

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240130011

引用格式: 汪春明, 王美玲, 王一名, 等. QuEChERS-高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测乳及乳制品中 2-己基吡啶含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 276–283.

WANG CM, WANG ML, WANG YM, *et al.* Determination of 2-hexylpyridine content in milk and dairy product by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 276–283. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS-高效液相色谱-三重四极杆质谱法 检测乳及乳制品中 2-己基吡啶含量

汪春明^{1,2,3}, 王美玲^{1,2,3}, 王一名^{1,2,3}, 彭涛³, 陈冬东^{3*}

[1. 中检科(北京)测试认证有限公司, 北京 100176; 2. 检科院(北京)科学技术有限公司, 北京 100176;
3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176]

摘要: 目的 建立高效液相色谱-三重四极杆质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定乳及乳制品中 2-己基吡啶含量的分析方法。**方法** 样品经乙腈涡旋提取, 分析液经 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 除脂专用管净化, 离心后过膜上机检测。测试方法以乙腈-一级水为流动相, 流速设置为 0.25 mL/min, 应用梯度洗脱程序, 采用 GL Sciences InertSustain C₁₈ 色谱柱进行分离, 电喷雾正离子(electro spray ionization, ESI⁺)模式, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式检测, 基质匹配外标法进行定量。**结果** 对于乳及乳制品基质, 2-己基吡啶在 0.5~20.0 ng/mL 的质量浓度与其相对应的峰面积之间线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.998, 在 0.005、0.010 和 0.050 mg/kg 3 种不同浓度添加水平下, 2-己基吡啶的平均回收率为 94.45%~109.63%, 相对标准偏差为 3.93%~9.53%。**结论** 本方法可满足乳及乳制品中 2-己基吡啶检测的正确度、精密度和灵敏度的要求。

关键词: 2-己基吡啶; 乳及乳制品; 高效液相色谱-三重四极杆质谱法

Determination of 2-hexylpyridine content in milk and dairy product by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Chun-Ming^{1,2,3}, WANG Mei-Ling^{1,2,3}, WANG Yi-Ming^{1,2,3}, PENG Tao³, CHEN Dong-Dong^{3*}

[1. CAIQ (Beijing) Testing and Certification Co., Ltd., Beijing 100176, China; 2. CAIQ (Beijing) Science and Technology Co., Ltd., Beijing 100176, China; 3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 2-hexylpyridine content in the milk and dairy product by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The

收稿日期: 2024-01-30

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2023JK016)

第一作者: 汪春明(1986—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 598898364@qq.com

*通信作者: 陈冬东(1975—), 女, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: chendd@acas.com.cn

sample was extracted by acetonitrile vortex extraction, and the analytical solution was purified by QuEChERS dSPE EMR Lipid degreasing tube. After centrifugation, it was tested on a membrane machine. The acetonitrile primary water as the mobile phase was used, the flow rate was set at 0.25 mL/min, the gradient elution procedure was applied, the GL Sciences InertSustain C₁₈ chromatographic column was used for separation, the electro spray positive ion (ESI⁺) mode, the multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for detection, and the matrix matching external standard method was used for quantification. **Results** The methodological validation indicators were well that the calibration curves were linear in the range of 0.5–20.0 ng/mL with the correlation coefficients (r^2) larger than 0.998. The average recoveries of 2-hexylpyridine were 94.45%–109.63% and the relative standard deviations were 3.93%–9.53% at 0.005, 0.010 and 0.050 mg/kg with 3 kinds of spiked levels.

Conclusion The accuracy, precision, and sensitivity of the method meet the requirements for residue detection.

KEY WORDS: 2-hexylpyridine; milk and dairy product; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

2-己基吡啶(2-hexylpyridine), CAS: 1129-69-7, 中文别名为 2-正己基吡啶, 分子式 C₁₁H₁₇N, 化学结构式如图 1 所示, 相对分子质量为 163.26。2-己基吡啶纯品为无色到淡黄色液体, 有蔬菜样的青香气味, 并具有药草香和油脂气息^[1-3]。2-己基吡啶是重要的原料和中间体, 即用于有机合成、医药、农药、染料等领域, 同时也被用在蔬菜、肉类和坚果等食品中起到改善食品味道或气味的作用^[4-6]。2022 年 10 月 2-己基吡啶被用于我国的食品添加剂并公开征求意见^[7], 到 2023 年 3 月 2-己基吡啶新品种的安全性评估材料进行审查并通过^[8], 表明该物质可配制成食品用香精后用于各类食品(GB 2760 表 B.1 食品类别除外), 来改善食品的味道。GB 2760 表 B.1 中不得添加食品用香料、香精的食品有巴氏杀菌乳、灭菌乳和高温杀菌乳、发酵乳和婴幼儿配方食品, 可见 2-己基吡啶不能作为添加剂用于这些食品中。因此有必要建立乳及乳制品中 2-己基吡啶的检测方法。

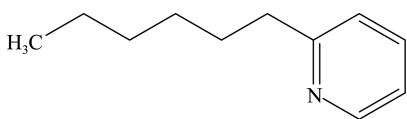


图1 2-己基吡啶的化学结构式

Fig.1 Chemical structural formula of 2-hexylpyridine

目前, 征求意见稿中 2-己基吡啶的测定方法为气相色谱-氢火焰离子化检测器-面积归一化法, 此方法的局限性在于: 样品中除目标物以外的组分, 会对目标物的分析过程有显著的干扰, 并影响分析结果的准确性, 特别是干扰峰和测定目标峰有重合; 目标化合物在这一特定的色谱条件下其特征的保留时间过长(39.16 min); 样品全部组分必须流出, 并可测出其信号, 实际操作烦琐且难以准确

