used to analyze samples under column temperature of 30 °C±2 °C and the flow rate of 1.0 mL/min. **Results** The method had a high extraction rate of sodium thiocyanate in milk, the concentration of sodium thiocyanate was linear with peak area in the range of 5~100 mg/L, and the correlation coefficient was 0.9995. The limit of detection was 1.0 mg/kg and the recovery rate was above 90%. **Conclusion** The method is simple and sensitive, which can successfully meet the determination requirement of sodium thiocyanate content in milk.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; milk; sodium thiocyanate

1 引言

硫氰酸钠是一种用作化学分析试剂、聚丙烯腈纤维抽丝溶剂等有毒化工原料, 易溶于水、乙醇和丙酮。硫氰酸钠的毒性主要由其在体内释放氰根离子, 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, 使组织不能利用氧而产生中毒^[1]。原料乳或奶粉中掺入硫氰酸钠后可有效抑菌、保鲜^[2]。1996 年公布的 GB2760-1996《食品添加剂使用卫生标准》^[3]规定可使用

0.3%过氧化氢 2.0 mL/L 和硫氰酸钠 15.0 mg/L 体系用于无冷链运输体系原料乳保鲜。而 2007 年公布的《食品添加剂使用卫生标准》中取消了硫氰酸钠的使用^[4]。2008 年 12 月 12 日卫生部公布《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)》中明确规定乳及乳制品中硫氰酸钠属于违法添加物质^[5]。国际乳联公报 234 号指出, 牛乳中的硫氰酸钠含量是不稳定的, 可以达到 10~15 mg/kg, 通常的浓度范围是 2~7 mg/kg^[6]。目前, 我国还没有乳及乳制品中硫氰酸钠检测标准。牛乳中硫氰酸

*通讯作者: 邵丽, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。Email: phoenixli2008@163.com

*Corresponding author: SHAO Li, Engineer, Technical Center of Zaozhuang Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.8, Xinghua Road, Shizhong District, Zaozhuang 277002, China. E-mail: phoenixli2008@163.com

盐的检测方法一般有分光光度法^[7,8]、气相法^[9]、荧光动力学法^[10]、离子色谱法^[11-13]等, 其中离子色谱法具有灵敏度高、分离效果好的特点, 但是其前处理方法复杂, 回收率也受到影。近年来高效液相色谱法^[14-18]在检测牛奶中的硫氰酸盐使用极为广泛。

2 材料与方

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱 1200(二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司); AE240 电子天平(瑞士 Mettler 公司); 5804R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); R-215 减压旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司); 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); C₁₈ 固相萃取柱(500 mg, 6 mL); 硫氰酸钠(国家标准物质); 磷酸(分析纯)、三乙胺(分析纯)、乙腈(色谱纯)均购于国药集团。

2.2 测定步骤

2.2.1 提取

称取 5 g 液体乳品试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 分别加入 10 mL 乙腈和 2 mL 乙酸锌沉淀蛋白, 涡旋 30 s, 10000 r/min 离心 10 min, 取出全部上清溶液, 得到待净化液, 备用。

2.2.2 净化

C₁₈ 小柱依次用 5 mL 乙腈和 10 mL 水活化备用。将 2.2.1 中得到的待净化液注入 C₁₈ 小柱, 以小于 3 mL/min 的流速通过 C₁₈ 小柱, 收集滤液, 用 5.0 mL 乙腈淋小柱, 收集淋洗液, 合并滤液和淋洗液并在 40 °C 旋转蒸发至近干, 用流动相溶液定容, 待测定。

2.2.3 色谱条件和流动相制备

缓冲液: 取 2.00 mL 磷酸置于 1000 mL 容量瓶, 加水定容至刻度, 用三乙胺调 pH=7.00±0.02; 流动相(磷酸盐缓冲液: 乙腈=95:5, V:V); 色谱柱: ODS-BP C₁₈ 色谱柱(250

mm×4.6 mm, 5 μm); 波长: 218 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

3 结果讨论

3.1 蛋白质沉淀溶液的选择

牛奶样品中蛋白质和脂肪含量较高, 在硫氰酸钠的检测过程中, 样品的净化是难点。通过乙腈和乙酸锌作为蛋白质沉淀剂试验比较发现, 单一选用乙腈作为蛋白沉淀剂时, 净化液较混浊, 效果不理想。加入 2.0 mL 乙酸锌后, 液体澄清, 蛋白质沉淀效果显著增强, 结果见表 1。