量。同时也未见到 2-己基吡啶的其他研究报告, 为了更快速高效地检测乳及乳制品中 2-己基吡啶残留, 本研究利用快速检测方法 QuEChERS-聚合物净化材料 QuEChERS dSPE EMR-Lipid, 结合高效液相色谱-三重四极杆质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS), 建立 2-己基吡啶的分析测试方法, 以期对定性、定量分析乳及乳制品中 2-己基吡啶提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-20AD-LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪、GL Sciences InertSustain C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 3 μm)、Shim-pack GIST-HP C₁₈-AQ (150 mm×2.1 mm, 1.9 μm)(日本 Shimadzu 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); STV-100 多管涡旋混合仪(中国茂丰公司); VORTEX GENIE 2 可调速涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司); LG-25M 离心机(中国蜀科公司); EFAA-DC24-RT 氮吹仪(中国安谱公司); XS105&PL303 分析天平(感量 0.01 g 和 0.00001 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司); 默克 Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

2-己基吡啶(100 mg, 美国 Panphy 公司); 甲酸、乙腈、丙酮、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); POLY-SERY HLB 聚乙烯-亲水亲油平衡柱(上海安谱公司); 氯化钠(NaCl, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 十八烷基硅烷键合硅胶(reversed phase silica gel C₁₈, C₁₈)、QuEChERS dSPE EMR-Lipid、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)(美国 Agilent 科技有限公司); 增强型无机除脂固相萃取填料(HMR-Lipid)(北京纳鸥公司); 活性硅土(active silica, Si)(美国 Supelco 公司); Cleanert LipoNo、弗罗里硅土(Florisil)、中性氧化铝(alumina N-neutral, AL-N)(BONDESIL-AL-N)(天津 Bonna-Agela 公司); 石墨化碳黑

(graphitized carbon black, GCB)(上海月旭科技有限公司); 0.22 μm 尼龙(Nylon)滤膜、0.22 μm 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)滤膜、0.22 μm 聚醚砜(polyethersulfone, PES)滤膜、混合纤维素酯(mixed cellulose esters, MCE)滤膜(天津津滕公司); 0.2 μm 亲水性聚丙烯(waterborne polypropylene, GHP)滤膜(美国 Waters 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

2-己基吡啶标准储备液的配制: 准确称取 2-己基吡啶 90 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用丙酮定容至刻度, 即得到 9 mg/mL 的 2-己基吡啶标准储备液。

标准中间液的配制: 准确移取适量上述标准储备液于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈将其定容至刻度, 即得 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 2-己基吡啶标准中间液。

工作曲线标准溶液的配制: 分别移取 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 2-己基吡啶标准中间溶液 5、10、20、50、100、200 μL 于 6 个 10 mL 容量瓶, 分别由乙腈定容至刻度得到中间工作溶液; 分别取 6 份 1 mL 空白基质溶液, 用氮气吹干, 分别移取 1 mL 上述中间工作溶液复溶, 即得 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 基质匹配系列标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理

(1) 提取

将 2.0 g 的样品置于 50 mL 的具塞离心管中, 加入 5 mL 的一级水混匀, 保持静止 30 min, 之后加入 10 mL 乙腈, 2500 r/min 涡旋混合 15 min, 再加入 3.0 g NaCl 振荡混合 30 s, 20000 r/min 高速离心 3 min, 移取上清液待净化。

(2) 净化

取 4 mL 提取液到 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 的 15 mL 净化管中(开始先加 2 mL 一级水涡旋混匀), 涡旋混合 5 min 使净化充分, 之后 8000 r/min 高速离心 3 min, 取净化液到内含 1 g NaCl 的 15 mL 离心管中, 涡旋混匀 30 s, 8000 r/min 离心 3 min, 移取 1 mL 净化液过 0.22 μm PTFE 膜装瓶, 待 HPLC-MS/MS 测定。

1.2.3 仪器条件

(1) 液相色谱条件

色谱柱为 C_{18} (150 mm \times 2.1 mm, 3 μm); 柱温箱温度为 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 2.0 μL 。流动相 A 为乙腈, B 为一级水, 流速设置为 0.25 mL/min; 梯度洗脱程序为: 0~0.1 min, 45% B;

0.1~2.0 min, 45%~5% B; 2.0~4.0 min, 5% B; 4.0~4.5 min, 5%~45% B; 4.5~6.0 min, 45% B; 6.5 min 结束。

(2) 质谱条件

电喷雾离子化(electro spray ionization, ESI)模式; 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式检测; 加热气流量(F): 10 L/min; 接口温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器流量(N): 3 L/min; 加热块温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂管(desolvation line, DL)温度(D): 250 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流量: 8 L/min。质谱参数详见表 1。

1.3 数据处理

利用 Excel 2016 进行数据整理。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 质谱条件的优化

准确配制 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 2-己基吡啶溶剂标准溶液, 并利用 ESI^+ 模式和 ESI^- 模式对目标物进行全扫描。结果表明, 2-己基吡啶较适合于 ESI^+ , 其准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 164.15, 获得全扫描质谱图见图 2。输入前体离子为 m/z 164.15, 碰撞能量为-35 eV, 进行产物离子扫描, 得到的谱图见图 3, 在此基础上, 对碰撞能量、Q1 和 Q3 偏差电压等参数进一步优化。根据国际食品法典委员会 CAC/GL 90—2017 质谱分析方法, 要满足 4 点鉴定法, 识别点数必须有一个母离子和两个子离子。在本研究中, 选取离子丰度最高、基质干扰最小的 3 个离子对, 并将它们作为表征化合物的特征离子对, 其中, 选取了信号强度更大的离子对作为定量离子。2-己基吡啶的质谱特征离子对、保留时间、Q1 和 Q3 偏差电压和碰撞能量等参数见表 1。

2.1.2 流动相条件的优化

当使用电喷雾离子化模式进行样本分析时, 在流动相中添加适当的酸(甲酸、乙酸等), 可使目标化合物形成 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子, 加入适量的碱(甲酸铵、乙酸铵或氨水)可以减少 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 的形成, 促进目标物形成 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 从而提高目标离子的灵敏度。本研究中有有机相(A 相)分别由乙腈和甲醇构成; 由乙酸铵-水、一级水、甲酸-乙酸铵-水、甲酸-水构成无机相(B 相)。通过 A、B 两项不同的组合比较分析发现, A 相为一级水, B 相为乙腈, 2-己基吡啶的离子

表 1 定量定性离子对、保留时间、驻留时间及碰撞能量

Table 1 Quantitative and qualitative ion pairs, retention time, residence time and collision energy

名称	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/ms	Q1 偏差电压/V	碰撞能量/eV	Q3 偏差电压/V
2-己基吡啶	4.72	164.1	93.1*	100	-17.0	-26.0	-17.0
			106.1	100	-11.0	-26.0	-19.0
			78.1	100	-11.0	-50.0	-30.0

注: 带*的离子为定量离子。

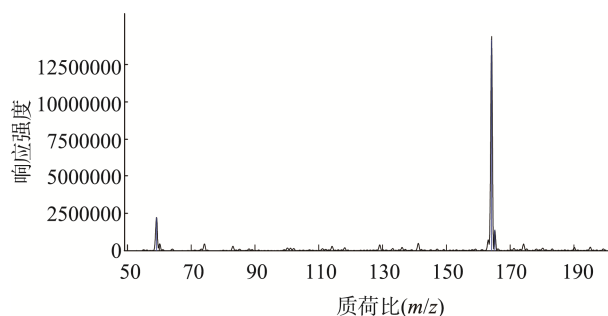


图2 2-己基吡啶的全扫描质谱图

Fig.2 Full scan mass spectrometry of 2-hexylpyridine

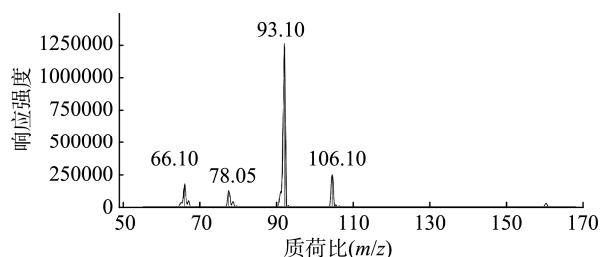


图3 2-己基吡啶的产物离子扫描质谱图

Fig.3 Ion scanning mass spectrometry of 2-hexylpyridine

化效率最佳, 且峰形尖锐。分析认为 2-己基吡啶较适合于 ESI⁺, 无机相中加入氨水使其出现前沿分叉峰导致响应降低; 虽然添加适当的酸, 可使目标化合物形成 [M+H]⁺ 离子,

但在流动相中加入 0.1% 甲酸 (*F/F*) 会使 2-己基吡啶出现拖尾和分叉峰。部分流动相对比色谱图详见图 4。最终本研究选择乙腈和一级水作为流动相。

2.1.3 色谱柱的选择

在液相色谱分析中, 决定分离效果的一个重要参数是色谱柱的选择, 但色谱柱类型的选择范围很广。为了充分验证不同极性色谱柱对 2-己基吡啶的色谱响应, 且考虑到 2-己基吡啶无极性官能团, 本研究选择 GL Sciences InertSustain C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 3 μm)、Shim-pack GIST-HP C₁₈-AQ (150 mm×2.1 mm, 1.9 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以上柱子基本涵盖了非极性到中等极性色谱柱。通过对比发现 2-己基吡啶在 C₁₈ 色谱柱的峰形优于 C₁₈-AQ 和 T3。即使官能团同样都为十八烷基 (GL Sciences InertSustain C₁₈ 和 Shim-pack GIST-HP C₁₈-AQ), 然而 GL Sciences InertSustain C₁₈ 的色谱响应高于 Shim-pack GIST-HP C₁₈-AQ, 分析原因为 C₁₈ 色谱柱是一种通用的反相色谱柱, 以十八烷基为固定相, 现代技术几乎可以实现完全的封端, 减少了硅胶基体的干扰, 为中等极性到非极性化合物提供最大的保留, Shim-pack GIST-HP C₁₈-AQ 采用键距优化技术, 严格控制十八烷基在硅胶表面键合长链之间的距离, 从而增加固定相与流动相特别是水之间的接触面, 提高极性化合物的保留, 2-己基吡啶无极性官能团, 极性较弱, 使