3.2 固相萃取柱的选择

牛奶样品中除了蛋白质, 还有大量脂肪、氨基酸和水溶性维生素, 固相萃取柱主要采用选择性吸附和选择性洗脱的方式对样品进行富集、分离、净化。在本实验中主要考察了 HLB、MCX、碱性氧化铝、C₁₈、C₈ 5 种不同填料的 SPE 柱对市售鲜奶进行净化后测定硫氰酸钠质量浓度, 结果如表 2 所示。结果表明, 硫氰酸钠加标回收率均大于 80%, 而 C₁₈、C₈ 对氨基酸、脂肪等具有明显吸附作用, 能够减少杂质对硫氰酸钠检测的干扰, 因此选择 C₁₈ 柱对样品进行净化。

3.3 色谱条件及流动相的选择

在 2.2.3 色谱条件下, 硫氰酸钠标准溶液色谱图如图 1 所示。结果表明, 硫氰酸钠的理论塔板数不低于 6000, 分离度 $R>2.0$, 该色谱条件适用于鲜奶中硫氰酸钠含量的测定。

对于带电的强极性硫氰酸根离子, 一般考虑使用离子对色谱法增强其在反相色谱柱上的保留性。离子对试剂一般有烷基磺酸类和烷基胺类, 本方法选择磷酸-三乙胺缓冲盐体系作为流动相。结果表明, 磷酸(三乙胺调节 pH=7.00): 乙腈=95:5(V:V)能取得较好的峰型和系统适应性参数。

表 1 乙酸锌加入量对沉淀效果的影响
Table 1 Effects of zinc acetate addition on precipitation

乙酸锌加入量(mL)	0	1.0	2.0	5.0
沉淀效果	浑浊	少量浑浊	澄清	澄清

表 2 净化回收率测定(n=3)
Table 2 Determination of purification recovery rate(n=3)

固相萃取柱类型	基底含量 mg/kg	添加含量 mg/kg	测得含量 mg/kg	回收率(%)	RSD(%)
HLB	2.632	2.00	4.398	88.3%	2.67
MCX	3.046	2.00	4.958	95.6%	3.42
碱性氧化铝	2.986	2.00	4.870	94.2%	2.19
C ₁₈	3.254	2.00	5.016	101.5%	1.73
C ₈	3.167	2.00	5.147	99.0%	2.09

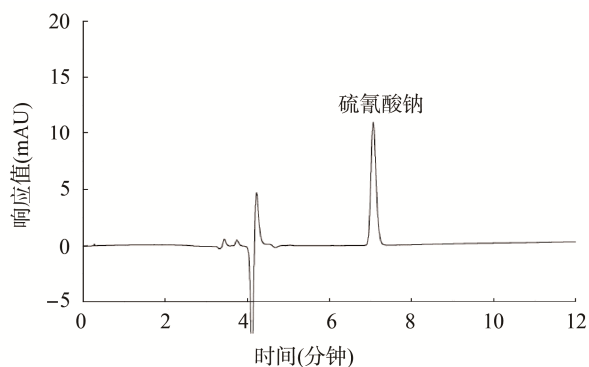


图 1 标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution

3.4 标准曲线方程及检出限

用超纯水将硫氰酸钠逐级稀释成质量浓度为 5、10、25、50、100 mg/L 的系列标准工作溶液, 进样量 10 μ L, 上机测定, 按 2.2.3 的色谱条件操作, 每个浓度分别反复进样 6 次。记录色谱峰面积均值, 以工作液质量浓度(C)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得标准工作曲线 $Y=8.4693C+0.8784$, $r^2=0.9995$ 。结果表明, 硫氰酸钠标准溶液在质量浓度 5~100 mg/L 范围内线性良好。向空白样品中添加硫氰酸钠标准溶液, 根据仪器给出的信噪比参数,