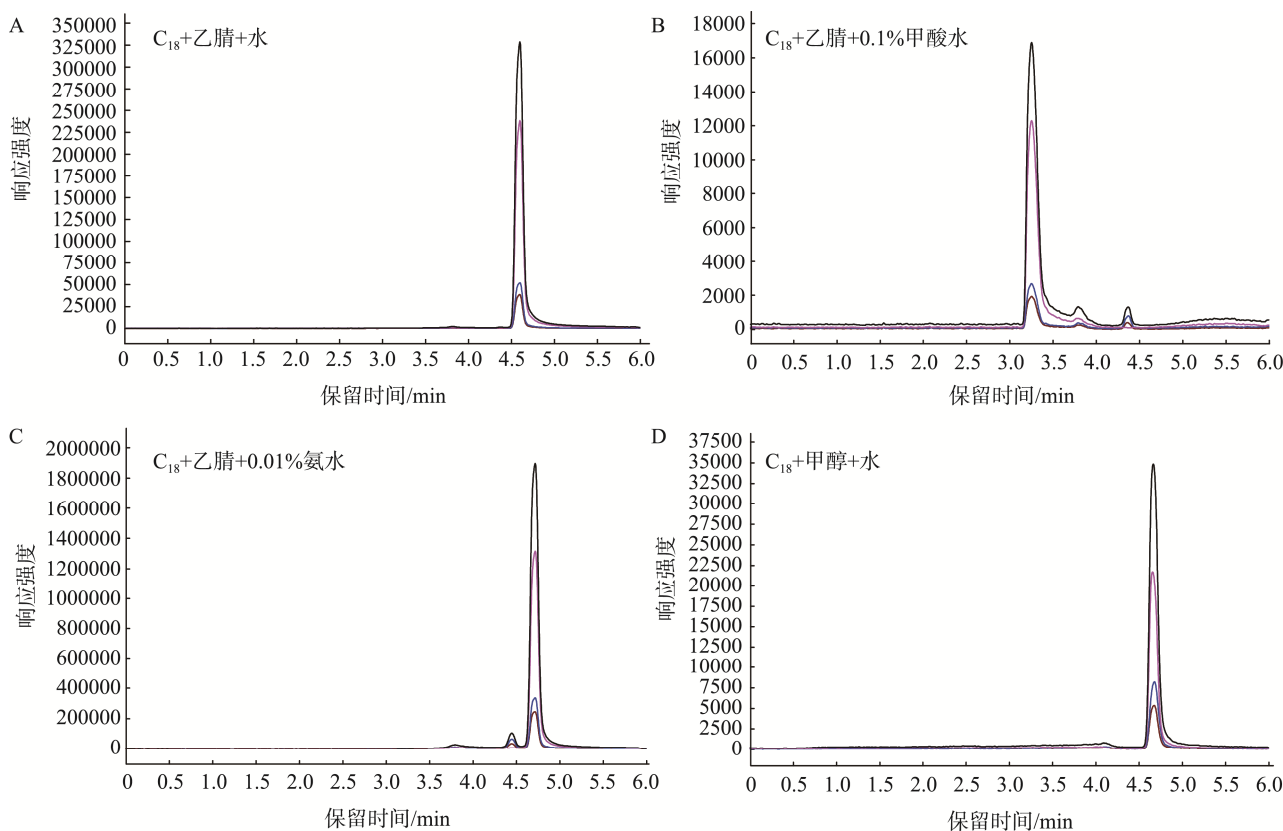


图4 不同流动相对2-己基吡啶分离效果的影响

Fig.4 Effects of different mobile phases on the separation effects of 2-hexylpyridine

得其在 Shim-pack GIST-HP C₁₈-AQ 的色谱响应弱于 GL Sciences InertSustain C₁₈。故本研究选择 GL Sciences InertSustain C₁₈ 色谱柱。

2.2 前处理条件优化

2.2.1 净化填料的选择

近年来,目标物检测愈发向更高效、更准确和更快速的方向发展。QuEChERS 由于具有简便、经济、效率高和环保等特点,目前已广泛应用于药物残留^[9-14]、添加剂^[15]、生物毒素^[16-21]等检测中。QuEChERS 方法通常使用的净化填料为 PSA、C₁₈、GCB。其中 PSA 用于净化的基质为有机酸、金属离子以及一些糖类和酚类; C₁₈ 去除脂类等非极性干扰物; GCB 去除色素、甾醇类等平面结构的非极性干扰物^[22]。汪春明等^[23]研究不同种类规格固相萃取柱的除油效果时,发现 AL-N 的除油效果较好,考虑到研究基质富含油脂较多,加入 AL-N 作为待考察净化填料。另两个待考察无机氧化物净化材料为 Si 和 FL。新型脂质净化材料,如增强型基质去除固相吸附剂(enhanced matrix removal, EMR)可以高效且选择性地去除样本中的脂质杂质,而不会导致分析物的损失,同时选择 QuEChERS dSPE EMR-Lipid、HMR-Lipid、Cleanert LipoNo、POLY-SERY HLB 作为新型聚合待考察净化材料。

分别准确称取 400 mg PSA、400 mg C₁₈、50 mg GCB、400 mg Si、400 mg FL、400 mg AL-N 到 5 mL 聚乙烯离心管中,分别加入 2 mL 50 ng/mL 2-己基吡啶标准溶液,2500 r/min 涡旋混匀 10 min,10000 r/min 高速离心 3 min,分别取 1 mL 上机测定,将上机测定的浓度进行记录,并对其计算,用以评估不同传统净化材料对 2-己基吡啶产生的吸附或干扰,回收率详见图 5。过 C₁₈ 净化填料后,2-己基吡啶的回收率只有 29%,分析原因为 2-己基吡啶长的碳链与碳十八发生分子间作用力而使其吸附于 C₁₈ 之上,从而导致其回收率低;过 GCB 净化填料后,2-己基吡啶的回收率为 66%,分析原因为 GCB 六角碳原子平面网格对 2-己基吡啶中吡啶平面芳香环的吸附作用是导致其回收率低的直接原因。同样,GCB 独特的平面结构,也会对一些平面结构的农药造成约 25% 的损失,比如噻菌灵、多菌灵、蝇毒磷、百菌清、吡嗪酮和啉菌环胺^[24];过 Si 净化填料后,2-己基吡啶回收率略微降低,非键合的 Si 是极性吸附剂,呈弱酸性,分析认为 2-己基吡啶被 Si 吸附是其回收低的主要原因;PSA、FL 和 AL-N 对 2-己基吡啶回收率影响较小。

按照 1.2.2 的方法开展前处理,使用不同的有机聚合净化填料来对其进行净化,然后按照 1.2.3 方法上机进行检测,并对其计算,其回收率如图 6 所示。用 HMR-Lipid 净化后,2-己基吡啶回收率只有 53% 左右,且目标物出现分裂峰,见图 7,分析原因可能是使用 HMR-Lipid 材料净化后产生了明显的溶剂效应;使用

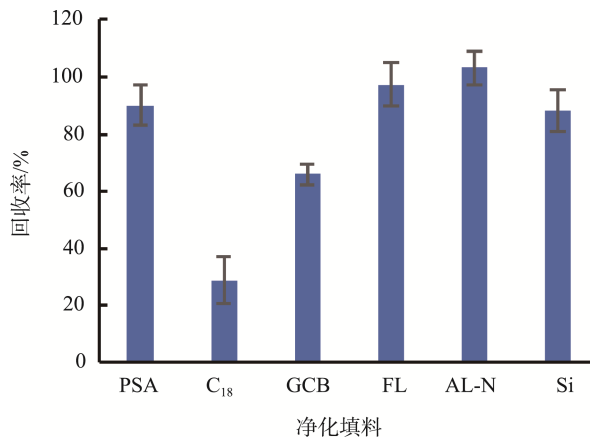


图5 传统净化填料对2-己基吡啶的吸附效果($n=3$, 质量浓度 50 ng/mL)

Fig.5 Adsorption effects of traditional purification materials on 2-hexylpyridine ($n=3$, 50 ng/mL)

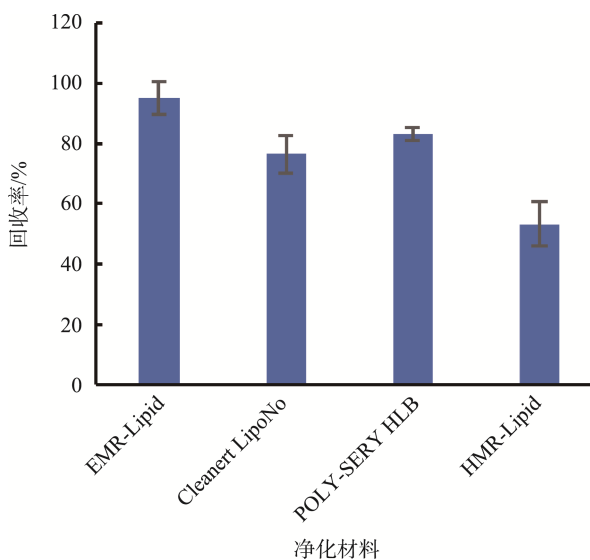


图6 聚合净化材料对2-己基吡啶的吸附效果($n=3$, 50 ng/mL)

Fig.6 Adsorption effect of organic polymeric purification materials on 2-hexylpyridine ($n=3$, 50 ng/mL)

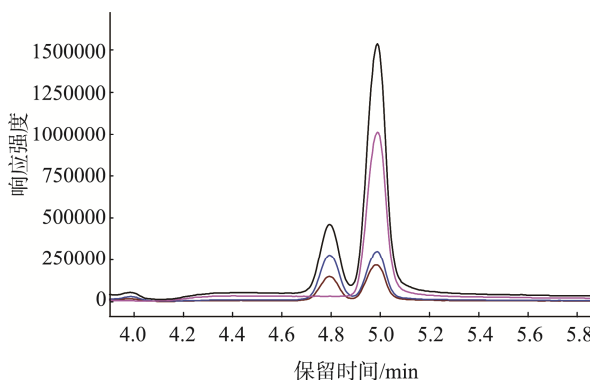


图7 HMR-Lipid净化后的色谱图

Fig.7 Chromatogram after HMR-Lipid purification

Cleanert LipoNo、POLY-SERY HLB 和 EMR-Lipid 净化材料后回收率分别为 76%、83%和 95%, EMR-Lipid 净化后的提取溶剂更接近流动相可能是其回收高的主要原因。因此选用 EMR-Lipid 作为本研究的净化材料。

2.2.2 滤膜的筛选

合适的滤膜对实验结果的影响至关重要, 滤膜的选择主要取决于滤膜与所过滤样液之间的化学兼容性。Nylon 和 PTFE 可用于水性和有机溶液的过滤, 化学兼容性广泛。PES 具有低蛋白吸附特性, 用于蛋白溶液的过滤, 也可用于温和有机溶液的过滤。GHP 用于水和腐蚀性有机溶液的过滤, 其低蛋白结合的特性可保证蛋白样品的高回收。MCE 微孔滤膜由硝酸纤维素酯和醋酸纤维素酯混合而成, 可以阻挡流体中微粒和微生物的通过, 达到净化流体中微生物、微粒的效果。分别移取 1 mL 50 ng/mL 2-己基吡啶标准溶液加入 Nylon、PTFE、PES、GHP 和 MCE 滤膜过滤后上机检测, 计算回收率, 结果见图 8。由图 8 可知: GHP 滤膜对 2-己基吡啶具有强烈的吸附作用, GHP 滤膜与蛋白结合低, 而研究基质蛋白含量高, 致使部分蛋白通过滤膜可能是其回收低的主要原因; MCE 滤膜对 2-己基吡啶有基质增强效应; 使用 PES 和 PTFE 过滤, 都能满足方法验证学的要求, 考虑到研究基质和提取溶液的特性, 本研究选择 PTFE 作为样液的滤膜。