以 3 倍信噪比($S/N=3$)确定方法的检出限, 硫氰酸钠的检出限为 1.0 mg/kg。

3.5 精密度及回收试验

在同一鲜牛奶样品中加入硫氰酸钠标准溶液进行加标回收试验见图 2, 加标浓度分别为 1.0、2.0、10.0 mg/kg, 试验结果见表 3。由表 3 可知, 回收率在 90.0%~103.1% 之间, 相对标准偏差为 0.94%~1.66%。结果表明, 该法的精密度和准确度较高, 能有效地对鲜奶中硫氰酸钠含量进行检测。

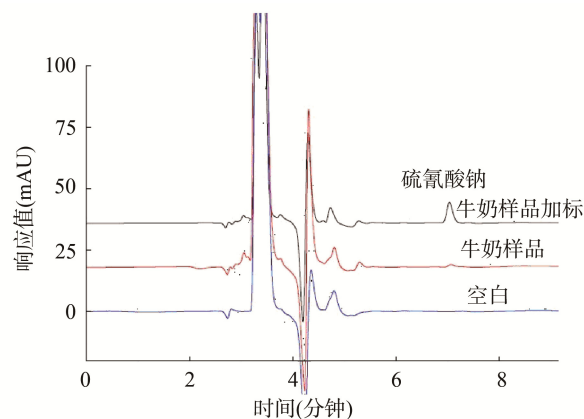


图 2 空白、牛奶样品、牛奶样品加标对比色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank, fresh milk and standard sample

表 3 高效液相色谱法测定牛奶中硫氰酸钠的回收率($n=6$)Table 3 Recovery rates of sodium thiocyanate in milk measured by high performance liquid chromatography ($n=6$)

编号	添加含量 mg/kg	测得含量 mg/kg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1-1	1.0	0.190	90.5		
1-2	1.0	0.185	92.5		
1-3	1.0	0.186	93.0	91.5	1.18
1-4	1.0	0.180	90.0		
1-5	1.0	0.182	91.0		
1-6	1.0	0.184	92.0		
2-1	2.0	1.940	97.0		
2-2	2.0	1.904	95.2		
2-3	2.0	1.921	96.0	96.4	0.94
2-4	2.0	1.928	96.4		
2-5	2.0	1.916	95.8		
2-6	2.0	1.960	98.0		
3-1	5.0	5.081	101.6		
3-2	5.0	4.952	99.0		
3-3	5.0	5.032	100.6	100.34	1.66
3-4	5.0	4.905	98.10		
3-5	5.0	4.983	99.65		
3-6	5.0	5.155	103.1		

4 结 论

本实验利用高效液相色谱法测定鲜奶中硫氰酸钠含量, 对前处理方法进行了优化, 得到较高效、便捷的操作方法, 其检测限和定量限都能达到离子色谱法及其他检测方法相同的水平, 而且操作简便易行, 方法的准确性、重复性较好, 可用于鲜奶中硫氰酸钠含量的检测。