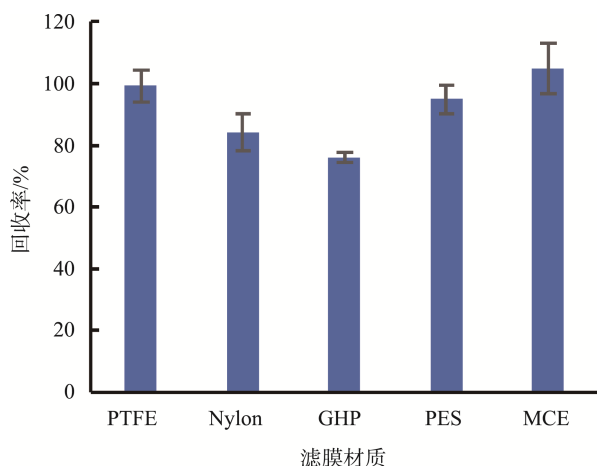


图8 不同滤膜对2-己基吡啶的过滤效果($n=3$, 50 ng/mL)

Fig.8 Filtration effect of different membranes on 2-hexylpyridine ($n=3$, 50 ng/mL)

2.2.3 提取溶剂的选择

在对目标物进行检测时, 经常会使用到以下几种萃取溶剂: 乙腈、正己烷、酸化乙腈、乙酸乙酯、甲醇、丙酮以及它们的不同比例的混合萃取液。正己烷和乙酸乙酯在萃取含油量高的样本时, 由于混合液中含有较高的油脂成分, 从而加大了后续纯化的难度, 且 EMR-Lipid 净化材料适合水溶性提取溶剂的净化, 因而除去。本研究在前面研究基础上, 比较 0.1%乙酸乙腈($V:V$)、乙腈、丙酮、甲醇

作为提取溶剂来考察提取效率。按 1.2.2 节处理样品并上机检测计算回收率。回收率见图 9。从图 9 可以看出: 以丙酮、甲醇作为提取溶剂时, 其回收率小于 70%, 丙酮和甲醇的共提取物多, 后续净化难度大使其回收率降低; 乙腈、0.1%乙酸乙腈作为提取溶剂都能使 2-己基吡啶的回收率达到 90%以上, 且随着酸的加入, 回收率有所降低, 结合 2.1.2 节可知, 加入 0.1%甲酸($V:V$)使 2-己基吡啶出现拖尾和分叉峰从而导致响应降低。综合考虑, 选择乙腈作为提取溶剂。

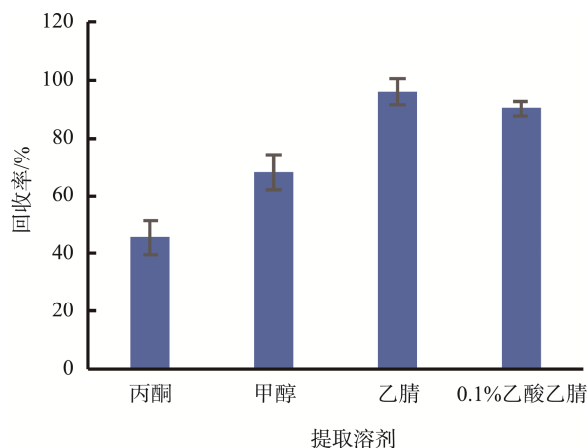


图9 不同提取溶剂对2-己基吡啶的提取效率

Fig.9 Extraction efficiencies of 2-hexylpyridine in different extraction solvents

2.3 基质效应、标准曲线和定量限

基质效应(matrix effect, ME)是指由于样本基质与被测物质进行共同洗脱, 从而导致分析信号的改变。ME 产生的主要原因是样品提取物中存在基质或其他干扰, 这些杂质通过与目标分析物共洗脱, 影响质谱的电离效率^[25-26]。基质的存在会对检测方法的准确性产生极大的影响, ME 是由不同的基质组成引起的, 并对复杂基质中目标物的检测和定量构成障碍, 强烈的 ME 可能导致显著的定量失真^[27-28]。此外, 即使样品中没有共洗脱物质, 流动相中存在的微量杂质也可以显著改变分析物的峰值。ME 不能完全消除, 但可通过改变校准技术来最小化 ME^[29]。配制溶剂标准溶液和与之相同浓度的基质标准溶液, 一同进行上机检测, 并利用线性拟合计算出斜率, 以此来评估方法的基质影响, 用 η 表示 ME 系数: $\eta=(\text{基质匹配标准曲线的斜率}-\text{溶剂标准曲线的斜率})/\text{溶剂标准曲线的斜率} \times 100\%$ 。当 $|\eta| < 10\%$, ME 不显著; 相反, 会产生显著的基质加强或削弱效应^[30]。按 1.2.2 节处理空白试样($S/N < 3$)获得空白基体萃取液, 按 1.2.1 节分别配制溶剂标准溶液和与之浓度相同的基质匹配标准溶液。由表 2 可知: 2-己基吡啶的 ME 明显, 且差异巨大, 其中果奶的基质增强效应为 38.78%; 奶粉的基质减弱效应达到 10.44%。鉴于此,

表 2 2-己基吡啶的线性方程、相关系数、MEs、平均回收率和 RSDs ($n=6$)
Table 2 Calibration curve, correlation coefficient, MEs, average recoveries and RSDs of 2-hexylpyridine ($n=6$)

基质	线性方程	相关系数 (r^2)	MEs/%	0.005 mg/kg		0.010 mg/kg		0.050 mg/kg	
				平均回收率 /%	RSDs/%	平均回收率 /%	RSDs/%	平均回收率 /%	RSDs/%
奶粉	$Y=20873X-7196$	0.999	10.44	102.31	9.53	98.22	4.11	104.33	4.76
酸奶	$Y=25677X+7010$	0.998	10.15	109.63	5.45	107.36	6.53	105.11	3.93
纯奶	$Y=30107X-6194$	0.999	29.12	98.57	6.82	108.92	4.92	94.45	7.22
果奶	$Y=32360X-8822$	0.998	38.78	103.83	5.51	97.38	6.17	97.91	6.44
奶酪	$Y=27645X+7610$	0.998	18.62	99.51	6.48	103.83	5.72	107.66	4.37

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

本研究采用基质匹配校准曲线。

以空白样品添加目标物色谱相应值为 $S/N \geq 10$ 的添加浓度为方法定量限(limit of quantification, LOQ)。以 2-己基吡啶的质量浓度(X , ng/mL)为横坐标, 2-己基吡啶的峰面积(Y)为纵坐标, 结果表明, 目标物在质量浓度 0.5~20.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.998, 方法的 LOQ 为 0.005 mg/kg。本研究方法的 LOQ 远低于“征求食品添加剂新品种意见”^[7]推荐方法, 因此可满足乳及乳制品中 2-己基吡啶定性定量分析的要求。

2.4 回收率及精密度实验

依 1.2.2 和 1.2.3 节, 对奶粉、酸奶、纯奶、果奶、奶酪进行前处理及上机检测, 选择 $S/N < 3$, 且不含 2-己基吡啶的样品作为空白, 以 0.005、0.010 和 0.050 mg/kg 为加标水平, 进行添加回收实验。所有样品添加 2-己基吡啶标准溶液后, 静置 30 min, 待样品充分吸收目标物后, 同样按照 1.2.2 和 1.2.3 节条件对样品进行处理和测定, 每个水平重复 6 次。由表 2 可知: 2-己基吡啶的平均回收率为 94.45%~109.63%, RSDs 为 3.93%~9.53%。表明本方法回收率和精密度能满足乳及乳制品中 2-己基吡啶的分析要求。

2.5 质控及实际样品测定

采用本方法对奶粉中 2-己基吡啶质控样品进行检测, 通过测定具有特性值和不确定度的质控样品, 来对检测方法进行验证。所用质控样品 2-己基吡啶特性值及不确定度分别为(0.253±0.023) mg/kg。质控样品平行测定 6 次, 取平均值为 0.254 mg/kg, 采用稳健统计方法计算的 z 值为 0.8。所得 $|z| < 2$, 说明检测结果为满意, 证明本方法能够准确检测奶粉中的 2-己基吡啶。采用本方法对市售的 10 种乳制品共计 52 份样品进行 2-己基吡啶残留量检测。结果显示, 所测样品均未检出 2-己基吡啶。为了更好地监控乳制品质量安全, 需要持续检测乳及乳制品中的 2-己基吡啶非法添加量。

3 结论

针对乳及乳制品中 2-己基吡啶含量的测定, 本研究以乙腈为萃取溶剂, 通过 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 对样品进行净化, 并对 HPLC-MS/MS 进行优化, 实现了对乳及乳制品中 2-己基吡啶含量的定性定量检测, 为乳及乳制品风险的有效预防提供了一种有效、可靠的分析检测手段。

参考文献

- [1] National Center for Biotechnology Information. PubChem compound summary for CID 70797, 2-hexylpyridine [EB/OL]. (2023-07-22). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Hexylpyridine> [2024-01-01]
- [2] 化源网. 2-己基吡啶 [EB/OL]. (2023-01-14). https://www.chemsrc.com/cas/1129-69-7_1072653.html [2024-01-01]
- [3] 物竞化学数据库. 2-正己基吡啶 [EB/OL]. (2023-06-08). <http://www.basechem.org/chemical/9819> [2024-01-01]
- [4] European Bioinformatics Institute. 2-n-Hexylpyridine [EB/OL]. (2023-06-08). <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:195229> [2024-01-01]
- [5] Chemical Book. CAS database list, 2-Hexylpyridine [EB/OL]. (2023-06-08). https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8350442 [2024-01-01]
- [6] European Bioinformatics Institute. 2-Hexylpyridine [EB/OL]. (2023-06-27). <https://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebiId=CHEBI:195229&treeView=true#vzualisation> [2024-01-01]
- [7] 国家食品安全风险评估中心. 关于公开征求聚天冬氨酸钾等 10 种食品添加剂新品种意见 [EB/OL]. (2022-10-28). <https://cfsa.net.cn/Article/News.aspx?id=97005957CF1E064A8A5727F78691F9A9644CB2A87894BA02> [2024-01-01]
- [8] China National Center for Food Safety Risk Assessment. Opinions on publicly soliciting 10 new food additives such as potassium aspartic acid [EB/OL]. (2022-10-28). <https://cfsa.net.cn/Article/News.aspx?id=97005957CF1E064A8A5727F78691F9A9644CB2A87894BA02> [2024-01-01]
- [9] 食品安全标准与监测评估司. 关于假膜肠明串珠菌等 28 种“三新食品”