参考文献

- [1] 顾欣, 黄士新, 李丹妮, 等. 乳中硫氰酸盐对人类健康风险评估[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(9): 45-49.
Gu X, Huang SX, Li DN, *et al.* Human health risk assessment of thiocyanate in milk [J]. *Chin J Vet Drug*, 2010, 44(9): 45-49.
- [2] 王丹慧, 高畦, 李梅. 原料乳中硫氰酸钠掺假定性检测方法[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(7): 57-58.
Wang DH, Gao W, Li M. Studied the measurement about how to find out fake sodium thiocyanate in raw milk [J]. *Chin Dairy Ind*, 2008, 36(7): 57-58.
- [3] GB2760-1996 食品添加剂使用卫生标准[S]
GB2760-1996 Hygienic standards for uses of food additives [S].
- [4] GB2760-2007 食品添加剂使用卫生标准[S].
GB2760-2007 Hygienic standards for uses of food additives [S].
- [5] 陈宏靖. 液态乳中硫氰酸钠检测结果分析报告[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(9), 1323-1324.
Chen HJ. Analysis of sodium thiocyanate detection results in liquid milk [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 24(9): 1323-1324.
- [6] 李晰晖, 赵越, 任国谱. 原料乳中硫氰酸钠质量分数的调查与分析[J]. 食品工业, 2013, 34(11): 248-251.
Li XH, Zhao Y, Ren GP. The investigation and analysis of sodium thiocyanate in raw milk [J]. *Food Ind*, 2013, 34(11): 248-251.
- [7] 张贵珠, 刘善军, 何锡文, 等. 动力学分光光度法测定痕量硫氰酸根的研究[J]. 分析化学, 1993, (8): 905-907.
Zhang GZ, Liu SJ, He XW, *et al.* Kinetic spectrophotometric determination of trace amount of thiocyanate [J]. *Anal Chem*, 1993, (8): 905-907.
- [8] 李富兰. 牛奶中微量硫氰酸钠含量的检测[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(6): 184-186.
Li FL. Determination of trace sodium thiocyanate in milk [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2015, 43(6): 184-186.
- [9] 周正香. 气相色谱-质谱法测定乳制品中的硫氰酸根[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 153-156.
Zhou ZX. Determination of thiocyanate in milk and milk powder by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2012, 33(4): 153-156.
- [10] 张贵珠, 张海清, 郭薇, 等. 荧光动力学法测定痕量硫氰根离子的研究[J]. 分析科学学报, 1994, 10(3): 52-54.
Zhang ZG, Zhang HQ, Guo W, *et al.* Studies on kinetic fluorophotometric determination of trace thiocyanate [J]. *J Anal Sci*, 1994, 10(3): 52-54.
- [11] 杨一刚. 离子色谱测定乳制品中硫氰酸钠含量[J]. 食品工程, 2012, 123(2): 55-57.
Yang YG. Ion Chromatographic determination of the sodium thiocyanate content in dairy products [J]. *Food Eng*, 2012, 123(2): 55-57.
- [12] 苗建民, 郝晨雪, 于和水, 等. 离子色谱法测定牛奶中硫氰酸根[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(6): 305-308.
Miao JM, Hao CX, Yu HS, *et al.* Ion Chromatographic determination of thiocyanate in milk [J]. *J Food Saf Qual*, 2011, 2(6): 305-308.
- [13] 陈基耘. 离子色谱法测定乳品中硫氰酸钠含量[J]. 化学分析计量, 2014, 23(4): 42-44.
Chen JY. Determination of sodium thiocyanate content in milk by ion chromatography [J]. *Chem Anal Met*, 2014, 23(4): 42-44.
- [14] 杜兴兰, 徐向东, 王景岩, 等. 牛奶中硫氰酸钠的检测方法研究[J]. 山东轻工业学院学报, 2012, 26(2): 27-29.
Du XL, Xu XD, Wang JY, *et al.* The determination of sodium thiocyanate in milk by HPLC method [J]. *J Shandong Poly Univ*, 2012, 26(2): 27-29.
- [15] 吴剑平, 顾欣, 李丹妮, 等. 高效液相色谱法检测牛奶中硫氰酸钠质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(7): 44-46.
Wu JP, Gu X, Li DN, *et al.* Determination of sodium thiocyanate in milk by HPLC [J]. *Chin Dairy Ind*, 2011, 39(7): 44-46.
- [16] 张丽媛, 于润众, 马萍, 等. 超声辅助固相萃取高效液相色谱法快速分离测定牛奶中的硫氰酸钠[J]. 齐齐哈尔大学学报(自然科学版), 2014, 30(1): 54-58.
Zhang LY, Yu RZ, Ma P, *et al.* Separation and determination of sodium thiocyanate in milk by ultrasound-assisted coupled with solid phase extraction by HPLC [J]. *J Qiqihar Univ (Nat Sci Ed)*, 2014, 30(1): 54-58.
- [17] 陈世奇, 邓美林, 朱永红, 等. 离子对反相高效液相色谱法测定液态奶中硫氰酸根的含量[J]. 理化检测, 2012, 48: 1078-1080.
Chen SQ, Deng ML, Zhu YH, *et al.* Ion-pair RP-HPLC determination of thiocyanate in liquid milk [J]. *PTCA*, 2012, 48: 1078-1080.
- [18] 张丽媛, 姚笛, 贾鹏宇, 等. UA-SPE-HPLC 快速分离法测定乳饮料中的硫氰酸钠的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2014, 26(1): 59-62.
Zhang LY, Yao D, Jia PY, *et al.* Ultrasonic-assisted solid phase extraction for separation and determination of sodium thiocyanate in dairy beverage by HPLC [J]. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ*, 2014, 26(1): 59-62.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



邵 丽, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: phoenixli2008@163.com