- 的公告[EB/OL]. (2023-03-02). <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202303/aa82bf72d6054f82adced82fc9aac4d9.shtml> [2024-01-01]
- The department of food safety standards, monitoring and evaluation. Announcement on 28 “three new foods” including leuconostoc pseudoenterica [EB/OL]. (2023-03-02). <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202303/aa82bf72d6054f82adced82fc9aac4d9.shtml> [2024-01-01]
- [9] KIM K, CHOI Y, MOK S, *et al.* Optimization of the QuEChERS method for multi-residue analysis of pharmaceuticals and pesticides in aquaculture products [J]. *Food Chemistry*, 2023, 399: 133958.
- [10] GARCÍA-VARA M, POSTIGO C, PALMA P, *et al.* Development of QuEChERS-based multiresidue analytical methods to determine pesticides in corn, grapes and alfalfa [J]. *Food Chemistry*, 2022, 405: 134870.
- [11] DAI J, LIN H, PAN Y, *et al.* Determination of chlorpromazine and its metabolites in animal-derived foods using QuEChERS-based extraction, EMR-Lipid cleanup, and UHPLC-Q-orbitrap MS analysis [J]. *Food Chemistry*, 2023, 403: 134298.
- [12] SU Y, LU J, LIU J, *et al.* Optimization of a QuEChERS-LC-MS/MS method for 51 pesticide residues followed by determination of the residue levels and dietary intake risk assessment in foodstuffs [J]. *Food Chemistry*, 2024, 434: 137467.
- [13] KOLOKA O, KOULAMA M, HELA D, *et al.* Determination of multiclass pharmaceutical residues in milk using modified QuEChERS and liquid-chromatography-hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometry: Comparison of clean-up approaches and validation studies [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2023, 28(16): 6130.
- [14] KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K, *et al.* Assessment and validation of the p-QuEChERS sample preparation methodology for the analysis of > 200 veterinary drugs in various animal-based food matrices [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2023, 40(3): 356–372.
- [15] MAHLANGU WB, MASEKO BR, MONGADI IL, *et al.* Quantitative analysis and health risk assessment of bisphenols in selected canned foods using the modified QuEChERS method coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2023, 37: 101078.
- [16] AREO OM, ABAFE OA, GBASHI S, *et al.* Detection of multi-mycotoxins in rooibos and other consumed teas in South Africa by a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Control*, 2023, 143: 109255.
- [17] SADOK I, SZMAGARA A, KRZYSZCZAK A. Validated QuEChERS-based UHPLC-ESI-MS/MS method for the postharvest control of patulin (mycotoxin) contamination in red-pigmented fruits [J]. *Food Chemistry*, 2023, 400: 134066.
- [18] LONG Y, HUANG Y, ZHU M, *et al.* Development of QuEChERS clean-up based on EMR-lipid for simultaneous analysis of 9 mycotoxins, acaylamide and 5-hydroxymethylfurfural in biscuit by UHPLC-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2023, 9: 135265.
- [19] XIE H, LI Y, LI J, *et al.* Mycotoxin determination in peaches and peach products with a modified QuEChERS extraction procedure coupled with UPLC-MS/MS Analysis [J]. *Foods*, 2023, 12(17):3216.
- [20] RODRÍGUEZ-CAÑÁS I, GONZÁLEZ-JARTÍN JM, ALVARIÑO R, *et al.* Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification [J]. *Food Chemistry*, 2023, 408: 135182.
- [21] ZHAO R, HUANG QW, YU ZY, *et al.* Simultaneous determination of 36 mycotoxins in fruits by QuEChERS coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(9): 760–770.
- [22] 汪春明, 乐粉鹏, 赵鑫, 等. QuEChERS-同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中灭蝇胺残留[J]. *食品科技*, 2022, 47(5): 309–316.
- WANG CM, YUE FP, ZHAO X, *et al.* Determination of cyromazine in the fruits and vegetables by QuEChERS-internal standard-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(5): 309–316.
- [23] 汪春明, 张洋, 王东斌, 等. 固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定大豆油中 126 种农药残留[J]. *农药学报*, 2021, 23(2): 405–413.
- WANG CM, ZHANG Y, WANG DB, *et al.* Determination of 126 kinds of pesticides residues in soybean oil by solid phase extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2021, 23(2): 405–413.
- [24] 王东斌, 汪春明. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中啶磺草胺的残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9): 3799–3806.
- WANG DB, WANG CM. Determination of pyroxsulam in the grain crops by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(9): 3799–3806
- [25] KIM SH, LEE YH, JEONG MJ, *et al.* LC-MS/MS Method minimizing matrix effect for the analysis of bifenthrin and butachlor in Chinese chives and its application for residual study [J]. *Foods*, 2023, 12(8): 1683.
- [26] CHOI S, SHIM WS, YOON J, *et al.* Method development and validation for the simultaneous quantitation of pentoxifylline, its pharmacologically active metabolites, and donepezil using LC-MS/MS in rat plasma: its application to a pharmacokinetic study [J]. *Separations*, 2023, 10(5): 276.
- [27] DAMALE RD, DUTTA A, SHAIKH N, *et al.* Multiresidue analysis of pesticides in four different pomegranate cultivars: Investigating matrix effect variability by GC-MS/MS and LC-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2023, 407: 135179.
- [28] TSIANTAS P, BEMPELOU E, DOULA M, *et al.* Validation and simultaneous monitoring of 311 pesticide residues in loamy sand agricultural soils by LC-MS/MS and GC-MS/MS, combined with QuEChERS-based extraction [J]. *Molecules*, 2023, 28(11): 4268.
- [29] KANRAR B, GHOSH P, KHAN P, *et al.* Alternative strategies for the calibration and elimination of matrix effects in LC-MS/MS multiresidue analysis of tea matrix [J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 77(2): 224–234.
- [30] ZHU YL, LIU XG, XU J, *et al.* Simultaneous determination of spirotramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1299: 71–77.

(责任编辑: 于梦娇 安香玉)